

Titre de la thèse	dynaMICs of trace Metals bioACcumulation in the plastisphere: a double microplastics threat (MICMAC)
École Doctorale	ED548
Laboratoires	MIO - MAPIEM
Discipline	Géosciences de l'environnement
Directeur(s) de Thèse & Encadrant(s)	Directrice : Véronique Lenoble (MCF HDR, lenoble@univ-tln.fr) Co-encadrante : Annick Ortalo-Magné (MCF, annick.ortalo-magne@univ-tln.fr) Co-directeur : Jean-François Briand (MCF HDR, briand@univ-tln.fr)

Description du sujet de recherche

Contexte, originalité et pertinence par rapport à l'état de l'art :

En raison des activités humaines, l'environnement marin est confronté à des défis sans précédents, en particulier l'ubiquité de la pollution chimique¹. Celle-ci englobe des contaminants émergents tels que les macroplastiques (> 5 mm), les microplastiques (1 µm-5 mm) et leurs additifs chimiques². Les preuves de la toxicité ainsi que de la fragmentation des plastiques en micro- et nanoplastiques (< 1 µm) étant de plus en plus nombreuses, une attention particulière a été accordée à ces fractions ainsi qu'à leurs impacts écotoxicologiques³⁻⁴. Ces conséquences sont d'autant plus imprévisibles - et sans doute sous-estimées - qu'une fois dans le milieu aquatique, et comme tout objet immergé, les microplastiques sont rapidement colonisés par des biofilms, communautés microbiennes complexes associées à une matrice d'exopolymères autoproduite, aussi appelés plastisphères⁵. Cet assemblage vient modifier les propriétés physicochimiques des microplastiques amplifiant l'accumulation de contaminants⁶⁻⁸. Plusieurs travaux ont pu en effet mettre en évidence la bioaccumulation très forte d'un large panel de métaux traces par le biofilm se développant sur les microplastiques immergés^{7,9-10}, démontrant que ceux-ci représentent une menace supplémentaire pour les écosystèmes. A la dangerosité physique ou mécanique (ingestion ou étouffement¹¹) des microplastiques viennent donc s'ajouter des risques de transferts de cocktails de contaminants associés au biofilm à leur surface, par relargage dans des masses d'eau moins contaminées, ou de transferts trophiques, par ingestion ou broutage¹². Si cette bioaccumulation de contaminants a été mise en évidence pour plusieurs métaux, de nombreuses questions sur le rôle de la plastisphère demeurent, en particulier concernant la dynamique des processus d'accumulation/relargage associés, la localisation des métaux dans la plastisphère ou encore l'incidence sur la fragmentation des plastiques en eux-mêmes.

Objectifs :

Dans ce contexte, les objectifs de la thèse visent à répondre à plusieurs questions scientifiques précises :

- mesurer la bioaccumulation et le relargage de contaminants métalliques ciblés (cuivre, plomb et arsenic) par la plastisphère ;
- caractériser les liens au sein de la plastisphère entre la diversité microbienne, la nature des Substances Polymériques Extracellulaires (EPS, principaux composants de surface des biofilms) et les propriétés de bioaccumulation/relargage. Les EPS fournissent en effet de nombreux sites de fixation pour les métaux en lien avec leur nature principalement polysaccharidique et protéique ;
- identifier la spéciation et la localisation des contaminants bioaccumulés dans la plastisphère afin de mettre en évidence des mécanismes de biodistribution et de biotransformation ;
- suivre la cinétique de dégradation dans le cas d'un plastique biodégradable et évaluer l'impact de la plastisphère spécifiquement sélectionnée sur ce matériau sur les mécanismes de bioaccumulation/relargage associés.

Le projet MICMAC est un projet qui nécessite une grande interdisciplinarité pour mieux appréhender les différents aspects de microbiologie, biochimie, géochimie et chimie des matériaux inhérents au projet. Ainsi, la thèse s'inscrit dans le réseau de partenaires des encadrants de la thèse qui apporteront une synergie complète permettant de comprendre la bioaccumulation aussi bien d'un point de vue du devenir des métaux (nature et force des sites de bioaccumulation) que de la composition de la matrice de la plastisphère et des interactions

entre eux, en lien avec les impacts sur la fragmentation des plastiques, pour *in fine* apporter une vision intégrative des phénomènes complexes mis en jeu dans les écosystèmes.

Méthodes :

Les questions scientifiques seront abordées simultanément. Deux polymères sont envisagés : du polyéthylène haute densité (PE, majoritairement présent en milieu marin et qui contient notoirement moins d'additifs que d'autres polymères) et un polymère polyester biodégradable (PLA). Des pièces de plastiques de 1 cm² seront immergées *in situ* sur notre site d'étude (rade de Toulon) de façon à obtenir le développement d'un biofilm mature similaire sur toutes les pièces à chaque campagne. Le protocole d'immersion, développé dans le cadre du JPI Oceans MicroplastiX (2021-2024) a été optimisé pour répondre aux questionnements multidisciplinaires. Une fois récupérées, les pièces seront rapidement transvasées dans un contenant adapté rempli d'eau de mer prélevée sur le site d'immersion. La méthodologie sera ensuite la suivante (en italique ci-après, les étapes qui seront effectuées par le biais d'un partenariat via le réseau des encadrants de la thèse) :

a/- Ajout d'un seul contaminant métallique (Cu, Pb, ou As), à une concentration représentative d'une zone contaminée comme une zone côtière. Après l'ajout, à intervalles de temps prédéfinis (1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h), des pièces seront retirées avec précaution du milieu et utilisées pour :

i) une mesure de la quantité de contaminants bioaccumulés (digestion douce¹³ et analyse par ICP-MS (Inductively coupled Plasma-Mass Spectrometry) ; protocole développé et validé dans le cadre du JPI Oceans MicroplastiX (Lenoble et al., 2024))

ii) *leur localisation en 2D et 3D dans la plastisphère par microfluorescence X, micro-, et nano-tomographie X¹⁴⁻¹⁵ (plateforme MATRIX, Equipex+ IMAGINE, CEREGE)*

iii) une quantification de la biomasse (par coloration au cristal violet)

iv) une caractérisation des EPS du biofilm formé par l'établissement de signatures biochimiques (carbohydrates et protéines quantifiés relativement par analyses ATR-IR, protocole récemment développé dans le laboratoire MAPIEM, et visualisés en microscopie confocale après marquages spécifiques⁷)

v) *après 48h de bioaccumulation, une caractérisation de la spéciation des métaux accumulés par spectroscopie d'absorption X à haute résolution en énergie d'émission (ligne FAME UHD de l'ESRF dédiée à la caractérisation structurale des éléments dans des systèmes environnementaux ultra dilués ; avec Dr. M. Auffan du CEREGE)*

vi) après 48h de bioaccumulation, l'analyse de la diversité et la composition des communautés microbiennes de la plastisphère par metabarcoding (séquençage illumina des gènes de l'ADNr 16S et 18S)

vii) une étude cinétique du relargage. Pour ce dernier point, les pièces seront placées dans une eau de mer prélevée en dehors de la rade de Toulon et donc au large et caractéristique du bruit de fond géochimique de la mer Méditerranée. Là aussi, à intervalles de temps réguliers (1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h), des aliquots d'eau de mer seront prélevés et analysés pour mettre en évidence et quantifier un enrichissement de l'eau par les métaux se désorbant de la plastisphère. Au temps final, les pièces seront prélevées et les points i), ii), iii) et iv) seront réalisés.

viii) *pour certaines conditions à définir en fonction des résultats obtenus, un suivi de la fragmentation et de l'impact de la plastisphère sur les processus associés en utilisant un polymère dégradabile, à base de polyester, marqué au ¹³C grâce à un protocole en cours de mise au point (partenariat avec Dr. O. Sandre, LCPO). Le marquage permettra la détection spécifique de micro- ou nano-plastiques.*

b/- Le même protocole expérimental sera appliqué mais avec des combinaisons de contaminants utilisés en proportion 1 :1. Les contaminants ciblés, Cu, Pb et As, sont fréquemment rencontrés en zone côtière sous l'influence d'activités anthropiques. De plus, leur choix se justifie par le fait qu'ils ont des propriétés différentes : complexation plus ou moins forte par les ligands organiques, charges positives ou négatives, etc. Il nous apparait primordial de regarder la synergie entre contaminants afin d'être plus représentatifs d'un milieu côtier. Ils seront testés 2 par 2, puis tous ensemble.

Ces séries de manipulation seront réalisées la première année en automne, la seconde année au printemps ; ces saisons semblant les plus optimales pour le développement de la plastisphère (Lenoble et al. 2024).

Le maillage et les analyses conjointes nous permettront de relier la composition microbienne de la plastisphère, la quantité de biofilm et la nature des EPS (composition biochimique globale) aux propriétés de bioaccumulation en termes de métal privilégié ainsi que de localisation et de forme chimique (spéciation) impliqués, mais également aux possibilités de relargage du ou des contaminants bioaccumulés. Ainsi, nous aurons une idée fine de l'échelle des processus mis en jeu, de la réversibilité de la bioaccumulation des contaminants par la

plastisphère, des sites mis en jeu, de la forme chimique donc de la nocivité du contaminant, mais également de l'ampleur de la bioaccumulation et de sa force. Parallèlement, le suivi de la fragmentation des microplastiques impliquant une synthèse innovante et leur marquage isotopique permettra de mettre en évidence la cinétique et l'ampleur de la dégradation d'un plastique retrouvé de façon majoritaire dans l'environnement et de montrer l'impact du biofilm sur les processus mis en œuvre.

	Sem. 1	Sem. 2	Sem. 3	Sem. 4	Sem. 5	Sem. 6
Préparation de l'expérimentation	x					
Bioaccumulation/relargage et localisation des métaux		x	x			
Caractérisation des EPS		x	x			
Caractérisation spéciation des métaux			x	x		
Suivi de la fragmentation				x	x	
Valorisation et rédaction				x		x

Retombées attendues :

Le consortium, désireux d'évaluer la pertinence du projet par des travaux préliminaires, a déjà abordé empiriquement les questions de bioaccumulation/libération des métaux par la plastisphère à l'aide d'un plan expérimental mis en place à cette fin et validé.

La thèse permettra d'innover sur plusieurs aspects :

- L'étude de la spéciation des métaux dans la plastisphère est une véritable valeur ajoutée, permettant d'aller plus loin dans la compréhension de la bioaccumulation des contaminants. La détermination de la localisation des métaux dans le biofilm (les métaux sont-ils complexés dans la matrice ? ont-ils pénétré dans les cellules ?) est un véritable défi, totalement innovant, qui précisera comment les métaux peuvent être libérés dans les eaux environnantes ou être piégés à long terme dans la plastisphère.
- Le lien entre les EPS et la communauté microbienne de la plastisphère n'a pas pu être réalisé dans la pré-étude. L'information de la diversité microbienne associée à la variation observée de la nature des EPS, sera une véritable pierre angulaire pour la compréhension de la dynamique de la plastisphère, un point totalement inconnu pour le moment.
- Que se passe-t-il dans des conditions réelles ? Le couplage expérimental proposé ouvrira la voie à des conclusions réalistes et intégratives sur les propriétés de bioaccumulation et de fragmentation des métaux dans des écosystèmes en constante évolution.

Mots clés :

Plastisphère, contaminants métalliques, bioaccumulation, relargage, cinétique, approche in-situ.

Références :

1. Rockström et al. 2009 A safe operating space for humanity. Nature 461, 472–475
2. da Costa J.P. et al. 2022 Plastic additives and microplastics as emerging contaminants: Mechanisms and analytical assessment. TrAC, p.116898
3. Ragusa A. et al. 2021 Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. Environment International, 146, 106274
4. Yamashita R. et al. 2021 Plastic additives and legacy persistent organic pollutants in the preen gland oil of seabirds sampled across the globe, Environmental Monitoring and Contaminants Research, 1, 97-112
5. Zettler E.R. et al. 2013 Life in the "Plastisphere": Microbial Communities on Plastic Marine Debris. Environmental Science and technology 47, 13, 7137-7146
6. Liu S. et al. 2021 Interactions between microplastics and heavy metals in aquatic environments: A review. Front. Microbiol. 12
7. Djaoudi K. et al. 2022 Seawater copper content controls biofilm bioaccumulation and microbial community on microplastics. Sci. Total Env. 814, 152278
8. Pan H. et al. 2023 Research progress on the role of biofilm in heavy metals adsorption-desorption characteristics of microplastics: a review. Environmental pollution 336, 122448
9. Richard H. et al. 2019 Biofilm facilitates metal accumulation onto microplastics in estuarine waters. Science of the Total Environment, 683
10. Lenoble V. et al. 2024 Bioaccumulation of trace metals in the plastisphere: awareness of environmental risk from a european point of view. Environmental Pollution 348, 123808
11. Santos, R. G. et al. 2021 Plastic ingestion as an evolutionary trap: Toward a holistic understanding. Science. 60, 56–60
12. Tumwesigye E. et al. 2023 Microplastics as vectors of chemical contaminants and biological agents in freshwater ecosystems: current knowledge status and future perspectives. Environmental Pollution 330, 121829
13. Justino A.K.S. et al. 2021 Microplastic contamination in tropical fishes: An assessment of different feeding habits. Regional Studies in Marine Science 45, 101857
14. Auffan M. et al. 2012 Environ. Sci. Technol., 2012, 46, 10789–10796
15. Auffan M. et al. 2020 Environ. Sci. Nano, 2020, 3167–3177.

Encadrement et conditions matérielles pour le doctorant

Les manipulations prévues, si elles sont chronophages (au moins au lancement) et demandent une bonne organisation, ne sont pas coûteuses en termes de fonctionnement, et relativement peu coûteuses pour les analyses envisagées. Les coûts pourront être pris en charge pour partie par l'Ec2CO SMILE (financement obtenu 2025), et également par l'ANR ICCER TRUTH (en évaluation).

Compétences attendues et personnes à contacter

L'étudiant, titulaire d'un Master ou diplôme équivalent, devra posséder une formation en géochimie, avec une ouverture en biochimie et en chimie analytique. Expérimentateur, il fera preuve d'une grande curiosité scientifique pour aborder les différents aspects de ce sujet pluridisciplinaire. La maîtrise de l'anglais est indispensable.

Personne(s) à contacter :

Le travail de cette thèse sera encadré par trois enseignants-chercheurs associés à deux laboratoires :

MIO : Véronique Lenoble MCF HDR (ilenoble@univ-tln.fr) (60% de l'encadrement)

MAPIEM : Annick Ortalo-Magné MCF (annick.ortalo-magne@univ-tln.fr) (30% de l'encadrement) et Jean-François Briand MCF HDR (briand@univ-tln.fr) (10% de l'encadrement)

thèse ED 548- Véronique LENOBLE (Sujet 1)

	à renseigner
Nom et prénom du directeur de thèse	Lenoble Véronique (60%)
HDR, OUI/NON et date obtention	oui, 06/06/2023
equipe	CEM
Codirecteur éventuellement	Annick Ortalo-Magné (30%) et JF Briand (10%). Aval du directeur de l'ED548 sur le dimensionnement d'un Trio encadrant
equipe/laboratoire du codirecteur	MAPIEM
Titre du sujet de thèse	dynaMICS of trace Metals bioACcumulation in the plastisphere: a double microplastics threat (MICMAC)
thèse complète ou demi bourse	thèse complète
Projet finançant la thèse, montant total du projet, durée du projet, nom du porteur	EC2CO SMILE: montant total 17.5 k€ (obtenu) ANR ICCER TRUTH (en évaluation, réponse courant avril) montant total 247.6k€
en quoi cette thèse apporte une plus value pour le laboratoire	Tout d'abord, cette thèse, à l'interface entre chimie, biochimie et microbiologie, apportera de réelles innovations dans la compréhension des risques liés à la présence concomitantes des plastiques et des contaminants métalliques en zones côtières. En mobilisant des compétences complémentaires et des outils interdisciplinaires issus du trio encadrant, elle vise à explorer des processus qui n'ont encore jamais été étudiés à ce jour. Ce positionnement novateur correspond pleinement à la dynamique du MIO, en s'inscrivant dans deux des défis transverses du laboratoire : le défi 2 portant sur les processus inter-échelles (ici la plastiphère comme interaface complexe) et le défi 3 concernant les liens biodiversité/cycles (étude des interactions microplastique / biodiversité microbienne et plastiphère / cycle des métaux). Cette thèse renforcera les activités des équipes du MIO, principalement CEM (expertise en contaminants et molécules organiques) et contribuera par ses avancées aux équipes MEB et EMBIO. Elle met également en avant les outils des PF et PTF du MIO en analyses des contaminants. Cette thèse renforce les collaborations actives et de longue date entre le MIO et MAPIEM. D'autre part, L'ANR qui soutient le projet de thèse inclut tout un volet sociétal et aide à la prise de décision pour les instances en charge des zones cotières toulonnaises, donc ce côté appliqué est tout à fait une plus value du sujet. Egalement, nous avons LE candidat qui répond à toutes nos attentes. Il s'agit d'un étudiant biochimiste de formation, major de toutes ses promotions, et qui a suivi volontairement des formations en microbiologie (stage école d'été MicroWorld dispensé par Sorbonne Université en 2023, après avoir validé son M1). Il a validé son master (mention B) en 2024, mais souhaitant rester disponible car il est très intéressé par cette thèse, il occupe actuellement un poste d'ingénieur d'études en CDD au laboratoire d'océanographie microbienne (66), où il se forme à la caractérisation chimique de composés bactériens. Pour finir, cette même demande de thèse avait été classée seconde par le MIO l'an dernier, non pas pour des raisons de qualité scientifique ou de montage, mais dans un contexte de priorisation de candidature (jeune recruté vs HDR).
historique des 3 derniers encadrements nom de l'étudiant, durée de la thèse, financement de la thèse, financement de la recherche, nombre d'article, devenir de l'étudiant	Véronique Lenoble n'a plus d'encadrement de thèse depuis novembre 2023. Clara Dignan (co-direction, taux encadrement 50%, avec Dr B. Misson, laboratoire M.I.O.) " Biodisponibilité de la matière organique dissoute pour les procaryotes hétérotrophes en zone côtière Méditerranéenne : caractérisation et hiérarchisation des facteurs de contrôle" Débutée en octobre 2020, soutenue le 3 novembre 2023 Financement : bourse de l'école doctorale ED 548 3 articles dans des revues à comité de lecture, IF > 1 situation actuelle: post doctorat Anne Justino (co-direction, taux encadrement 50%, avec Pr Flavia Frédou, Laboratoire BIOIMPACT, Recife, Brésil) " From the estuary to the deep sea : microplastic contamination of fishes from Southwest Tropical Atlantic " Débutée en novembre 2019, soutenue le 15 septembre 2022 5 articles dans des revues à comité de lecture, IF > 1 Financement : bourse sur critères universitaires (Brésil) Situation actuelle : post-doctorat au Brésil (01/10/2022) Nicolas Layglon (co-direction, taux encadrement 33%, avec Dr S. Mounier 33% et Dr B. Misson 33%, laboratoire M.I.O.) "Comportement des éléments traces métalliques lors de la remise en suspension de sédiments contaminés en zone côtière" Débutée en novembre 2017, soutenue le 3 septembre 2020 Financement : Bourse doctorale de la région PACA 5 articles dans des revues à comité de lecture, IF > 1 Situation actuelle : CR CNRS à EPOC (1/10/2024)