

**Fiche projet Accord Cadre
ZABR – Agence de l'eau**

2022-n° - PLASTIOMBL - UMR CARRETEL

INTITULE DU PROJET : Effets de l'exposition précoce à un toxique issu de particules d'usure de pneu couplée à une hausse de température durant les premiers stades de vie d'un poisson lacustre patrimonial sténotherme froid, l'omble chevalier

Responsable scientifique du projet :

- **Nom : Réalis**
- **Prénom : Emilie**
- **Organisme du contact : INRAE Thonon-les-bains - UMR CARRETEL**
- **Fonction : Ingénieure de Recherche**
- **Courriel : emilie.realis@inrae.fr**
- **Téléphone : 06 15 47 42 35**

EQUIPES DE RECHERCHES ZABR CONCERNEES et CONTACT SCIENTIFIQUE DE L'EQUIPE

(Équipe membre ou associée de la ZABR)

CARRETEL UMR INRAE-USMB (Thonon-les-bains) - Emilie REALIS

EDYTEM UMR CNRS-USMB (Le Bourget du Lac) – Emmanuel NAFFRECHOUX

AUTRES PARTENAIRES

- Recherche :
- Institutionnel :

THEMATIQUE NATURE ET OPERATION *(ne rien compléter)*

- Thématique : Etude recherche et réseau de suivi
- Nature du projet : Etude générale et recherche
- Type d'opération : Recherche et innovation
- **Intitulé de l'opération :**

LOCALISATION DU PROJET : *(se remplit automatiquement -Ne rien remplir)*

- **Commune principale et numéro INSEE :** à compléter
- **Sous bassin versant**
- **Nom du cours d'eau**
- Contrat (si intégré dans un contrat de rivière, un SAGE ou un autre contrat avec l'agence de l'eau)

RESUME DU PROJET GLOBAL (3 000 mots espaces compris)

- **Résumé :**

Les grands lacs péri-alpins rendent de nombreux services écosystémiques et représentent un enjeu sociétal et économique majeur. Ces lacs sont fortement soumis aux pressions anthropique et climatique. Une contamination en particules de plastique affecte ces écosystèmes aquatiques : par exemple dans le Léman, entre 33000 et 220000 particules/km², dont 60 % provenant de l'usure des pneumatiques (TWP : *tire wear particles*). La connaissance des impacts de ces TWP sur la biocénose reste encore parcellaire, en particulier sur les poissons, pourtant au centre de circuits économiques importants et emblématiques de nos écosystèmes. L'amélioration des connaissances des effets de ces particules sur les poissons, en particulier sur les premiers stades de vie, les plus sensibles aux facteurs de forçage, est une question scientifique et sociétale d'importance.

L'omble chevalier apparaît comme un bon modèle notamment en raison de sa période de développement embryonnaire long dans les sédiments, site de piégeage de ces TWP. Ce poisson servira de modèle pour analyser les impacts des TWP et les mécanismes toxiques de leurs constituants, qui pourraient être ainsi extrapolables à d'autres espèces piscicoles et d'autres écosystèmes aquatiques. Pour cela, des œufs d'omble chevalier seront soumis à différents niveaux de contamination en toxique issu de particules d'usure de pneus, couplés à une faible variation de température. En vue d'une détection ultérieure de l'exposition « environnementale » des espèces piscicoles aux particules de pneus, nous testerons le styrène (monomère du constituant principal du caoutchouc synthétique de la gomme du pneumatique) comme proxy de la présence de ces particules dans les sédiments. Pour le composé toxique testé, la molécule N-(1,3-diméthylbutyl)-N'-phényl-p-phénylènediamine-quinone ou 6PPD-quinone (6PPD-Q), récemment reportée dans un article d'une revue scientifique de haut rang (Tian et al., 2020), sera ciblée. Elle est issue de la dégradation de l'additif principalement utilisé comme « anti-ozone » de la gomme des pneus, et a été identifiée comme très toxique pour certains salmonidés.

Ce projet vise donc à produire des connaissances et un seuil de toxicité des effets de la contamination à la 6PPD-Q durant premiers stades de vie de l'Omble Chevalier dans un contexte de réchauffement climatique. Afin de pouvoir ultérieurement relier les effets observés in vitro aux effets observés in situ, le projet doit permettre également i) le développement d'un protocole d'analyse de la molécule 6PPD-quinone dans les tissus animaux à partir du protocole publié du dosage de cette molécule dans les matrices aqueuses, ii) un dosage de l'efficacité de rétention de cette molécule via des bassins de rétention d'eaux de ruissellement, iii) la mise au point d'un protocole innovant de traçage des particules de pneus à partir du dosage du styrène, monomère du caoutchouc synthétique du pneu (SBR pour *styrene-butadiene rubber*).

ENCART 2022-23- plastiobl - EQUIPE 1 : CARTEL (UMR INRAE- USMB) Emilie Réalis (500 mots)

- Tâches de l'équipe : conceptualisation, réalisation (exposition in-vitro et volet toxicologique) et valorisation, en raison de ses compétences en écologie du stress, écologie, dynamique piscicole, installation expérimentale. Le temps imparti sera 75% pour Emilie Réalis porteur du projet-IR, 15 % pour Jean Guillard-IR HDR, 15% pour Allan Raffard-CR, 25% pour Laurent Espinat-TECH et 100% pour XY (stagiaire M2)

ENCART 2022-23- plastiobl - EQUIPE 2 : EDYTEM (UMR CNRS – USMB) Emmanuel Naffrechoux

- Tâches de l'équipe : conceptualisation du projet, sa réalisation (développements analytiques pour styrène et 6PPD-Q) et sa valorisation en raison de ses compétences en chimie analytique et écodynamique des polluants organiques. Le temps imparti sera 10% pour Emmanuel Naffrechoux Pr HDR, 10% pour David Gateuille MCF, 10% pour Piot Christine MCF, 5% pour Cottin Nathalie IGE

CONTEXTE SCIENTIFIQUE (3 000 caractères espaces compris)

- **Contexte général**

Les lacs péri-alpins tiennent une place particulière en raison de leur réserve en eau douce, et des nombreux services écosystémiques rendus. Néanmoins, ces derniers constituent également une zone importante de stockage des micro-plastiques, dont la majorité serait des résidus de pneus dus à un intense trafic routier. L'étude de Faure et De Alencastro (2014) a mis en évidence une forte contamination du lac Léman aux micro-plastiques dont 60% sont des TWP pour *tire wear particles*. La connaissance des impacts de ces micro-plastiques sur la biocénose reste encore parcellaire, en particulier sur les poissons (Cunningham et al., 2020). Malgré que ces particules de plastique adsorbent de multiples polluants et sont colonisées par un biofilm potentiellement pathogène (sortie de STEP par exemple), les particules issues de l'usure des pneumatiques sont la cible visée dans ce projet. Quelques études ont porté sur les produits issus de la dégradation de la gomme des pneus et de ses additifs, dont beaucoup sont toxiques pour les poissons (Kayhanian et al., 2008). En effet, les 2/3 des TWP et autres débris déposés sur la route peuvent ruisseler avec la pluie. La molécule 6PPD-quinone (6PPD-Q), dont la source principale dans les milieux aquatiques provient de la lixiviation des particules de pneus (Halle et al., 2021), est connue pour sa forte toxicité pour les organismes piscicoles et sa présence en quantité non négligeable (jusqu'au µg/L) dans l'eau de ruissellement de chaussée (Rauert et al., 2022). Elle a récemment été identifiée comme responsable du « syndrome de mortalité par ruissellement urbain » chez le saumon coho (Brinkmann et al., 2022). Le mode d'action précis de la 6PPD-Q est toutefois encore inconnu (Varshney et al., 2022), même s'il semble être lié à une perturbation de la barrière hémato-

encéphalique (Blair et al., 2021). Les effets de la 6 PPD-Q sur les premiers stades de vie de ces salmonidés sont encore indéterminés à notre connaissance.

A ce titre, nous nous proposons d'explorer les effets de cette molécule sur l'omble chevalier, bon candidat pour ce projet car modèle au temps de vie embryo-larvaire long (4-5 mois), connu et maîtrisé par le laboratoire CARRTEL. Cette espèce servirait de modèle pour analyser les impacts de la pollution aux particules d'usure de pneus et les mécanismes toxiques associés ; les résultats obtenus pourraient être généralisables à d'autres salmonidés.

- **Contexte ZABR :**

- **Thématique ZABR :**

Flux polluants, Ecotoxicologie, Ecosystèmes 3.2 Quels sont les enjeux de santé-environnement ? Préciser leur présence et leurs effets sur les écosystèmes aquatiques

Changement climatique et Ressources : 1.1 Quelles incidences du changement climatique ? Evaluer l'impact du changement climatique sur les écosystèmes et la biodiversité

- **Site Atelier ou Observatoire ZABR :**

Observatoire des LAcS : OLA

- **Besoin de connaissance Agence de l'eau :**

1. Les risques environnementaux et la vulnérabilité des milieux

FINALITE ET ATTENDUS OPERATIONNELS (3 000 caractères espaces compris)

- **Objectifs scientifiques**

Le projet apportera des connaissances de l'effet de la contamination aux particules de pneus sur les organismes piscicoles, à partir de l'étude in-vitro des effets d'un sous-produit d'oxydation de la gomme des pneumatiques. Cette molécule a été récemment reportée dans un article scientifique de haut rang (Tian et al., Science, 2020) : la 6PPD-Q. L'une des hypothèses à la forte sensibilité des salmonidés à la molécule 6PPD-Q est la température : les effets seront donc déterminés à deux températures d'eau, fixées en accord avec un scénario de réchauffement climatique du GIEC. L'observation multiparamétrique permettra de déterminer un bio-indicateur de ce toxique ainsi qu'un seuil de toxicité pour les premiers stades de vie. Afin de pouvoir ultérieurement relier les effets observés in situ aux effets observés in vitro, trois actions seront également conduites : i) développer un protocole d'analyse de la molécule 6PPD-Q dans les tissus animaux à partir du protocole publié de dosage dans les matrices aqueuses, ii) évaluation de l'efficacité de piégeage de la 6PPDQ dans un bassin de rétention des eaux de ruissellement de chaussée, iii) mettre au point un protocole innovant de traçage des particules de pneus à partir du dosage du styrène, monomère du caoutchouc synthétique styrène-butadiène, dans le sédiment.

- **Attendus opérationnels**

- 1- La mise au point d'un proxy de la présence de particules d'usure de pneus dans les sédiments par l'analyse quantitative du styrène qui pourra être transposable dans des écosystèmes aquatiques réels (sédiments littoraux lacustres ou sédiments de milieux lotiques). La comparaison de la concentration de styrène à la quantité de particules de pneus, déterminée en microscopie après tri densimétrique des particules permettra de définir une table de correspondance.
- 2- Evaluation de l'efficacité de piégeage de la 6PPDQ dans un bassin de rétention d'eaux de ruissellement de chaussée (par exemple en rive Est du Lac du Bourget le long de la RD1201).
- 3- La mise au point d'un protocole d'analyse quantitative de la 6PPD-Q dans la chair des organismes piscicoles afin de prédire son potentiel de bioaccumulation (BAF). Il n'existe en effet pas, à notre connaissance, de publication disponible sur le dosage de la 6PPD-Q dans la chair de poissons, ni de lien entre la concentration dans l'eau et les tissus des espèces piscicoles ou le sédiment.

- 4- La réponse de l'omble-chevalier à l'exposition à la 6PPD-Q, à doses environnementales, pour deux températures d'eau. Un bio-indicateur de la contamination ainsi qu'un seuil toxique sur les premiers stades de vie seront déterminés. Ces deux indicateurs permettraient un diagnostic de contamination transposable à d'autres milieux aquatiques et espèces de salmonidés.

DESCRIPTIF DETAILLE : (4 000 caractères espaces compris)

Douze (12) lots d'œufs issus de géniteurs d'ombles chevaliers seront regroupés afin de minimiser l'effet parental. Ce lot d'œufs sera alors divisé en deux, pour être incubés chacun à une température spécifique : 5 °C (température de référence) et 8,5 °C (température en limite de la tolérance thermique des embryons d'omble chevalier).

Une part de ces œufs seront ensuite répartis en quatre conditions de contamination par la 6 PPD-Q via la phase aqueuse, selon les valeurs publiées dans les eaux de ruissellement (Rauert et al., 2022) : (témoin) 0 ng/L, (seuil bas) 300 ng/L, (seuil modéré) 600 ng/L et (seuil haut) 900 ng/L.

Parallèlement, l'autre part de ces œufs sera incubée dans du sédiment enrichi en particules de gomme de pneumatiques usagés (choisis parmi les plus vendus en France) afin de suivre le dosage du styrène (proxy de la contamination aux particules) et de déterminer la concentration en 6PPD-Q dans l'eau et les matrices biologiques. Deux conditions de contamination seront utilisées aux deux températures (5°C et 8,5°C) : 0 particule (témoin) et 10³ particules/cm² (seuil environnemental Léman selon Faure et De Alencastro, 2014).

Les individus issus de ces expérimentations seront conservés jusqu'au stade d'alimentation exogène pour évaluer les impacts de l'exposition sur les embryons et des larves. Plusieurs prélèvements seront réalisés :

- au stade embryonnaire à 100, 200, 300 et 400 degré-jours post-fécondation (unité de valeur permettant de déterminer la durée d'incubation des œufs en fonction de la température de l'eau) afin d'observer l'accumulation de la molécule 6 PPD-Q,
- lors des stades larvaires (éclosion, émergence, alimentation mixte et alimentation exogène), pour lesquels plusieurs déterminations seront réalisées en s'appuyant sur la théorie des POLS.

Nous étudierons ainsi :

- Le volet biomarqueur par mesure du stress oxydatif (SOD, CAT, GST) et neuronal (AChE), immunitaire (formule sanguine), trait d'histoire de vie (longueur des télomères), omique (transcriptome hépatique), comportement (typologie des contacts, distances interindividuelles et temps d'activité, évalués grâce au logiciel Lollitrack),
- Le volet physiologique : survie, croissance, métabolisme, malformation,
- Le volet histologique : observation des sites d'accumulation des particules de pneus,
- Le volet toxicologique : détermination du BAF de la 6PPD-Q.

Parallèlement à cette expérimentation en microcosmes de laboratoire, le dosage de la 6PPD-Q sera réalisé dans l'eau d'entrée et sortie de bassins de rétention d'eaux de ruissellement de chaussée pour tenter d'évaluer l'efficacité de piégeage de cette molécule.

LIVRABLES :

Opérationnel :

- ✓ Définition d'un effet à partir duquel la contamination en 6PPD-Q impacte les premiers stades de vie d'un salmonidé lacustre (seuil de toxicité).
- ✓ Protocole de quantification de la 6PPD-Q dans les tissus animaux.
- ✓ Proxy (concentration de styrène dans le sédiment) de la contamination par les TWP.
- ✓ Estimation de l'efficacité des bassins de rétention des eaux de ruissellement pour le piégeage de la 6PPD-Q.

Rayonnement du projet :

- ✓ La rédaction d'un rapport décrivant notamment la méthodologie de dosage de la 6PPD-Q dans la chair de poisson et la validité du proxy « styrène » comme indicateur de la contamination du sédiment aux TWP.
- ✓ Une publication portera sur les effets synergiques d'une contamination à la 6PPD-Q et de la température durant les premiers stades de vie d'un poisson sténotherme froid.
- ✓ Ce projet fera l'objet d'une communication orale lors d'un congrès international (e.g. LarvalFish)

DUREE DU PROJET :

- Date de début : Début janvier (2023)
- Date de fin : Fin décembre (2023)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Blair S. I., Barlow C. H., McIntyre J. K. Acute cerebrovascular effects in juvenile coho salmon exposed to roadway runoff, 2021, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 78 (2), 103–109.

Brinkmann M., Montgomery D., Selinger S., Miller J., Stock E., Alcaraz A., Jonathan K., Challis J., Weber L., Janz D., Hecke M., Wiseman S., 2022, Acute Toxicity of the Tire Rubber-Derived Chemical 6PPD-quinone to Four Fishes of Commercial, Cultural, and Ecological Importance. Environ. Sci. Technol. Lett., 9, 4, 333–338

Challis J. K., Popick H., Prajapati S., Harder P., Giesy J. P., McPhedran K., Brinkmann M., 2021, Occurrences of Tire Rubber-Derived Contaminants in Cold-Climate Urban Runoff. Environ. Sci. Technol. Lett. 2021, 8, 961–967.

Cunningham, EM, Kiriakoulakis, K, Dick, JTA, Kregting, L, Schuchert, P and Sigwart, JD, 2020, Driven by speculation, not by impact - the effects of plastic on fish species. Journal of Fish Biology. ISSN 1095-8649.

Eyckmans M., Celis N., Horemans N., Blust, R., De Boeck, G., 2011, Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. Aquat. Toxicol. 103 (1–2), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.02.010>.

Faure F, De Alencastro LF., 2014, Evaluation de la pollution par les plastiques dans les eaux de surface en Suisse. <https://www.newsadmin.ch/newsadmin/message/attachments/37656.pdf>

Halle L., Palmqvist A., Kampmann K., Jensen A., Hansen T., Khan F., 2021, Tire wear particle and leachate exposures from a pristine and road-worn tire to *Hyalella azteca*: Comparison of chemical content and biological effects, Aquatic Toxicology, Volume 232, 105769, ISSN 0166-445X, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105769>.

Hiki K., Asahina K., Kato K., Yamagishi T., Omagari R., Iwasaki Y., Watanabe H., Yamamoto H., 2020, Acute Toxicity of a Tire Rubber-Derived Chemical, 6PPD Quinone, to Freshwater Fish and Crustacean Species, Environmental Science & Technology Letters, 8, 9, 779-784

Kayhanian M., Stransky C., Bay S., Lau S. L., Stenstrom M. K., 2008, Toxicity of Urban Highway Runoff with Respect to Storm Duration. Sci. Total Environ. 389 (2-3), 386-406

Kwok K.W., Leung K.M., Lui G.S., Chu V.K., Lam P.K., Morritt D., Maltby L., Brock T. C., Van den Brink P.J., Warne M.S.J., Crane M., 2007, Comparison of tropical and temperate freshwater animal species acute sensitivities to chemicals: implications for deriving safe extrapolation factors. Integr. Environ. Assess. Manag. 3 (1), 49–67. <https://doi.org/10.1002/ieam.5630030105>

Marsalek J., Rochfort Q., Brownlee B., Mayer T., Servos M., 1999, An Exploratory Study of Urban Runoff Toxicity. *Water Sci. Technol.* 39 (12), 33-39.

McIntyre J. K., Prat J., Cameron J., Wetzel J., Mudrock E., Peter K. T., Tian Z., Mackenzie C., Lundin J., Stark J. D., King K., Davis J. W., Kolodziej E. P., Scholz N. L., 2021, Treading Water: Tire Wear Particle Leachate Recreates an Urban Runoff Mortality Syndrome in Coho but Not Chum Salmon. *Environ. Sci. Technol.* 55 (17), 11767–11774.

Réale D, Garant D, Humphries MM, Bergeron P, Careau V, Montiglio PO., 2010, Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 365(1560):4051-4063. doi:10.1098/rstb.2010.0208

Rauert C., Charlton N., Okoffo E.D., Stanton R.S., Agua A.R., Pirrung M.C., Thomas K.V., 2022, Concentrations of Tire Additive Chemicals and Tire Road Wear Particles in an Australian Urban Tributary. *Environ. Sci. Technol.*, 56, 4, 2421–2431

Tian Z., Haoqi Z., Katherine TP., Gonzalez M., Wetzel J., Christopher W., Ximin H., Prat J., Mudrock E., Hettinger R., Allan E C., Biswas R.G., Kock F.C., Soong R., Jenne A., Du B., Hou F., He H., Lundeen R., Gilbreath A., Sutton R., Scholz N., Davis J.W., Dodd M.C., Simpson A., McIntyre J., Kolodziej E., 2020, A ubiquitous tire “derived chemical induces acute mortality in coho salmon, *Science* doi:10.1126/science.abd6951.

Varshney S., Gora A. H., Siriyappagounder P., Kiron V., Olsvik P. A., 2022, Toxicological effects of 6PPD and 6PPD quinone in zebrafish larvae. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127623

Wagner S., Hüffer T., Klöckner P., Wehrhahn M., Hofmann T., Reemtsma T., 2018, Tire wear particles in the aquatic environment - A review on generation, analysis, occurrence, fate and effects, *Water Research*, Volume 139, Pages 83-100