

Fiche projet Accord Cadre ZABR – Agence de l'eau

2024-n°action-STOC TWP-CARTEL Spéciation et toxicité des contaminants organiques contenus dans les particules d'usure de pneu

INTITULE DU PROJET : STOC TWP (speciation and toxicity of organic contaminants issued from tire wear particles)

Responsable scientifique du projet:

- REALIS
- Emilie
- CARTEL (centre INRAE de Thonon les Bains)
- Ingénieure de recherche
- emilie.realis@inrae.fr
- 0615474235

Référent (s) administratif(s) :

- Boistard
- Pascal
- INRAE
- Président de centre
- presidency.lyon-grenoble@irstea.fr
- +33 (0) 4 72 20 89 27

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

UMR CARTEL (INRAE/USMB) Dr Emilie Réalis

UMR EDYTEM (USMB/CNRS) Pr Emmanuel Naffrechoux

AUTRES PARTENAIRES

- Recherche : Dr Benoit Ferrari du Centre Ecotox EAWAG/EPFL (expertise indicateurs d'exposition et d'effets pour évaluer le stress chimique / expertise Gammarès / expertise TWP)
- 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

- **Résumé :**

L'usure des pneumatiques d'un véhicule motorisé terrestre génère environ 0,1 gramme de particules de caoutchouc par kilomètre, soit par exemple plus de 700 kg par kilomètre en une année sur la D1508 longeant le Lac d'Annecy ou sur la D1201 longeant le Lac du Bourget. Ces microplastiques particuliers, dénommés TWP (Tire Wear Particles), peuvent rejoindre le sédiment des zones littorales lacustres et impacter les organismes aquatiques en raison de leur composition chimique. Les TWP, majoritairement constituées de caoutchouc, contiennent en effet de nombreux additifs dont certains sont solubles dans l'eau et très toxiques.

Depuis 2020, la recherche scientifique a par exemple démontré la libération par ces TWP d'une molécule à effet léthal sur certaines espèces de salmonidés : la 6PPDq, produit de transformation de l'additif 6PPD, un anti-vieillessement du caoutchouc. L'étude-action ZABR n°87 2023 (Plastiomble-CARRTEL) montre ainsi les effets néfastes de la 6PPDq sur les premiers stades de vie de l'omble chevalier. L'industrie pneumatique travaille actuellement à la recherche d'un autre additif aux propriétés comparables à celles du 6PPD pour la préservation du caoutchouc, mais moins nocif aux espèces piscicoles. Il n'a toutefois pas été clairement démontré que la substitution de cet additif par une molécule moins nocive permettrait de résoudre le problème d'impact toxique des TWP sur les écosystèmes aquatiques. En effet, les TWP se transforment au contact de la chaussée en TRWP (Tire Road Wear Particles) et incorporent d'autres constituants toxiques (métaux et HAP notamment) issus de la circulation véhiculaire, puis sont mélangées aux autres poussières de route (PR).

Le projet STOC TWP vise donc à étudier l'origine des potentiels effets toxiques sur les organismes aquatiques des poussières de route remobilisées vers les écosystèmes d'eau douce (lacs et rivières) par le ruissellement sur les voies de circulation. Pour cela nous comparerons les effets toxiques des molécules 6PPD et 6PPDq (seules ou en mélange) aux effets toxiques des TWP et des PR en réalisant différents bio-essais utilisant des gammarès.

ENCART 2024-XX- STOC TWP-CARRTEL (Emilie Réalis)

- L'équipe CARRTEL définira la méthodologie globale. Elle effectuera les expérimentations d'exposition des gammarès aux polluants ainsi que les bio-essais. Elle contribuera à l'interprétation et à la valorisation des résultats acquis.

ENCART 2024-XX- STOC TWP-EDYTEM (Emmanuel Naffrechoux)

- L'équipe EDYTEM participera au design des expérimentations. Elle analysera les concentrations des contaminants dans les différents échantillons (gammarès, eau, particules de pneu et poussières de chaussée). Elle contribuera à l'interprétation et à la valorisation des résultats acquis.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

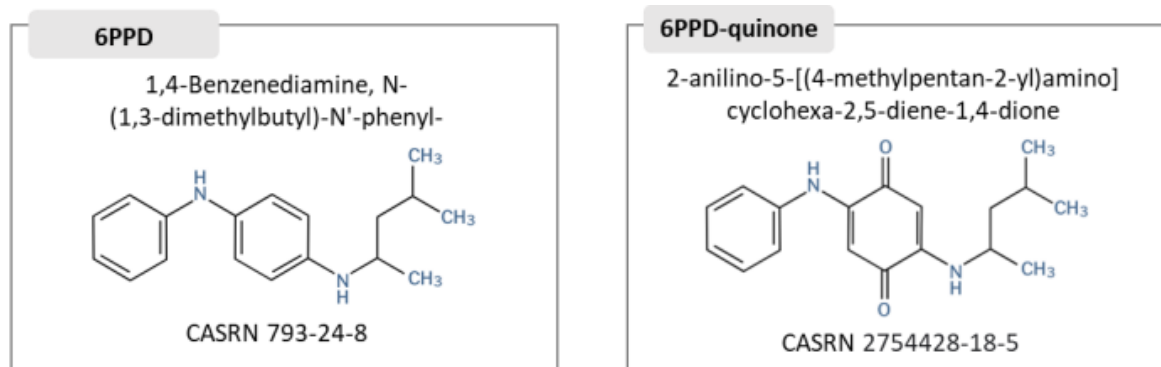
- **Contexte général**

L'abrasion mécanique des pneus produit des micro-plastiques de dimensions inférieures à 0,5 mm, appelés TWP. Plus de 10 % de la masse d'un pneu est usée sur les surfaces routières au cours de sa durée de vie utile. Les TWP se combinent généralement aux minéraux de la route pour former les particules dites d'usure des pneus et de la route (TRWP). Les poussières de route (PR) contiennent ces TRWP et d'autres particules dérivées du fonctionnement des véhicules (suies d'échappement, particules d'usure des freins, etc) ou de l'érosion du revêtement des chaussées. Les T(R)WP font l'objet d'une attention croissante en tant que micro-plastiques dans les environnements aquatiques. Toutefois, les informations disponibles sur leurs propriétés, les techniques analytiques pour déterminer leur concentration dans l'environnement ou leurs effets écotoxiques sont encore rares alors que les émissions de TWP contribuent à hauteur de 5 à 30% aux émissions de particules dues au trafic véhiculaire terrestre. La masse de TWP générée annuellement est estimée à 1 327 000 tonnes pour l'Union Européenne (correspondant à $\sim 100 \text{ mgTWP.km}^{-1}.\text{véhicule}^{-1}$).

Selon les pneumatiques, les TWP sont majoritairement constituées du polymère styrène-butadiène ou de caoutchouc naturel, mais contiennent également de nombreux autres constituants dont les fractions massiques sont non négligeables (silice, cire, huiles, noir de carbone, anti-oxydants, etc). Parmi eux, la molécule 6PPD est notamment utilisée comme anti-dégradant du caoutchouc depuis des

décennies et se retrouve dans la plupart, sinon la totalité, des pneus de véhicules automobiles. Cet additif remplit la fonction essentielle de protéger le caoutchouc des réactions avec l'ozone et l'oxygène. L'oxydation rend en effet le caoutchouc friable, entraînant la formation de fissures, qui peuvent compromettre les performances des pneumatiques sous contrainte dynamique. La 6PPD est présente à raison de 1 à 2 % en masse (secret de fabrication) et diffuse au cours de la durée de vie du pneu vers sa surface pour fournir une source continue se transformant en sous-produits par réaction avec les oxydants de l'air. La 6PPD répond aux critères de désignation comme toxique aquatique aigu de catégorie 1ⁱ, caractérisée par une concentration probable sans effet sur les organismes aquatiques égale à 28 ng/Lⁱⁱ. Elle s'est effectivement révélée toxique pour certains organismes aquatiquesⁱⁱⁱ.

En 2020, des chercheurs ont découvert et identifié la 6PPDq comme la molécule organique présente dans les eaux de ruissellement de chaussée, autour de Puget Sound (côte NW de l'État de Washington-USA), responsable du syndrome de mortalité par ruissellement urbain observé chez le saumon coho (*oncorhynchus kisutch*) durant les 25 dernières années^{iv}. Depuis 2021, il a été clairement établi que la 6PPDq résulte de l'oxydation de la 6PPD, et présente une toxicité élevée pour certains organismes piscicoles (e.g. LC50 pour le saumon Coho comprise entre 41 ng/L et 95 ng/L^v) et à un degré moindre pour des invertébrés aquatiques (e.g. un test de 48 heures pour *Daphnia magna* et de 96 heures pour *Hyalella azteca* a entraîné 100% de mortalité respectivement à 138 µg/L et 286 µg/L^{vi}). De récents travaux ont par ailleurs montré chez le poisson-zèbre, une faible mortalité par la 6PPD et la 6PPDq, mais une toxicité développementale, comportementale et cardiaque^{vii} ^{viii} et des comportements anormaux chez l'adulte^{ix}.



Ces deux molécules (6PPD et 6PPDq) sont légèrement solubles dans l'eau. Elles ont été détectées dans les eaux pluviales, les eaux de surface ou les sédiments, probablement en raison d'un temps de demi-vie suffisant ou de leur introduction permanente dans les milieux aquatiques compte-tenu des apports récurrents de particules d'usure des pneus sur les chaussées lessivées par les pluies. 6PPD et 6PPDq coexistent en effet dans la gomme des pneus puisque la protection du caoutchouc contre le vieillissement à l'air est assurée par la diffusion constante de 6PPD vers la surface et sa réaction avec l'ozone et les autres oxydants de l'air, produisant notamment la 6PPDq. Les poussières de route (PR) contiennent donc 6PPD et 6PPDq. Par ailleurs, en raison des autres émissions véhiculaires et de la constitution des revêtements de chaussée, les PR contiennent d'autres toxiques, notamment des métaux (Zn, Cd, Cr, Cu, Sr...) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les particules de dimensions médianes ~100 µm sont remises en suspension dans les eaux de ruissellement de chaussée lors des épisodes pluvieux et sont donc susceptibles d'impacter les organismes vivant dans les milieux aquatiques récepteurs.

Malgré ces constats, aucune étude n'est disponible sur les effets des deux molécules (6PPD et 6PPDq) en cocktail dans l'eau, ni sur les effets des TWP après dispersion dans les écosystèmes aquatiques. Les travaux réalisés dans l'action ZABR n°87 2023 (PlastiOmbre – CARRTEL) démontrent la présence de la 6PPDq dans les eaux de ruissellement de chaussée du bassin versant du Lac du Bourget, sous forme dissoute et sous forme particulaire, à des concentrations supérieures aux valeurs sans effet sur le poisson. De plus, la 6PPDq en solution aqueuse s'est révélée toxique pour les premiers stades de vie de l'omble chevalier dès 1,5 µg/L, avec un effet synergique de la température de l'eau. Les effets sont (i) physiologiques avec une diminution de la survie et une augmentation des malformations, (ii) métaboliques avec une diminution du taux de croissance spécifique et de la capacité d'utilisation de la réserve vitelline (exceptée à 8,5 °C où cette dernière est augmentée) et (iii) comportementaux avec diminution de la distance parcourue (sauf à 8,5°C où elle est augmentée pour 3µg/L) ou augmentation

de l'accélération. Cette action ZABR a aussi permis de proposer une méthodologie d'estimation semi-quantitative des particules d'usure de pneus (TWP) dans les poussières de route (PR). L'action PlastiOmbre a conduit au travail doctoral de Fanny-Laure Thomassin, débuté en octobre 2023 et co-financé par l'USMB (allocation doctorale MESR) et l'entreprise Michelin (frais de fonctionnement de la thèse). Cette thèse vise à identifier les effets du cocktail 6PPDq-BaP (molécules organiques a priori les plus toxiques contenues dans les eaux de ruissellement de chaussée) sur l'omble chevalier et à quantifier la bioaccumulation de ces xénobiotiques dans quelques espèces piscicoles du lac d'Annecy (pour lequel les apports de ces deux molécules sont majoritairement liés à la circulation véhiculaire).

Les résultats de la thèse sont attendus pour fin 2025, avec une publication à l'automne 2026. Compte-tenu de l'urgence d'obtenir des résultats quant aux mesures à prendre pour limiter les risques environnementaux liés aux particules d'usure de pneus, il est nécessaire d'initier des études plus courtes pour obtenir rapidement des résultats quant à leurs effets toxiques. C'est l'objet de cette nouvelle action proposée au financement par la ZABR et l'Agence de l'Eau RMC.

- **Contexte ZABR :**

- **Thématique ZABR :** Flux polluants, Ecotoxicologie, Ecosystèmes
- **Site Atelier ou Observatoire ZABR :** OLA (grands lacs alpins) + rivières proches des routes
- **Besoin de connaissance Agence de l'eau :** Substances et risques associés, enjeux de santé-environnement (assurer une veille scientifique sur le risque lié aux contaminations émergentes ; Mieux caractériser les sources d'émissions des microplastiques et des nanoplastiques et préciser leur présence et leurs effets sur les écosystèmes aquatiques)

FINALITE ET ATTENDUS OPERATIONNELS

- **Objectifs scientifiques**

L'étude des effets cumulatifs des différentes substances contenues dans les PR est nécessaire car la co-exposition des organismes aquatiques à plusieurs facteurs de stress a généralement un effet autre qu'additif sur leur condition physique (une réduction de la condition physique rendant plus difficile la survie dans l'habitat naturel et pouvant aussi avoir un impact sur la taille de la population en raison d'une fécondité réduite). Pour cela nous avons choisi le modèle gammare qui est un modèle de référence en écotoxicologie. De plus, la méthodologie appliquée lors de cette expérimentation nous permettra comparer nos résultats aux études précédentes réalisées sur la 6PPDq.

L'objectif scientifique de cette action vise à démontrer que la toxicité de l'additif 6PPD et de son sous-produit d'oxydation 6PPDq correspond bien à celle générée par les particules d'usure de pneu TWP et par les poussières de route PR.

- **Attendus opérationnels**

Sous la pression médiatique et des organisations gouvernementales, les efforts actuels des fabricants de pneumatiques pour limiter les effets de l'usage de pneus sur les écosystèmes aquatiques portent sur la recherche d'un substituant à l'anti-ozonant 6PPD, indispensable à la préservation des qualités routières du pneu.

S'il s'avère que la toxicité des PR pour les organismes aquatiques est supérieure à celle des TWP, elle-même supérieure à celle de la 6PPDq ou 6PPD (ou du mélange des deux molécules en solution aqueuse), la stratégie de substitution de la 6PPD par un anti-ozonant moins nocif ne sera pas satisfaisante. La préservation des écosystèmes aquatiques soumis aux eaux de ruissellement de chaussée nécessitera de développer et d'implanter des dispositifs adaptés à la captation/rétention des PR.

L'impact technique et économique des conclusions de la présente étude est donc non négligeable, tant pour l'industrie manufacturière du pneumatique que pour les gestionnaires des voies de circulation ou des eaux de surface.

DESCRIPTIF DETAILLE

• Méthodologie

Il est proposé d'utiliser des organismes aquatiques à développement rapide compte-tenu de la durée de l'étude. Le choix s'est porté sur *Gammarus fossarum* (gammare), crustacé amphipode aquatique dont les dynamiques de population sont de type *birth-flow* (les organismes se reproduisent toute l'année) et dont les taux de fécondité et de croissance dépendent de la température. Ce choix a été guidé par le fait que les gammaridés sont reconnus comme des organismes d'intérêt pour la biosurveillance de la qualité de l'eau^x et par les résultats des expérimentations réalisées sur des gammars en parallèle à PlastiOmbre, montrant une diminution de la survie sexe-dépendante (la mortalité des mâles est augmentée pour l'exposition à 3µg 6PPDq/L), une diminution de l'activité de nutrition et de l'activité de nage pour les deux sexes aux expositions à 1,5 et 3µg 6PPDq/L. De plus, la bioaccumulation des TWP a été observée chez ces invertébrés par Benoit Ferrari (du centre écotox EPFL/EAWAG, collaborateur externe dans le projet STOC TWP), en partenariat avec le laboratoire d'écotoxicologie UR RiverLy INRAE^{xi}.

Les effets sur le gammare des molécules 6PPD et 6PPDq dissoutes dans l'eau (seules et en mélange), des particules d'usure des pneus TWP, et des poussières de route PR, seront évalués par différents bio-essais (d'alimentation, de reprotoxicité, de neurotoxicité, de perturbation endocrinienne) et par l'étude du comportement de nage et des interactions inter-individuelles, en fonction de la température du milieu d'exposition.

En effet, l'augmentation de température peut d'une part favoriser la désorption des composés toxiques des TWP et des PR (donc favoriser leur bio-assimilation) et d'autre part impacter la sensibilité des gammars aux contaminants dissous^{xii}. Une température de 12°C est retenue comme température optimale pour cet organisme. Une température de 18°C est choisie en relation avec le scénario pessimiste de changement climatique du GIEC.

L'exposition aux contaminants dissous dans l'eau (6PPD et 6PPDq) sera réalisée par injection d'une solution mère éthanolique dans un aquarium thermostaté contenant les gammars. L'exposition à ces deux molécules et aux autres constituants lixiviables des TWP, sera réalisée par introduction dans l'aquarium d'une quantité connue de particules de gomme de pneu (dim. ~ 100µm), obtenues par abrasion sur toile de verre P100 de la bande de roulement d'un pneumatique représentatif des ventes les plus importantes en France. Enfin, l'exposition aux constituants lixiviables des PR sera réalisée par introduction dans l'aquarium de poussières de route prélevées sur une voie de circulation (D1504 - 20 000 véhicules. jour⁻¹), après accumulation sur la bordure goudronnée lors de ruissellement suivi de l'évaporation d'eau de lessivage de chaussée, afin de représenter fidèlement les PR susceptibles de contaminer les milieux aquatiques.

Les concentrations testées seront celles susceptibles d'être mesurées dans les eaux littorales de lacs et rivières soumises à des ruissellements de chaussée. Les gammars seront exposés aux contaminants durant 21 jours (d1 à d21), selon six conditions par valeur de température. Six lots de gammars (LGx ; x=1 à 6), issus de souche contrôlée et connue, seront achetés à la société BIOMAE. Les gammars seront sexés, opération facilitée par le fort dimorphisme sexuel, visible à l'œil nu, chez *G. fossarum*. L'effectif par lot sera de 200 femelles et 200 mâles au stade D (post-copulation). Chaque lot sera divisé en deux, incubés dans un aquarium chacun à une température spécifique de 12°C (LGx_12) ou 18°C (LGx_18).

LG1_T°	absence de contaminant (témoin avec solvant éthanol)
LG2_T°	6PPD à 1,5 µg/L en solution aqueuse (ajout de la solution-mère à d1, d8 et d15)
LG3_T°	6PPDq à 0,5 µg/L en solution aqueuse (ajout de la solution mère à d1, d8 et d15)
LG4_T°	6PPD à 1,5 µg/L & 6PPDq à 0,5 µg/L en solution aqueuse (ajout de la solution mère à d1, d8 et d15)
LG5_T°	particules d'usure de pneumatique en suspension à 10 mgTWP/L (ajout à d1)
LG6_T°	poussières de route à 50 mgPR/L (ajout à d1)

Compte-tenu de la durée de vie de la 6PPD et 6PPDq en solution aqueuse, un ajout sera renouvelé tous les 7 jours dans chaque aquarium concerné. La lixiviation des TWP ou des PR permettant un apport continu des potentiels toxiques durant les 21 jours, l'ajout des TWP ou des PR se fera au jour d1 uniquement.

Après 21 jours d'exposition, des bio-essais d'alimentation, de reprotoxicité, de neurotoxicité, et de perturbation endocrinienne (selon les protocoles normalisés^{xiii}) seront réalisés au CARRTEL à Thonon. Le comportement des gammarus sera également déterminé à d1, d8, d15 et d21 au moyen du logiciel Lolitrack.

La quantification des contaminants sera effectuée en LCMS² (pour 6PPD et 6PPDq) ou UHPLC-fluo (pour HAP) sur les instruments de la plate-forme PTAL du laboratoire EDYTEM au Bourget du Lac. La concentration de 6PPD et 6PPDq sera mesurée dans les gammarus (à d21) et dans l'eau des incubateurs (à d1, d8, d15, d21). Une quantification de 15 congénères de la liste US-EPA des HAP prioritaires sera aussi réalisée dans l'eau des incubateurs à d1 et d21 et dans les invertébrés à d21. L'objectif est de quantifier la bioaccumulation et de comparer les teneurs aux PNEC eau douce ou NOEC invertébrés aquatiques.

LIVRABLES :

Rapport d'étude et article scientifique décrivant :

- les effets toxiques de la 6PPD et 6PPDq (seules et en mélange, à l'état dissous) sur le gammarus, avec distinction des effets selon le sexe
- les effets toxiques comparés des particules d'usure de pneus (TWP) aux effets des additif et produit de dégradation 6PPD et 6PPDq : impact potentiel des HAP (et autres constituants de la gomme du pneu)
- les effets toxiques comparés des poussières de route (PR) aux effets des TWP : impact potentiel des constituants du revêtement routier et des autres émissions véhiculaires déposées sur chaussée.
- l'influence sur ces effets de l'augmentation de température de l'eau.

DUREE DU PROJET:

Janvier 2025 à Juillet 2026

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ⁱ United Nations, 2019, Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fourth revised edition. Chapter 4.1: Hazards to the Aquatic Environment.

ⁱⁱ OSPAR Commission, 2006, OSPAR background document on 4-(dimethylbutylamino)diphenylamine (6PPD), ISBN 978-1-905859-05-4 (Disponible à : <https://www.ospar.org/documents?v=7029>)

ⁱⁱⁱ Xiaoli Chen et al., 2023, Analysis, environmental occurrence, fate and potential toxicity of tire wear compounds 6PPD and 6PPD-quinone, J. Hazard Mat (DOI : 10.1016/j.jhazmat.2023.131245)

^{iv} Tian Z et al., 2021, A ubiquitous tire rubber– derived chemical induces acute mortality in coho salmon. Science (DOI : 10.1126/science.abd6951)

^v Lo BP et al., 2023, Acute Toxicity of 6PPD-Quinone to Early Life Stage Juvenile Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and Coho (*Oncorhynchus kisutch*) Salmon. Environ Toxicol Chem. (DOI : 10.1002/etc.5568)

^{vi} Hiki K et al., 2021, Acute toxicity of a tire rubber-derived chemical, 6PPD quinone, to freshwater fish and crustacean species. Environmental Science & Technology Letters. (DOI : 10.1021/acs.estlett.1c00453)

^{vii} Varshney S et al., 2022, Toxicological effects of 6PPD and 6PPD quinone in zebrafish larvae, J. Hazard Mater (DOI : 10.1016/j.jhazmat.2021.127623)

^{viii} Zhang S-Y et al., 2023, 6PPD and its metabolite 6PPDQ induce different developmental toxicities and phenotypes in embryonic zebrafish, J. Hazard Mater. (DOI : 10.1016/j.jhazmat.2023.131601)

^{ix} Ji J et al., 2022, Multiview behavior and neurotransmitter analysis of zebrafish dyskinesia induced by 6PPD and its metabolites, Sci. Total Environ. (DOI : 10.1016/j.scitotenv.2022.156013)

^x Chaumot A, 2019, Ecotoxicologie des populations chez le crustacé d'eau douce *Gammarus* sp., Sciences de l'environnement. Habilitation à diriger des recherches, Université Claude Bernard Lyon I, fftel-02609326f

^{xi} Masset T, Chaumot A, Geffard O, Ferrari B JD et al., 2024, Bioaccumulation and Trophic Transfer of Tire Particles and Associated Chemicals From Aquatic Invertebrates to Fish, SETAC Europe 34th Annual Meeting, Seville (Spain)

^{xii} Henry Y et al., 2017, Combined effect of temperature and ammonia on molecular response and survival of the freshwater crustacean *Gammarus pulex*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 42-48, (DOI : 10.1016/j.ecoenv.2016.11.011)

^{xiii} <https://biomae.fr/wp-content/uploads/2022/12/Bioessai-tox-generale-et-specifique.pdf>