



# CONTAMINATION DES VERTEBRES MARINS PAR LES PLASTIQUES EN GUYANE

*ASSOCIATION KWATA 2019*

*BEST RUP GRANT 2493*



*Ce document a été réalisé avec l'aide financière de l'Union européenne. Le contenu de ce document est de la seule responsabilité de Association Kwata et ne peut en aucun cas être considéré comme reflétant la position de l'Union européenne*

**La récente Liste Rouge Régionales de Vertébrés de Guyane (2018) a mis en avant le fait que le milieu marin présentait une grande diversité de mammifères marins et des populations de tortues marines abondantes, mais a souligné le manque de connaissance pour des nombreuses espèces, et des statuts de conservation précaires. La dernière actualisation des ZNIEFF a inclus pour la première fois une composante marine, et avec 18 ZNIEFF-Mer proposées et validées en 2015, la Guyane a ainsi été le premier département d'Outre-Mer français à disposer de son inventaire ZNIEFF-Marines. Les tortues marines et les dauphins de Guyane ont été des espèces déterminantes pour la mise en place de ces ZNIEFFs.**

Si une augmentation importante des études sur le milieu marin ces dernières années est à noter en Guyane, les connaissances restent encore assez réduites par rapport à d'autres régions, et certaines informations nécessaires à une meilleure protection et valorisation des espèces et de leurs habitats sont encore lacunaires. Les tortues marines, du fait de leur cycle de vie, en sont un exemple. Seules les femelles adultes peuvent facilement être observées et étudiées pendant la période de ponte puis lors des premiers mois de migration post-ponte, cette période de suivi étant déterminée par la durée de vie des émetteurs utilisés pour les suivre. Les informations sur les juvéniles sont très parcellaires [1], et sont pratiquement nulles sur les mâles, ou encore les femelles en dehors des cycles de ponte. Par ailleurs ces espèces sont soumises à de nombreuses pressions plus ou moins visibles (pollutions, ingestions de déchets, prises accidentelles dans des filets...). Le plan National d'Action en faveur des tortues marines pour la période 2014- 2023 comprend 7 objectifs spécifiques, l'un d'eux étant donc "l'amélioration des connaissances au service de la conservation". L'importance de la connaissance du statut sanitaire apparaît notamment dans deux objectifs opérationnels du 2ème Plan National d'Actions en faveur des Tortues Marines de Guyane 2014-2023. Les données acquises lors de du projet "Alimentation et causes de mortalité chez les tortues et mammifères marins échoués en Guyane" contribueront directement aux indicateurs de réalisation des trois objectifs opérationnels "suivre l'état sanitaire des tortues marines", "connaître et quantifier les menaces sur les adultes", et "intégrer les effets possibles des changements globaux dans la stratégie de conservation". Le projet devait permettre d'acquérir des connaissances importantes pour répondre aux deux grands axes développés dans les arrêtés de protection des espèces (arrêté du 14 octobre 2005 sur les tortues marines, arrêté du 01 juillet 2011 sur les mammifères marins), avec tout autant la protection des espèces que la protection des habitats nécessaires à l'accomplissement de leurs cycles de vie.

La Liste Rouge régionale a récemment considéré le dauphin des Guyanes comme étant "en danger", ce statut est assez pessimiste, et est expliqué essentiellement par les interactions avec la pêche. La dégradation de la qualité des habitats et notamment des eaux de la zone côtière est également mise en avant. Bien que l'espèce ne bénéficie pas actuellement d'un Plan National d'Action, elle a été identifiée par le CSRPN comme candidate potentielle et proposée comme telle en 2019.

## MISE EN PLACE DU PROJET : REVISION DES OBJECTIFS PRIORITAIRES

Ce projet s'intéresse donc à des espèces à la fois "déterminantes ZNIEFF", "espèces clés de zones de conservation de la Biodiversité", et identifiées par la Liste Rouge comme ayant toutes des statuts de conservation précaires. Le projet dans sa version initiale avait pour objectif principal l'étude de l'écologie alimentaire des vertébrés marins (mammifères et tortues) de Guyane par l'analyse des contenus stomacaux des animaux échoués sur le littoral guyanais, permettant i) de développer les connaissances sur les régimes alimentaires de ces espèces, et plus particulièrement les sotalies, tortues vertes, luths et olivâtres ; ii) de caractériser l'ingestion de déchets, et d'évaluer l'importance de ces déchets comme possible cause de mortalité, iii) de contribuer à la connaissance des sites d'alimentation.

Le contexte de la recherche sur le milieu marin est toutefois très dynamique en Guyane, et a évolué depuis la soumission du projet. L'optimisation de la synergie avec la mise en œuvre d'autres projets sur les vertébrés marins : télémétrie et loggers sur les tortues marines (CNRS / IPHC), avancement d'une thèse en cours sur le sotalie (Gépog / Réserve Naturelle du Grand Connétable), et une opportunité technique à travailler avec un laboratoire de chimie du CNRS en Guyane et la fédération de recherche C3MAG à Pointe à Pitre (Centre Commun de Caractérisation des Matériaux des Antilles et de la Guyane) de l'Université des Antilles ont suggéré de reconsidérer pour partie le sujet, en approfondissant l'aspect "contaminants", pas abordé dans les autres projets en cours de développement en Guyane.

Le sujet a été réorienté vers une analyse plus complète des contaminations par les plastiques, incluant l'analyse des macroplastiques et des microplastiques, très exigeante en matériel de laboratoire et en temps, et répondant les alarmes de travaux internationaux sur les contaminations par les plastiques [2]. Cette réorientation a été proposée et validation en comité de pilotage du REG et en groupe de travail "suivi" du Plan National d'Actions pour les Tortues marines.

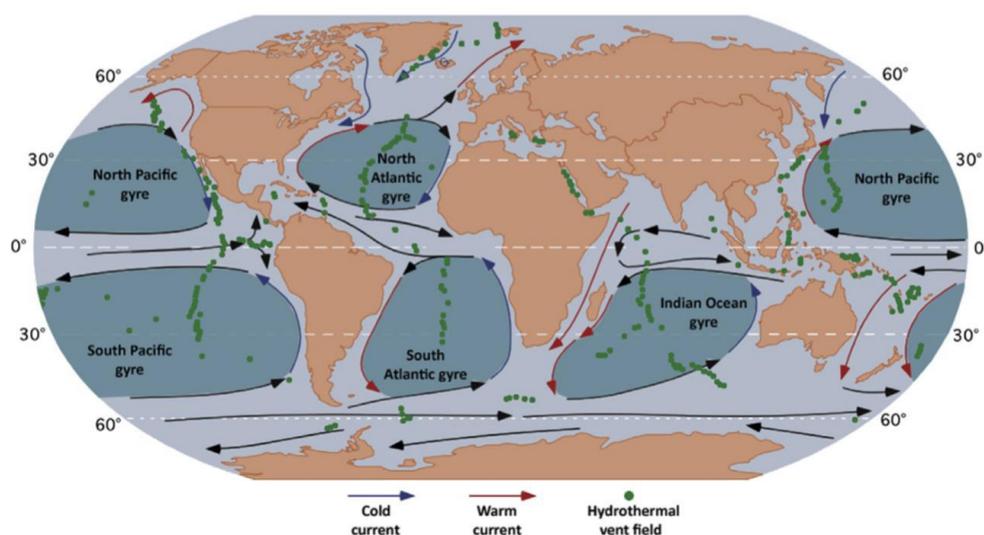
Le matériel biologique a toutefois été conditionné de manière à pouvoir être utilisé ultérieurement, et est mis à disposition d'autres programmes. Les analyses des contenus digestifs du dauphin de Guyane sont, par exemple, déjà en cours d'analyse dans le cadre d'une thèse dirigée par le porteur de projet.

## LA CONTAMINATION DE LA FAUNE MARINE PAR LES PLASTIQUES

*Les activités humaines génèrent des rejets de polluants comme les plastiques, qui peuvent persister dans le milieu naturel et s'accumuler dans la chaîne alimentaire [3, 4]. Des espèces longévives et en fin de chaîne trophique comme les tortues marines et les dauphins peuvent se révéler être de véritables bioindicateurs de l'état de contamination du milieu.*

Le plastique est composé de polymères organiques de synthèse obtenus par la polymérisation de monomères, constitués principalement d'atomes de carbone, et extraits du pétrole ou du gaz. On estime que 4,8 à 12,7 millions de tonnes de plastique sont rejetées dans l'environnement marin chaque année [5]. Environ 20 % des déchets plastiques seraient issus des activités maritimes, principalement la pêche industrielle [6], le reste des plastiques provenant des continents [7]. La majorité des plastiques retrouvés dans les océans appartient à la famille des polyoléfines : le polyéthylène et le polypropylène, deux thermoplastiques largement utilisés dans les emballages [7]. Les déchets plastiques se distinguent aussi par leur taille, macro- et microplastiques. Les particules de microplastique sont de moins de 5 mm, leur taille leur confère une grande biodisponibilité [8]. Il existe deux catégories de microplastiques, les primaires et les secondaires. Les microplastiques primaires sont directement produits sous la forme de microparticules. On en retrouve dans les produits cosmétiques, ce sont en général des microbilles. Les microplastiques secondaires résultent de la dégradation des macroplastiques, dans l'environnement, par l'action notamment du soleil et des forces mécaniques naturelles (action des vagues, radiations UV, lessivage sur les côtes), biologiques et chimiques [8].

Les plastiques et plus particulièrement les plastiques de petite taille se concentrent au centre de courants océaniques majeurs, les gyres. Ces gyres sont des systèmes de grande échelle créés par les rotations de la Terre, entraînés par les vents, et soumis à l'effet Coriolis créant des mouvements cycloniques atmosphériques et océaniques. On dénombre 11 gyres océaniques : 2 gyres subpolaires, 3 dans les eaux arctiques, le gyre circumpolaire autour de l'Antarctique et les 5 gyres subtropicaux : Atlantique Nord et Sud, Pacifique nord et Sud et Océan Indien. Une plus grande attention est portée à ces derniers car ils accumulent particulièrement les déchets flottants à la surface des eaux [7].



*Localisation des gyres dans le monde [8]*

Dans le gyre de l'Atlantique Nord, la charge de microplastiques est de plus de 5000 millions de tonnes [9]. Dans l'hémisphère sud, la densité de population côtière et le trafic maritime sont beaucoup plus bas que dans l'hémisphère nord mais les densités de plastiques rapportées sont très élevées, ce qui suggère que la pollution par les plastiques se déplace entre les zones d'agrégation et entre les hémisphères [7]. Ainsi, dans l'Atlantique Sud, la charge de microplastiques prédite est de 1300 millions de tonnes [9]. Ces chiffres ne présentent toutefois que les microplastiques de surface. De récentes études montrent une forte occurrence de ces microplastiques dans toute la colonne d'eau : 42% des microplastiques se retrouvent en fait sous la surface de l'eau [7]. Une étude réalisée en Californie a permis le constat suivant : les plus hautes concentrations se trouvaient entre 200 et 600m de profondeur, alors que les zones les plus proches de la surface (5m) et les plus profondes (1000m) possédaient les plus faibles concentrations [10]. La présence de plastique est rapportée jusque dans les profondeurs abyssales [11]. De plus, les plastiques sont également présents dans les sédiments benthiques et côtiers mais, avant de sédimenter, les microplastiques ont des effets importants sur les réseaux trophiques et les écosystèmes marins. Ils sont par exemple absorbés par des organismes filtreurs comme les larvacées géantes (*Bathochordaeus stygius*, *B. mcnutti* et *B. charon*) et les omnivores tel le crabe rouge pélagique (*Pleuroncodes planipes*), le thon, calmars, oiseaux de mer, requins, tortues de mer et mammifères marins.

Ces gyres sont donc des zones d'interactions privilégiée entre plastiques et vertébrés marins, notamment dans le cas des espèces migratrices pélagiques, comme les tortues luths [12]. Une étude réalisée sur les 7 espèces de tortues marines, dans les bassins Méditerranéen, Atlantique nord et Pacifique a montré la présence de microplastiques dans la totalité des 102 individus étudiés [13]. Les périodes de recherche de nourriture, de nidification et de migration sont des phases potentielles d'exposition aux microplastiques. Il est possible que les tortues vertes étudiées aient absorbé des particules dans ou sur les producteurs primaires et filtreurs sessiles [13]. Les microplastiques peuvent adhérer à la surface des algues se liant électrostatiquement à la cellulose, la rétention des microplastiques est facilitée par une couche de mucus à la surface de ces dernières [14]. Les éponges ingèrent des microplastiques, en même temps que les aliments consommés [15]. L'ingestion de plastiques peut donc avoir lieu à n'importe quel stade de développement. 90% des tortues vertes juvéniles étudiées au large du Brésil dans l'Atlantique Sud-Ouest et 100% des tortues étudiées sur les côtes brésiliennes avaient ingéré du plastique [16].

En revanche, les informations sur les mammifères marins sont plus rares [17, 18, 19] notamment du fait de la difficulté à accéder à du matériel biologique, aucune étude n'a été faite sur une espèce côtière comme le sotalie.

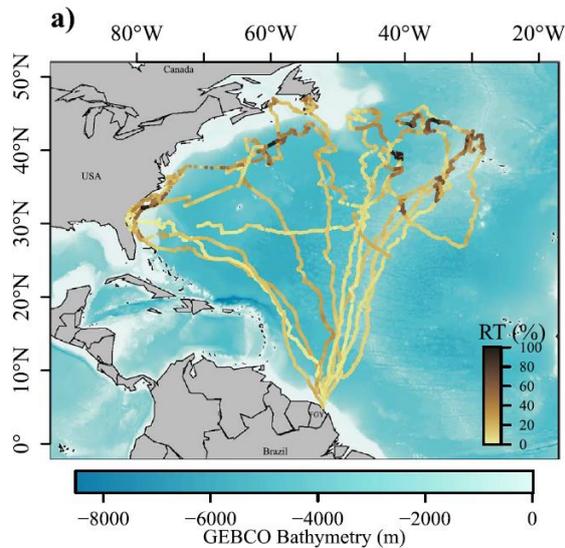
Créé en 2014, le Réseau des Echouages de Guyane [20] est une émanation régionale du Réseau National des Echouages (RNE) qui a pour objectif de (i) secourir les animaux lorsque cela est possible, (ii) d'améliorer les connaissances sur les causes de mortalité des tortues marines et des mammifères marins de Guyane et (iii) de mieux connaître la biologie des espèces. A cette fin, des échantillons sont prélevés sur des animaux échoués, selon des protocoles mis en place et validés au niveau national par le Réseau National Echouages, puis conservés à des fins exploratoires ultérieures en Guyane, à l'Institut Pasteur de la Guyane, et sous la responsabilité de l'association Kwata. L'accès à ces échantillons pour l'étude "plastiques" a été demandé selon les procédures habituelles du REG [20] : demande formalisée, passage en Comité de pilotage local, et validation par le comité de pilotage du Réseau National d'Echouages).

### A. ESPECES ETUDIEES

---

#### TORTUES LUTH (*DERMOCHELYS CORIACEA*)

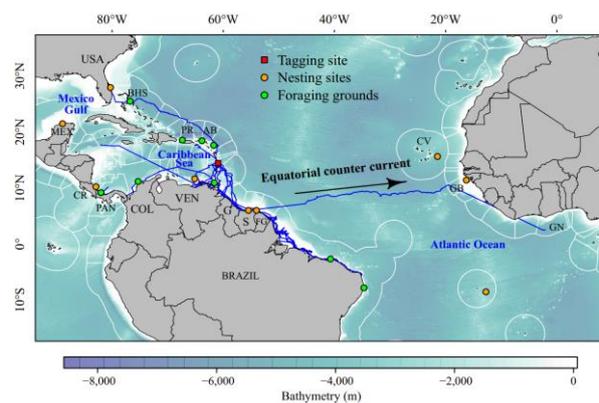
Présentes dans tous les océans, les tortues luth se rencontrent dans les zones tropicales et subtropicales aux régions subpolaires. Elles effectuent des migrations transocéaniques entre leurs sites de ponte situés sur les plages de la ceinture tropicale et leurs zones de nourrissage en eaux plus froides. En Guyane, elles restent à proximité de la côte guyanaise entre deux pontes et vont majoritairement dans l'Atlantique Nord une fois la saison des pontes terminée, en suivant le front chaud du Gulf Stream, riche en proies et utilisent notamment le gyre Nord-Atlantique pour se déplacer et ainsi économiser de l'énergie [12]. Cette trajectoire les expose aux microplastiques, cependant elles ne restent dans ce gyre que de façon transitoire et passent plus de temps au large des côtes nord-américaines pour s'alimenter. Contrairement aux autres tortues marines, elles ne possèdent pas de carapace, mais une dossière en cuir très épais qui leur donne la souplesse nécessaire pour absorber les variations de pression lorsqu'elles plongent en eaux profondes, à la recherche des méduses dont elles se nourrissent. Elles se nourrissent donc tout le long de la colonne d'eau et quasi-exclusivement de méduses, de salpes et autres organismes gélatineux et plus rarement de poissons [21].



Guyane, trajectoires de migration des tortues luth en post-ponte [12]

### TORTUES VERTES (*CHELONIA MYDAS*)

Présentes dans les eaux de plus de 20°C, les tortues vertes passent d'un régime alimentaire omnivore jusqu'à 1-2 ans (crevettes, poissons, méduses, algues, ...) à un régime majoritairement herbivore à l'âge adulte, constitué d'herbiers et d'algues. Des populations juvéniles sont importantes dans les herbiers antillais, avant une dispersion large dans l'Atlantique [1] ; en Guyane quelques juvéniles peuvent fréquenter les zones rocheuses. Après la saison de ponte, elles migrent le long des côtes brésiliennes jusqu'aux zones d'alimentation [22]. Avec des migrations plutôt côtières, les tortues vertes restent à l'écart des gyres, mais sont exposées aux pollutions côtières, à la fois aux stades juvéniles et adultes.

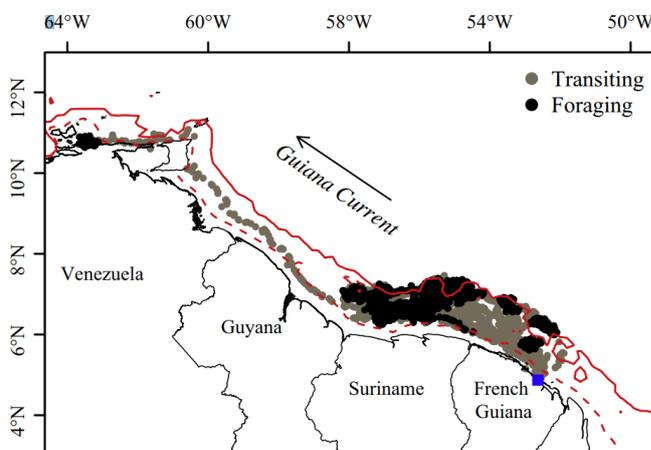


Migration des juvéniles proches de la maturité sexuelle, quittant les herbiers antillais (gauche) [1], et à droite, Guyane, migration des femelles en post-ponte [22].

---

## TORTUES OLIVÂTRES (*LEPIDOCHELYS OLIVACEA*)

Les tortues olivâtres fréquentent uniquement les mers chaudes et préfèrent les fonds rocheux et les estuaires riches en invertébrés marins. Elles sont principalement carnivores, et se nourrissent de crustacés, poissons, mollusques, bryozoaires, méduses, oursins auxquels peuvent s'ajouter des algues et herbes marines. L'étude des migrations a montré que les tortues olivâtres restaient à quelques kilomètres des côtes pendant la saison des pontes et qu'elles partaient ensuite à l'Ouest, se stabilisant au bord du plateau continental, au large des embouchures des grands fleuves : Maroni, Corentyne à la frontière entre Surinam et Guyana [23]. C'est durant cette période de stationnement au large qu'elles s'alimentent et 80% de leur temps est alors consacré à la chasse, contrairement à la période de reproduction, pendant laquelle elles jeûnent. Comme les tortues vertes, elles sont à l'écart des gyres, mais proches de côtes.



*Guyane, migration des tortues olivâtres en post-ponte [23].*

---

## SOTALIES (*SOTALIA GULANENSIS*)

Le Dauphin de Guyane ou Sotalie présente un caractère sédentaire et une haute fidélité à son site. Le Dauphin de Guyane est une espèce qui fréquente essentiellement les eaux chaudes, calmes et peu profondes des milieux estuariens et côtiers [24]. En Guyane, on les retrouve le long du littoral, des estuaires et occasionnellement sur le plateau continental jusqu'à 40 km des côtes. Les zones proches de la rivière Mahury et de Cayenne pourraient être des zones d'alimentation. Les sotalies apprécient les habitats rocheux où elles se nourrissent de poissons, céphalopodes et crustacés [24] mais pourraient également être présents dans l'estuaire pour le repos. Depuis 2013, des actions ont été mises en place en Guyane afin d'améliorer les connaissances sur l'espèce et proposer des mesures de conservation cohérentes et efficaces.

## B. MATERIEL BIOLOGIQUE

Pour la recherche des plastiques, 34 vertébrés ont été étudiés, collectés par le REG entre 2012 et 2019, et complétés par des tortues olivâtres venues pondre sur les plages et tuées par des chiens sur les plages, et dont les contenus digestifs ont pu être récupérés. 26 tractus digestifs de tortues ont été analysés : 20 intestins, 16 estomacs, 12 oesophages, 4 contenus digestifs, 4 bols alimentaires, provenant de 12 tortues olivâtres (11 femelles et 1 mâle), 13 tortues vertes (6 femelles adultes et 7 juvéniles) et 1 tortue luth (femelle adulte) ainsi que 8 estomacs de sotalies :

	<b>oesophage</b>	<b>estomac</b>	<b>intestins</b>	<b>contenu digestif</b>	<b>bol alimentaire</b>
<i>Chelonia mydas</i>	3	5	7	4	3
<i>Lepidochelys olivacea</i>	8	10	12		1
<i>Dermochelys coriacea</i>	1	1	1		
<i>Sotalia guianensis</i>		8			

### 1. MACROPLASTIQUES

La recherche se fait visuellement sur le tractus digestif. L'extérieur du tractus digestif est préalablement nettoyé à l'eau, le péritoine a été retiré du tube digestif, puis l'organe a été placé sur un plateau de dissection, placé sous poste de sécurité microbiologique dans le but d'empêcher au maximum les microplastiques en suspension dans l'air de se déposer sur les échantillons. Puis les organes ont été ouverts dans le sens de la longueur à l'aide d'un ciseau fin et d'une pince à disséquer.



*Premières étapes : extraction du tractus digestif*

La spectroscopie FTIR (Bruker Tensor FT-IR) a été utilisée pour déterminer la nature des liaisons chimiques dans une molécule. L'échantillon est soumis à un rayonnement électromagnétique, la

fréquence à laquelle est absorbé le rayonnement va dépendre de la nature de la liaison. Une base de données avec plusieurs spectres d'absorption correspondant aux liaisons chimiques de molécules pures connues a permis d'identifier la correspondance entre nos échantillons et les spectres de ces molécules de base. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été réalisée à l'aide d'un spectromètre (Brucker Tensor 27) équipé avec une lentille diamant et d'un module de réflectance totale atténuée (ATR). L'acquisition des spectres a été faite à partir de 64 scans entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  et  $400\text{ cm}^{-1}$  et à une résolution de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

---

## 2. MICROPLASTIQUES

---

### 2.1- RECUPERATION DU CONTENU DIGESTIF

Le contenu de l'organe a été récolté à l'aide d'une spatule métallique et les parois de l'organe ont fait l'objet de rinçages successifs à l'eau Milli-Q. Le contenu extrait a lui-même été rincé plusieurs fois à l'eau Milli-Q au-dessus d'un tamis à mailles d'un diamètre d'un millimètre posé sur un bécher. Pour récolter le maximum de matière et optimiser la filtration, un pilon a été utilisé pour écraser le contenu digestif ou bol alimentaire au-dessus du tamis. À la fin de la manipulation, le récipient en verre contenant la solution échantillonnée est refermé par un couvercle métallique ou couvert avec un papier aluminium pour éviter la contamination aux microplastiques.

---

### 2.2- DIGESTION ALCALINE

Les contenus des oesophages étant majoritairement chargés en algues, une digestion de cette matière organique a été utilisée pour pouvoir récupérer plus facilement de potentiels microplastiques. Au total, 64 digestions ont été réalisées. La méthode de digestion alcaline au NaOH a été choisie, car d'après plusieurs études elle présente une plus grande efficacité par rapport aux digestions acides (au HCl par exemple) et possède un coût moindre que les digestions enzymatiques [25, 26].

Plusieurs essais de digestion dans des Eppendorf (déposés dans une étuve à  $60^{\circ}\text{C}$ ) d'un morceau d'algue verte ont été effectués avec quatre concentrations différentes afin d'optimiser cette dégradation : une solution de NaOH à  $10\text{ mol.L}^{-1}$ , à  $1\text{ mol.L}^{-1}$ , à  $1\text{ mol.L}^{-1}$  avec 0,5% de SDS [26].

Afin de réduire les quantités de NaOH, les granulés sont directement mis en contact avec le tissu à digérer dans le bécher contenant la solution filtrée. Celui-ci est ensuite placé sur une plaque chauffante pendant 24h à 48h, réglée à  $70^{\circ}\text{C}$ , sous agitation continue jusqu'à obtenir un vortex dans le bécher.

---

### 2.3 - FILTRATION

A l'issue de cette étape de digestion, les solutions ont été filtrées sous vide (filtration de type Buchner) sous une sorbonne chimique. Lorsque la solution était encore chargée en matériel biologique, avec une consistance visqueuse, celle-ci était plongée dans un bain d'ultrasonication pendant 10 à 20 min [25]. Les filtrations ont été réalisées sur des filtres de nylon avec des pores de 30 $\mu$ m. Ils ont été au préalable, observés au microscope pour vérifier qu'il n'y ait pas de contamination avant utilisation. Les filtres obtenus ont été placés dans des boîtes de Pétri de façon à éviter une exposition directe à l'air ambiant.

---

### 2.4- OBSERVATION A LA LOUPE BINOCULAIRE ET AU MICROSCOPE

Les filtres ont été observés à la loupe binoculaire à un grossissement 20x pour un premier tri des microplastiques. Puis à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axio Scope A1, Zeiss) et avec différents filtres : set-409 (ex :365nm / em : 445-50nm) et, set-049 (ex :450-490nm / em : 515nm), nous avons pu repérer certaines fibres plastiques pouvant émettre une fluorescence) à l'aide d'un objectif de grossissement 5x puis 10x. Les fragments, fibres ou billes ressemblant à des microplastiques ont été photographiés à l'aide de la caméra du microscope, puis isolées sur un scotch-carbone pour être par la suite analysées au MEB (microscope électronique à balayage) et faciliter l'observation des particules à analyser avec le spectromètre Raman.

---

### 2.5 - SPECTROSCOPIE INFRAROUGE ET RAMAN

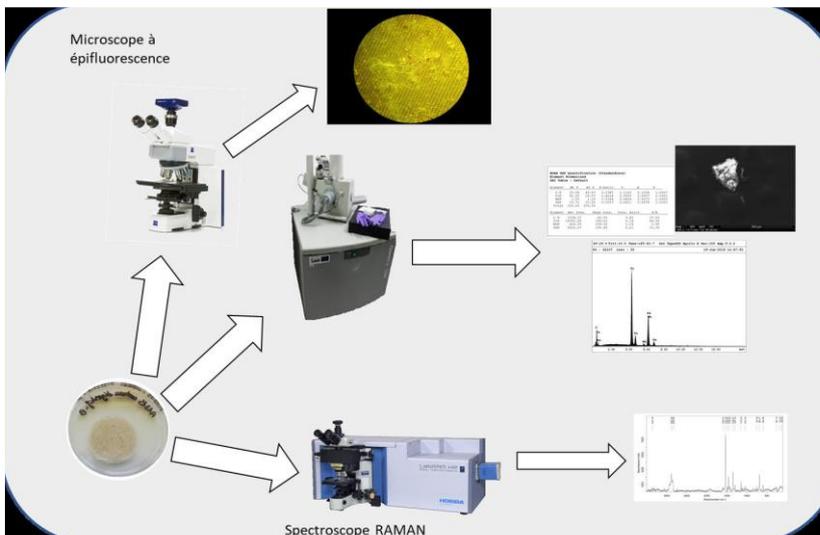
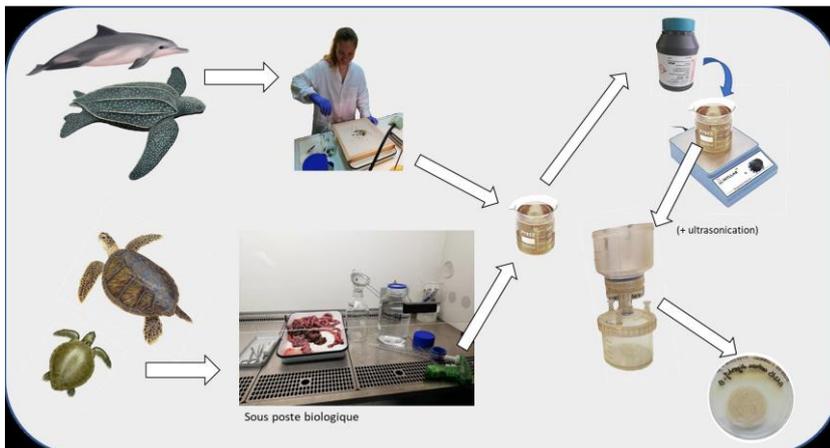
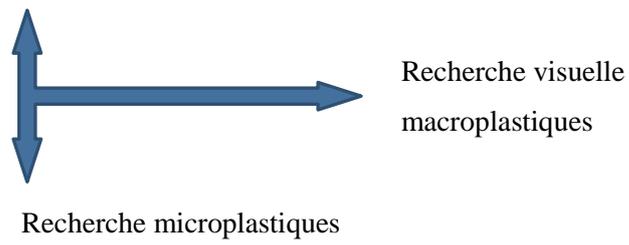
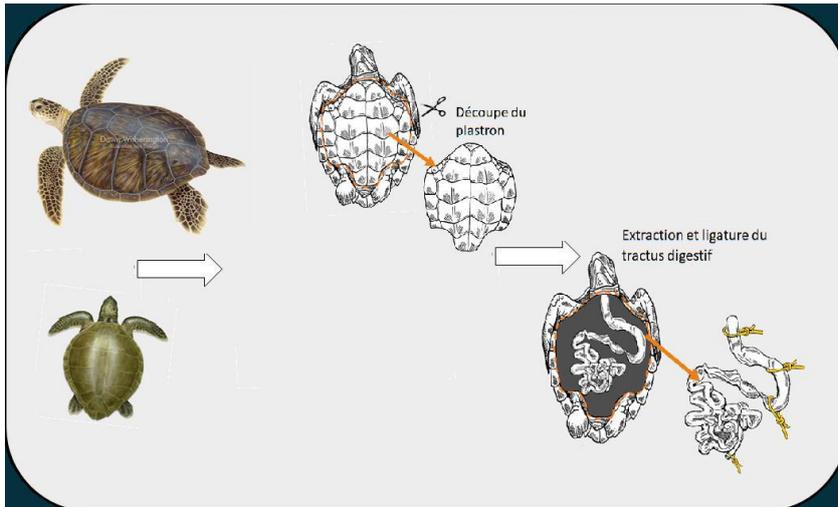
Afin de faciliter la détection d'une quelconque contamination de nos échantillons et de comparer nos échantillons analysés à des échantillons connus, une base de données a été constituée avec notamment les spectres infrarouges (IR) des gants en nitrile, blouse en coton, bouchons bleus en polypropylène des récipients Schott utilisés pour stocker les solutions de contenu digestifs filtrés, des fils de pêche, les Ziploc® utilisés pour stocker les organes et des sacs poubelle en polyéthylène, etc. La spectroscopie IRTF) a été réalisée à l'aide d'un spectromètre, l'acquisition des spectres a été faite également partir de 64 scans entre 4000 cm<sup>-1</sup> et 400 cm<sup>-1</sup> et à une résolution de 4 cm<sup>-1</sup>. Cependant, les plastiques supposés retrouvés sur les filtres examinés précédemment à la binoculaire et au microscope mesuraient entre 30 $\mu$ m et 1mm, rendant la manipulation de ces derniers très complexe même avec une loupe pour regarder la particule à déposer sur la cellule de détection. Il a donc été décidé d'utiliser un microscope couplé à un Raman qui permet de détecter les particules à partir de 1-2  $\mu$ m de diamètre (Schäfer, 2015). Le spectromètre Raman du C3MAG (LabRAM HR Evolution, HORIBA-Jobin-Yvon) a été utilisé.

Les différentes particules ont d'abord été repérées sur le scotch carbone à l'aide de l'objectif 10x puis l'acquisition a été réalisée avec l'objectif 50x. Le laser utilisé avait une longueur d'onde de 514 et une puissance de 10mW. Les acquisitions ont été réalisées sur 30s pour une résolution allant de 100 cm<sup>-1</sup> à 3500 cm<sup>-1</sup>. Le réseau utilisé est un 1800 traits/mm. Afin d'obtenir des spectres de qualité, il a fallu parfois, diminuer l'intensité du laser (avec un filtre), ajuster la focalisation du microscope et augmenter le temps d'acquisition (jusqu'à 2min). Enfin, en présence de phénomène de fluorescence, les lignes de base d'intensité élevée (dus à la fluorescence) dans le spectre ont été corrigés à l'aide d'une ligne de base polynomiale.

---

## 2.6- MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)

Pour une analyse plus complète, les particules isolées sur des scotch-carbone ont subi une analyse EDX à l'aide d'un MEB Environnemental FEI QUANTA 250. Une microanalyse chimique élémentaire de la surface des échantillons par la méthode EDX (Dispersion d'Énergie par rayon X) nous a permis de déterminer la composition chimique de la surface examinée. Cette méthode consiste à analyser les rayons X générés par un échantillon placé sous le faisceau d'électrons du microscope électronique à balayage (MEB). Le rayonnement émis lors de l'interaction entre les rayons X et la matière de l'échantillon est retranscrit sous forme de spectre, où apparaissent des pics d'intensité variable, caractéristiques des éléments présents.



## RESULTATS

### A. MACROPLASTIQUES

Sur les 34 vertébrés étudiés, une présence de macroplastiques a été détectée chez 4 tortues vertes juvéniles.



	Microplastiques		Macroplastiques <sup>3</sup>	
	Proportion de vertébrés contaminés	Pourcentage associé	Proportion de vertébrés contaminés	Pourcentage associé
<b>Polypropylène</b>	5/13	38,5%	3/4	75%
<b>Polyéthylène</b>	4/13	30,8%	4/4	100%
<b>PET</b>	2/13	15,4%	3/4	75%
<b>Polystyrène</b>	1/13	7,7%	2/4	50%
<b>Nylon</b>	1/13	7,7%	0	
<b>Acrylate</b>	1/13	7,7%	0	
<b>Polycarboné-polyoléfine</b>	4/13	30,8%	0	

Les plastiques les plus présents sont les polyéthylène, retrouvés chez les 4 individus. Ces plastiques sont notamment dans les produits souples : sacs, sachets, fils et cordes de pêche.

### B. MICROPLASTIQUES

La présence de microplastiques a été détectée sur 13 échantillons, dont 2 sotalies (sur 8 sotalies étudiées), 6 tortues olivâtres (sur 12), 4 tortues vertes (sur 13) et la seule tortue luth étudiée.

Les microplastiques identifiés appartiennent à 6 classes de plastiques distinctes et fréquemment utilisés dans l'industrie, les emballages et le matériel de pêche, ainsi qu'un large panel d'autres applications. Il s'agit du polyéthylène, du polypropylène, du polyéthylène téréphtalate (ou PET), du polystyrène, du nylon, de l'acrylate et enfin certaines fibres dont le spectre n'a pas permis une identification précise mais qui couplé à une analyse EDX a permis la confirmation de la nature plastique de type "polycarbonés

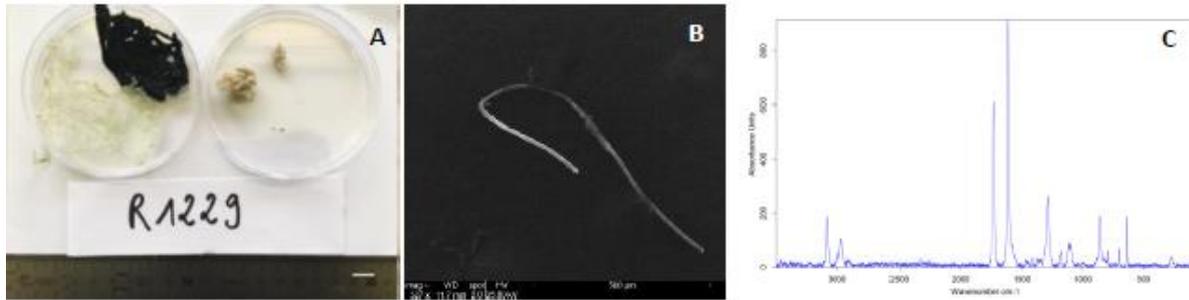
– polyoléfines" (les polyoléfines regroupent les polypropylènes et polyéthylènes). La famille des polyoléfines (polyéthylène et polypropylène) est majoritairement représentée dans les échantillons ce sont également les plus répandus au niveau mondial [8].

Seulement deux sotalies ont été retrouvés positifs, chez le premier, un fragment de polyéthylène a été identifié, et chez le seconde un fragment de polypropylène.

Sur les 26 tortues examinées, 11 ont été retrouvées positives aux microplastiques. Entre 2018 et 2019, 4 tortues vertes juvéniles (R1229, R1247, R1361 et R1366) ont été retrouvées en présence de macroplastiques : fils de pêche, morceaux de sacs poubelle, paille à usage unique. Cela pouvait laisser penser qu'elles seraient prioritairement concernées par une présence de microplastiques. Pourtant, pour les tortues R1361 et R1366 aucune fibre, ni fragment n'ont été détectés lors de l'examen visuel à la loupe binoculaire ou au microscope.

Plusieurs hypothèses sont envisageables, soit les macroplastiques ont un temps de résidence de courte durée dans le tractus digestif de la tortue, impliquant qu'ils n'aient pas eu le temps de se dégrader en particules de taille inférieure, soit les particules étaient de taille trop petite pour être détectées, sachant que les filtrations dans cette étude ont été réalisées avec des filtres constitués de pores de 30 $\mu$ m, pouvant donc laisser passer des particules de taille inférieure. Une troisième hypothèse est que généralement, les tortues vertes nécropsiées, avaient souvent des intestins et estomacs particulièrement chargés en contenu alimentaire (majorité d'algues) peu ou pas digéré. Or, la récupération des microplastiques parmi la matière organique ne peut être exhaustive lors de l'étape de filtration du contenu digestif, et un sous-échantillon a été utilisé, ainsi il est possible que quelques microplastiques nous aient échappé par ce biais.

Pour la tortue R1247, une fibre bleue, ayant des allures de fibre plastique (régulière, aucune structure faisant penser à du matériel biologique) a été retrouvée mais cette dernière n'a pas pu être identifiée du fait de son état trop dégradé. Ainsi, la détermination de microplastique n'a pu se faire que pour la tortue R1229, dans laquelle on a retrouvé une fibre de Polyéthylène téréphtalate (PET), un des macrodéchets retrouvé dans cette même tortue.



Photographie des macroplastiques retrouvés dans la tortue R1229 (A), image obtenue au MEB de la fibre microplastique de PET retrouvée dans l'intestin de la tortue R1229 (B), spectre Raman associé à cette même fibre (C)

On observe une plus grande représentation du polypropylène et polyéthylène, chez les 3 espèces de tortues :

Nature des microplastiques identifiés							
	Tortues olivâtres		Tortues vertes		Tortue luth	[Total d'individus contaminés (3 espèces confondues)]	
	Proportion d'individus contaminés	Pourcentage associé	Proportion d'individus contaminés	Pourcentage associé		Proportion d'individus contaminés	Pourcentage associé
<b>Polypropylène</b>	2/6	33%	1/4	25%	1/1	4/11	36,4%
<b>Polyéthylène</b>	2/6	33%	1/4	25%		3/11	27,3%
<b>PET</b>			2/4	50%		2/11	18,2%
<b>Polystyrène</b>			1/4	25%		1/11	9,1%
<b>Nylon</b>			1/4	25%		1/11	9,1%
<b>Acrylate</b>			1/4	25%		1/11	9,1%
<b>Polycarboné-polyoléfine</b>	3/6	50%			1/1	4/11	36,4%

Pour les dauphins de Guyane, seul l'estomac était disponible, ainsi c'est le seul organe dans lequel on a retrouvé des microplastiques. Pour le premier sotalie (M2303), un fragment de polyéthylène a été identifié et pour le second, un fragment de polypropylène.

Pour les 3 espèces de tortues, même si *Dermochelys coriacea* (tortue luth) est très mal représentée, c'est dans l'intestin que la quasi-totalité des microplastiques identifiés a été retrouvée. Chez les deux autres espèces, la contamination se concentre principalement dans l'intestin. Cela s'explique notamment par le fait que le temps de transit du bol alimentaire dans l'œsophage est très court, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes, alors que dans l'estomac et dans l'intestin, le contenu digéré y réside plusieurs heures. Tout particulièrement dans l'intestin, présentant de grandes surfaces de contact du fait des nombreux replis et villosités présents.

Organes contaminés par les microplastiques							
	Tortues olivâtres		Tortues vertes		Tortues luth	Total d'individus contaminés (3 espèces confondues)	
	Proportion d'individus contaminés	Pourcentage associé	Proportion d'individus contaminés	Pourcentage associé		Proportion d'individus contaminés	Pourcentage associé
Intestin	5/6	83,4%	3/4	75%	1/1	9/11	81,8%
Estomac	1/6	16,7%				1/11	9,1%
Œsophage	1/6	16,7%			1/1	2/11	18,2%
Contenu digestif			1/4	25%		1/11	9,1%
Bol alimentaire			1/4	25%		1/11	9,1%

Les tortues olivâtres sont carnivores, tandis que les tortues vertes sont omnivores au stade juvénile (la majorité des tortues vertes examinée étaient des juvéniles : 8 sur les 13 nécropsiées), ce qui aurait laissé penser que les tortues vertes étaient plus concernées par la pollution par des microplastiques. En effet, elles adoptent un comportement de "brouillage" des herbiers qui leur est propre, or les algues semblent fixer les microplastiques [14]. Ce n'est pourtant pas ce qui est observé ici, avec 6 tortues olivâtres contaminées sur les 12 étudiées et 4 tortues vertes sur les 13, et des différences de contamination entre les organes étudiés pour les 2 espèces non significatives (83,4% contre 75% pour l'intestin et 16,7% contre 25% pour estomac-œsophage).

### C. AUTRES PARTICULES RETROUVEES DANS LES ECHANTILLONS

A l'issue de certaines digestions, comme celles issues de 3 sotalies, de 3 tortues olivâtres, de 5 tortues vertes et de la tortue luth, des particules métalliques ont été retrouvées. Après une analyse EDX au MEB de la composition de ces dernières, leur nature a pu être déterminée : oxydes de fer ou oxydes de fer et titane. On retrouve des oxydes de fer notamment dans l'illite et la chlorite représentant respectivement 37% et 16% de la composition des vases sur les côtes guyanaises [27], présentes principalement jusqu'à la limite entre plateau et talus continentaux à 130 km des côtes [24].

Le comportement alimentaire des tortues luths et olivâtres en période de ponte (période de leur présence au large des côtes de Guyane) n'est pas connu, et ces deux espèces ne sont pas considérées comme des espèces cherchant de la nourriture sur les fonds marins. Elles doivent se contaminer via leurs proies. Quant aux tortues vertes, en partie herbivores, une absorption des sédiments semble possible lors du brouillage des herbiers. Une recherche dans les estomacs de poissons marins (étude IFREMER en cours) : *Sciades proops* (Machoiran blanc), *Cynoscion virescens* (Acoupa aiguille ou Acoupa cambucu) et *Apistor quadriscutis* (poisson-chat marin), espèces potentiellement prédatés par les sotalies, n'a pas permis de détecter ces particules. L'absorption se fait sans doute par d'autres proies. Une recherche

pourrait être notamment faite dans les crevettes, se nourrissant elles sur les bancs de vase. Etant données les fortes quantités trouvées dans les estomacs, l'absorption directe par l'eau de mer contaminée paraît improbable.

## IMPACT DES CONTAMINATIONS SUR LES VERTEBRES

La pollution aux microplastiques ne semble pas propre à un type de régime alimentaire particulier, herbivores comme carnivores sont touchés. L'impact des macroplastiques est avant tout mécanique, entraînant des obstructions intestinales mortelles, comme notées chez une jeune tortue verte. Les impacts de microplastiques sont encore hypothétiques, L'ingestion de plastique par les tortues marines peut causer de graves dommages au niveau du système digestif et obstruer le tractus intestinal, réduire le stimulus alimentaire et la capacité gastrique, ce qui pourrait conduire à la longue à la malnutrition, entraînant leur mort. Les grandes quantités de plastiques accumulés dans leur intestin peuvent altérer le comportement de nage et le contrôle de la flottabilité, influençant négativement l'activité prédatrice, la capacité d'éviter les prédateurs *etc.* En outre, des effets négatifs tels que la réduction des taux de croissance, de fécondité et de la fertilité ont été observés, ce qui indique que les microplastiques menacent la stabilité et la viabilité des populations de tortues marines [28, 29]. L'ingestion de plastique peut avoir une incidence sur l'état de santé des tortues, altérant la fonction du système immunitaire, ce qui accroît la vulnérabilité à des maladies telles que la fibropapillomatose [29, 30]. La fibropapillomatose semble en expansion chez les tortues vertes juvéniles trouvées échouées, touchant dorénavant quasiment tous les individus, alors que leur présence était très occasionnelle il y a 20 ans.

## COMMUNICATION AUTOUR DU PROJET

La communication autour du projet n'a pas pu faire complètement sur la durée de la convention, les résultats définitifs ayant même été acquis postérieurement à la clôture de la convention. A la suite du volet "macroplastiques", un poster sur les principaux résultats a été présenté aux Green Days, et lors du colloque annuel du Groupe Tortues Marines France.

Les résultats macro- et microplastiques ont été présentés dans les comités de pilotage et groupes de travail du REG et du Plan National d'Action "Tortues Marines"

Le projet a été présenté lors de la Journées des Océans 2018, et lors d'un "café des Sciences Junior", en juin 2019. Il sera présenté à la Fête de la Science 2019. Une publication sur les résultats est en cours.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Chambault P, de Thoisy B, Huguin M, Martin J, Bonola, M., Etienne D, ... Chevallier D. 2018. Connecting paths between juvenile and adult habitats in the Atlantic green turtle using genetics and satellite tracking. *Ecology and Evolution* DOI: 10.1002/ece3.4708
2. Chatterjee S, Sharma S. 2019. Microplastics in our oceans and marine health. *Field Actions Science Reports. The journal of field actions* 19: 54-61.
3. Diepens NJ, Koelmans AA. 2018. Accumulation of plastic debris and associated contaminants in aquatic food webs. *Environmental Science & Technology* 52: 8510-8520.
4. Nelms SE, Galloway TS, Godley BJ, Jarvis DS, Lindeque PK. 2018. Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environmental Pollution* 238 : 999-1007.
5. Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A., ... Law KL. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347: 768-771.
6. Andrady AL. 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 62: 1596-1605.

7. Eriksen M, Thiel, M, Lebreton L. 2019. Nature of plastic marine pollution in the Subtropical Gyres. Dans H. Takada & H. K. Karapanagioti (Eds.), *Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment* (p. 135-162). Cham : Springer International Publishing.
8. Crawford CB, Quinn B. 2017. *Microplastic Pollutants* (Elsevier). 267 pp
9. Eriksen M, Lebreton, LCM, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, Borerro JC, ... Reisser J. 2014. Plastic Pollution in the World's Oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLOS ONE*, 9 e111913.
10. Choy CA, Robison BH, Gagne TO, Erwin B, Firl E, Halden RU, ... Van Houtan K. 2019. The vertical distribution and biological transport of marine microplastics across the epipelagic and mesopelagic water column. *Scientific Reports*, 9 doi:10.1038/s41598-019-44117-2.
11. Chiba, Sanae, et al. 2018. Human footprint in the abyss : 30 year records of deep-sea plastic debris. *Marine Policy* 96 : 204-212.
12. Chambault P, Roquet F, Benhamou S, de Thoisy B, Baudena A, d'Ovidio F, Brucker M, Bonola M, Dos Reis V, Le Maho Y, Chevallier D. 2017. Oceanic fronts: a key feature in the habitat selection of the Atlantic leatherback turtle? *Deep-Sea Research Part 1* 123: 35-47.
13. Duncan EM, Broderick AC, Fuller WJ, Galloway TS, Godfrey MH, Hamann M, Godley BJ. 2018. Microplastic ingestion ubiquitous in marine turtles. *Global Change Biology*, 25 : 744-752
14. Gutow L, Eckerlebe A, Giménez L, Saborowski R. 2016. Experimental evaluation of Seaweeds as a vector for microplastics into Marine Food Webs. *Environmental Science & Technology* 50 : 915-923.
15. Baird CA. 2016. Measuring the effects of microplastics on sponges. Consulté sur : <http://researcharchive.vuw.ac.nz/handle/10063/6749>
16. Wilcox C, Puckridge M, Schuyler QA, Townsend K, Hardesty BD. 2018. A quantitative analysis linking sea turtle mortality and plastic debris ingestion. *Scientific Reports*, 8.
17. Denuncio P, Bastida R, Dassis M, Giardino G, Gerpe M, Rodríguez D. 2011. Plastic ingestion in Franciscana dolphins, *Pontoporia blainvillei* (Gervais and d'Orbigny, 1844), from Argentina. *Marine Pollution Bulletin* 62 : 1836-1841.
18. Di Benedetto APM, Ramos, RMA. 2014. Marine debris ingestion by coastal dolphins: what drives differences between sympatric species? *Marine pollution bulletin*, 83: 298-301.

19. De Meirelles ACO, do Rego Barros HMD. 2007. Plastic debris 20 : 127-131.
20. De Thoisy B, Dos Reis V. 2019. Bilan 2018 - Réseau des échouages de Guyane.
21. Bjorndal K. 1997. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. *The Biology of Sea Turtles*.
22. Baudouin M, de Thoisy B, Chambault P, Berzins R, Entraygues M, Kelle L, Turny A, Le Maho Y, Chevallier D. 2015. Identification of key marine areas for conservation based on satellite tracking of post-nesting migrating green turtles (*Chelonia mydas*). *Biological Conservation* 184: 36-41
23. Chambault P, Giraudou L, de Thoisy B, Bonola M, Kelle L, Dos Reis V, Blanchard F, Le Maho Y, Chevallier D. 2017. Habitat use and diving behaviour of gravid olive ridley sea turtles under riverine conditions in French Guiana. *Journal of Marine Systems* 165: 115-123.
24. Savouré-Soubelet, A, Aulagnier S, Haffner P, Moutou F, Van Canneyt O, Charrassin JB, Ridoux V. 2016. *Atlas des mammifères sauvages de France* (Publications scientifiques du MUSÉUM; IRD, Marseille, vol. 1 : Mammifères marins). Muséum national d'Histoire naturelle, Paris ; IRD, Marseille.
25. Cole M, Webb H, Lindeque PK, Fileman ES, Halsband, C, Galloway TS. 2014. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms | Scientific Reports.
26. Herrera A, Garrido-Amador P, Martínez I, Samper MD, López-Martínez J, Gómez M, Packard TT. 2018. Novel methodology to isolate microplastics from vegetal-rich samples. *Marine Pollution Bulletin* 129: 61-69.
27. Lampert L. 2012. Actualisation de connaissances du domaine marin en Guyane française. *IFREMER*, 51.
28. Caron A., Thomas CR, Brodie JE, Motti CA. 2016. Extraction and identification of microplastics from sea turtles: method development and preliminary results. (TropWATER Report No. 15/52), 33.
29. Nelms SE, Duncan EM, Broderick AC, Galloway TS, Godfrey MH, Hamann, M., ... Godley, BJ. 2016. Plastic and marine turtles: a review and call for research. *ICES Journal of Marine Science*, 73: 165-181.
30. Guzzetti E, Sureda A, Tejada S, Faggio C. 2018. Microplastic in marine organism: Environmental and toxicological effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 64: 164-171.

- Poster présentant les résultats "macroplastiques"
- Rapport de Master 1 de Mme Emonnot, sur les microplastiques
- Rapport de mission en Guadeloupe de Mme Emonnot, pour l'utilisation du RAMAN