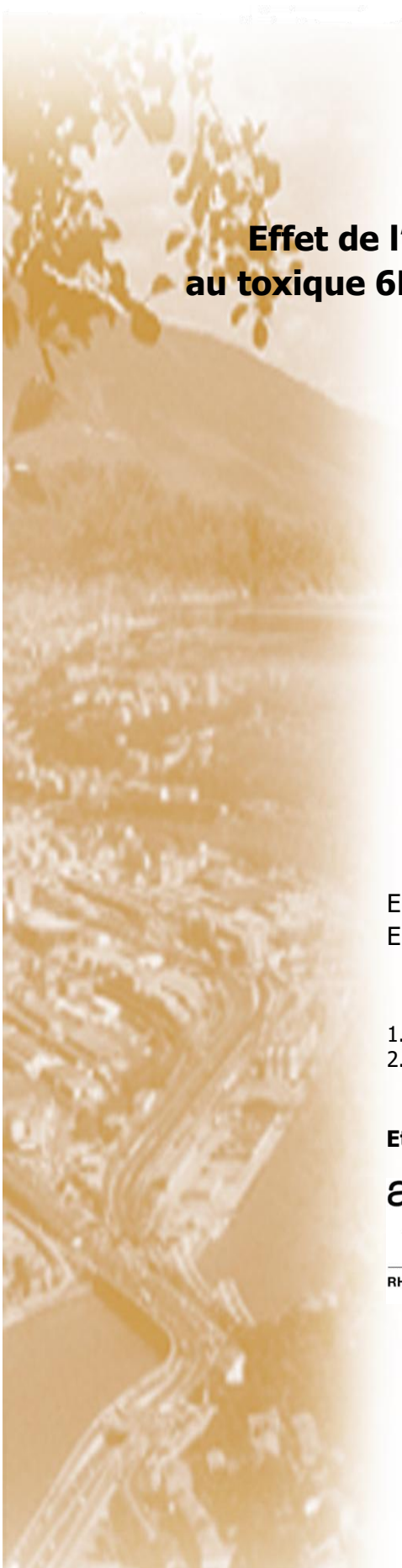




Effet de l'exposition précoce de l'omble chevalier au toxique 6PPDQ couplée à une hausse de température (PlastiOmble)

Rapport final

Action n°87 du Programme 2023 au titre de l'accord
cadre Agence de l'Eau ZABR

Emilie Réalis¹, Fanny-Laure Thomassin¹, Nathalie Cottin², Mathieu Pin²,
Emmanuel Naffrechoux²

1. INRAE, CARRETEL, Thonon (France)

2. EDYTEM, UMR CNRS/USMB, Le-Bourget-du-Lac (France)

Etude réalisée avec le concours financier de l'Agence de l'Eau RMC

**agence
de l'eau**
RHÔNE MÉDITERRANÉE
CORSE

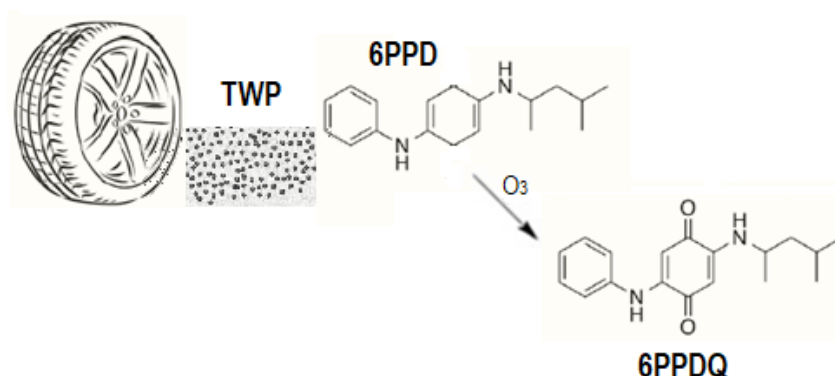
Remerciements:

Les auteurs remercient Violaine Naffrechoux (**EDYTEM**) pour l'aide apportée aux analyses chimiques ainsi que Lionel Navarro (**Agence de l'eau RMC**) pour son accompagnement lors du montage et du suivi de ce projet.

Contexte de l'étude

Les lacs péri-alpins, comme le lac Léman, constituent une zone importante de stockage des micro-plastiques, dont la majorité serait des particules d'usure de pneus (ou TWP, pour tire wear particles) en raison du trafic routier intense dans leur bassin versant¹. En effet, les TWP déposées sur la route peuvent être entraînées directement jusqu'aux écosystèmes aquatiques par les eaux de ruissellement de chaussée. La connaissance des impacts de ces micro-plastiques particuliers sur la biocénose reste encore parcellaire, en particulier sur les espèces piscicoles.

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 poissons². Parmi eux, la molécule 6PPD, additif anti-ozonant du caoutchouc, se dégrade en un sous-produit nommé 6PPD-quinone (6PPDQ) ou N-(1,3-diméthylbutyl)-N'-phényl-p-phénylènediamine-quinone, identifié comme très toxique pour certains salmonidés³.



La concentration en 6PPDQ dans l'eau de ruissellement de chaussée peut atteindre plusieurs microgrammes par litre⁴, alors qu'elle a récemment été identifiée comme responsable du "syndrome de mortalité par ruissellement urbain" chez le saumon coho pour des concentrations inférieures à 100 ng/L⁵. Le mode d'action précis de la 6PPDQ est encore inconnu⁶, même s'il semble être lié à une perturbation de la barrière hémato-encéphalique⁷.

¹ Faure F., De Alencastro LF., 2014, Evaluation de la pollution par les plastiques dans les eaux de surface en Suisse. <https://www.news.admin.ch/news/message/attachments/37656.pdf>

² 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

³ 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

⁴ Raurt 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

⁵ 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

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

⁷ Blair S. I., Barlow C. H., McIntyre J. K., 2021, Acute cerebrovascular effects in juvenile coho salmon exposed to roadway runoff, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 78 (2), 103–109

Dans les lacs Léman, d'Annecy ou du Bourget, les populations d'omble chevalier, salmonidé emblématique, sont en régression depuis plusieurs années malgré l'amélioration continue du statut trophique du milieu depuis la fin des années 1980. Les difficultés de recrutement des jeunes alevins pourraient être liées à la présence de toxiques, encore non surveillés réglementairement, au réchauffement global des eaux, ou à une combinaison de ces facteurs.

L'étude PlastiOmble vise donc à identifier les effets de la molécule 6PPDQ, couplés à une faible variation de température, sur les œufs et les larves d'omble chevalier au moyen de tests comportementaux (activité et vitesse de nage, anxiété, interactions avec les congénères), de tests de croissance et de développement, de mesure de la survie et de l'analyse des enzymes de stress oxydatifs. L'ensemble de ces paramètres vont co-varier en fonction de l'environnement et avoir *in fine* des conséquences sur le recrutement de la population.

Afin d'évaluer ultérieurement le potentiel de bioaccumulation de ce xénobiotique, un protocole d'analyse de la 6PPDQ dans les matrices biologiques a été mis au point à partir du protocole publié de dosage dans les matrices aqueuses.

De plus, en vue d'une détection future de l'exposition environnementale des espèces piscicoles aux constituants lixiviables des TWP présentes dans le sédiment lacustre, le styrène (monomère du styrène-butadiène, constituant principal du caoutchouc synthétique du pneumatique) a été testé comme proxy de la présence de ces particules dans les sédiments. Enfin, des essais de quantification de la 6PPDQ et des TWP dans des eaux de ruissellement de chaussée et les poussières de bordure de route ont été menés en vue d'évaluer la présence de la contamination dans l'environnement routier du bassin versant du Lac du Bourget.

Partie I : En vue de relier les effets toxiques observés au laboratoire aux effets observés in situ.

Au démarrage de l'action PlastiOmbre, les données bibliographiques depuis 2020⁸ permettent d'identifier les principales connaissances relatives aux TWP et à la 6PPDQ :

- Une voiture émet 5 à 200 mg TWP/km. Le ruissellement de surface, un vecteur de transport essentiel pour les TWP (20 à 40% de TWP déposées sur les chaussées seraient remobilisées), peut engendrer des concentrations dans les plans d'eau récepteurs variant de 0,5 à 3,6 mgTWP/L⁹.
- La gomme du pneu contient environ 1% de l'additif anti-ozonant 6PPD (d'après les données des fabricants). La 6PPD possède une solubilité aqueuse de 1mg/L, un logKow 4,7, un logKoc 4,4, une PNEC aqua 28ng/L et un temps de demi-vie < 1jour.
- La 6PPD s'oxyde rapidement, notamment en 6PPDQ dont la solubilité aqueuse est proche de 40 µg/L. La 6PPDQ possède un logKow 4,0, un logKoc 4,0 et un temps de demi-vie estimé à 334 jours. Sa LC50 est seulement de 95ng/L pour le saumon Coho, ce qui en fait l'un des composés organiques les plus toxiques identifiés jusqu'à présent, mais atteint 2 µg/L pour la truite Arc en Ciel.
- Des concentrations en 6PPDQ ont été mesurées jusqu'à 2,4 µg/L dans les eaux de ruissellement de chaussée et 936 ng/g dans des sols de bord de route, ou encore 2,3 µg/L dans les eaux de surface.

En revanche de nombreuses inconnues demeurent encore à la date de démarrage du projet :

- Les quantités de TWP réellement présentes dans l'environnement aquatique sont inconnues en raison de la difficulté d'analyser ces microplastiques particuliers. L'estimation est possible en quantifiant certains constituants de la gomme du pneu par pyrolyse-GCMS.
- Le temps de vie de la 6PPDQ en milieu naturel tout comme sa spéciation dans les milieux aquatiques (partition entre phase dissoute et phase particulaire, complexation à la matière organique dissoute), sont inconnus.
- La bioaccumulation de la 6PPDQ par les espèces piscicoles est supposée (log Kow 4,0) mais non encore quantifiée.
- Les effets toxiques de la 6PPDQ sur les premiers stades de vie des salmonidés n'ont pas encore été déterminés.

Trois actions, telles que mentionnées dans la décision attributive de subvention à l'USMB signée par l'Agence de l'Eau RMC (15/12/2022), ont été menées par l'équipe EDYTEM au Bourget du Lac sous la responsabilité scientifique du Pr Emmanuel Naffrechoux :

- i) Recherche d'un proxy de la contamination du sédiment par des particules d'usure de pneus
- ii) Evaluation du devenir de la 6PPDQ contenue dans les eaux de ruissellement de chaussée
- iii) Développement d'un protocole d'analyse quantitative de la molécule 6PPDQ dans les tissus animaux

⁸ Chen X. et al., 2023, Analysis, environmental occurrence, fate and potential toxicity of tire wear compounds 6PPD and 6PPD-quinone. Journal of Hazardous Materials, 452, 131245

⁹ Wik A., Dave G., 2009, Occurrence and effects of tire wear particles in the environment - a critical review and an initial risk assessment. Environ. Pollut., 157, 1-11

1. Recherche d'un proxy indicateur de la contamination par les TWP

Un marqueur fiable des particules d'usure de pneus doit i) être spécifique au caoutchouc des pneus, ii) être présent à des concentrations comparables, de préférence indépendantes des marques ou modèles de pneus, iii) ne pas être facilement lessivé ni se transformer dans les conditions environnementales et iv) être facilement et précisément détectable.

Le styrène, monomère du caoutchouc synthétique styrène-butadiène, répond a priori aux trois premiers critères. Sa détection est possible par pyrolyse-GCMS mais cette technologie est malheureusement onéreuse. Le styrène est soluble dans le chloroforme, ce qui permet d'envisager son extraction des TWP, et quantifiable en GCMS dans ce solvant, évitant le recours au couplage à un module de pyrolyse (dispositif non disponible dans de nombreux laboratoires d'analyse environnementale). Toutefois le monomère styrène n'existe a priori qu'en teneur réduite dans la gomme de pneumatique et nécessite donc un rendement d'extraction élevé pour être quantifiable dans l'extrait chloroformique.

Example of a Tread Rubber Compound

Material	Function	~ Percentage (%)
SBR, BR, Natural Rubber	Elastomer	50
Carbon Black / Silica	Filler	22
Naphthenic Oil	Processing Aid	21
Stearic Acid	Component of Curing System	0.7
Zinc	Component of Curing System	0.7
6PPD	Protection Material	1
Wax	Protection Material	0.7
Silane	Coupling Agent	1.8
Sulfur	Component of Curing System	0.7
DPG	Component of Curing System	0.5
CBS	Component of Curing System	0.6
Total		~ 100

Figure 1 : exemple de composition (% massique) de la gomme de pneumatique

Des TWP ont été obtenues par ponçage sur bande en toile de verre "120" de la gomme de bande de roulement d'un pneumatique usagé Michelin (XGreen energy 165/70/13 fabriqué en 2002), puis soumises à un protocole d'extraction sous ultrasons en présence de chloroforme. L'extrait chloroformique obtenu a été caractérisé par GCMS. Malgré les conditions sévères d'extraction (ultrasons + CHCl_3), le styrène n'a pu être détecté dans l'extrait. Les seules molécules identifiables sont le benzothiazole, le 4-tert-octylphenol, la phthalamide et la 6PPD.

Bien que l'antioxydant 6PPD soit également utilisé dans les lubrifiants et les colorants, sa principale application concerne les élastomères et notamment la gomme de pneumatiques (à hauteur théorique de 1% à 2% en masse de pneu en moyenne¹⁰ avec jusqu'à 50% de la masse totale de 6PPD présente dans le flanc, et 40% dans la bande de roulement¹¹). Sur cette base, on peut considérer la 6PPD un candidat intéressant comme marqueur de la présence de TWP dans différentes matrices environnementales. Le protocole décrit ci-dessus a donc été optimisé afin de quantifier au mieux cet additif.

¹⁰ Hervé Joubert, Michelin, communication personnelle avril 2024.

¹¹ Patterson A., 2021, DTSC Public Workshop on Motor Vehicle Tires Containing 6PPD Priority Product Proposal. Analysis of 6PPD-quinone in a variety of matrices. Eurofins Environment Testing America.

Environ 1 g de TWP ont été extraites sous ultrasons basse fréquence à l'aide d'un bac Advantage Lab durant 2 x 30 minutes à 40°C dans 2 x 30 mL CHCl₃. Après séparation des particules de la phase dissoute par filtration sur fibres de verre et purification sur colonne de silice, 1 µL d'extrait chloroformique est injecté dans un GC Clarus 500 couplé à un MS 560 (Perkin-Elmer). La séparation des solutés de l'extrait est assurée par une colonne Optima 5 (30m x 0,25mm x 0,25µm). Le four du GC est programmé avec 2 paliers isothermes (à 65°C et 340°C) reliés par une rampe de 6,5°C/mn. Le premier palier est maintenu pendant 2 minutes avant l'augmentation de température et le second pendant 20 minutes en fin d'analyse. L'extrait chloroformique est injecté à 330°C sous un débit d'hélium de 1mL/mn, en mode "splitless". Le spectromètre de masse est utilisé en mode "full scan" entre 35 et 350 uma.

La concentration mesurée dans les TWP du pneu Michelin est égale à 210 µg6PPD/g. Cette valeur est (très) éloignée de la valeur indiquée par les manufacturiers de pneumatiques (environ 1% à 2% en masse serait ajoutée lors de la fabrication), comme cela a également été constaté dans une étude récente¹². Il est possible que le protocole utilisé ne permet pas l'extraction complète de l'additif, ou bien que sa concentration diminue au cours du temps à partir du début d'utilisation des pneumatiques (le pneu utilisé pour produire les TWP date de 2002). Plusieurs études suggèrent en effet que le contenu en 6PPD des pneus diminue de plus de 90% lors de son vieillissement^{13, 14}.

La concentration de 6PPD mesurée dans le solvant organique d'extraction est en principe proportionnelle à la masse de TWP, mais serait aussi fonction de l'âge du pneu (ou des particules d'érosion). Cette valeur pourrait donc servir seulement de proxy de la présence (et non de la quantité) de TWP contenue dans un échantillon environnemental (poussières de route, eau de ruissellement de chaussée, sédiments de lac ou rivière, sol...)

Le protocole analytique a été testé sur des poussières de route (PR) et des particules en suspension d'eau de ruissellement de chaussée. La composition des PR est explicitée par la figure ci-dessous¹⁵ :

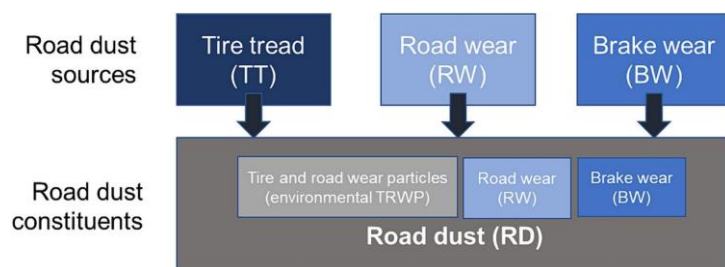


Figure 2 : Sources et principaux constituants des poussières de route

Un prélèvement de poussières accumulées contre une bordure béton sur la RD1504 à la Motte-Servolex a été réalisé manuellement à l'aide d'une spatule inox et collecté dans un flacon en verre le 20 mars 2024 (dernière pluie le 18/03/24).

¹² Ximin Hu et al., Solvent Extraction & Aqueous Leaching of Tire Tread Particles, WA Department of Ecology, 2024.

¹³ OSPAR Commission. Hazardous Substances Series 4-(dimethylbutylamino)diphenylamine (6PPD) 2005 (2006 Update). Available at: <https://www.ospar.org/documents?v=7029>. 2006

¹⁴ Unice K et al., 2015, Experimental methodology for assessing the environmental fate of organic chemicals in polymer matrices using column leaching studies and OECD 308 water/sediment systems: Application to tire and road wear particles. Science of the Total Environment. 533:476–487. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.053.

¹⁵ Gehrke I. et al., 2023, Review: Mitigation measures to reduce tire and road wear particles. Science of The Total Environment, doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166537



Figure 3 : site de prélèvement des poussières de route caractérisées dans cette étude

Après séchage à 45°C, les PR ont été tamisées à 200µm sur tamis inox. La fraction granulométrique inférieure à 200µm a été calcinée au four à 550°C pendant 1h. La teneur en matière organique est égale à 12%.

Un nouvel échantillon prélevé au même endroit le 10 juin 2024 après de fortes précipitations météoriques (36 mm/3h la veille au soir) révèle une composition totalement différentes avec seulement 4% de matière organique dans les PR (également tamisées à 200 µm) .

De l'eau de chaussée a également été prélevée à l'aide d'une seringue en verre dans un "nid de poule" de la RD1504 à l'entrée du Bourget du Lac le 12 mars 2024 (après 2mm de pluie tombée dans les 24h ; la pluie précédente datant du 5 mars 2024). Cet échantillon contenait 686 mg MEST/L et 108 mg MESO/L. Le refus de filtration sur filtre en fibre de verre à seuil de coupure 0,45µm a été extrait selon le protocole décrit précédemment pour les TWP. Les particules en suspension dans l'eau, de dimension supérieure à 0,45µm, contiennent 20 µg 6PPD/gMESO. Cette concentration est comparable à celle mesurées dans les TWP préparées au laboratoire, ainsi qu'à celles mesurées pour une large gamme de pneumatiques de différents constructeurs et destinés à différents types de véhicules¹¹.

Une forte variabilité de la concentration en 6PPD est observée dans les PR. Elle pourrait être due soit à une variabilité de la concentration de TWP dans les PR, soit à une variabilité de la concentration en 6PPD dans les TWP (liés notamment à l'âge des pneumatiques ayant généré les TWP, voire à l'âge des TWP dans les PR).

Afin d'être en mesure de quantifier la masse de TWP présentes dans un échantillon environnemental par dosage de la 6PPD, il est nécessaire de déterminer le facteur principal d'influence sur la concentration en 6PPD dans la matrice analysée. La quantification des TWP a ainsi été réalisée par gravimétrie après perte au feu (à 550°C) en utilisant une image sous microscope optique des PR tamisées de l'échantillon du 20/03/24.

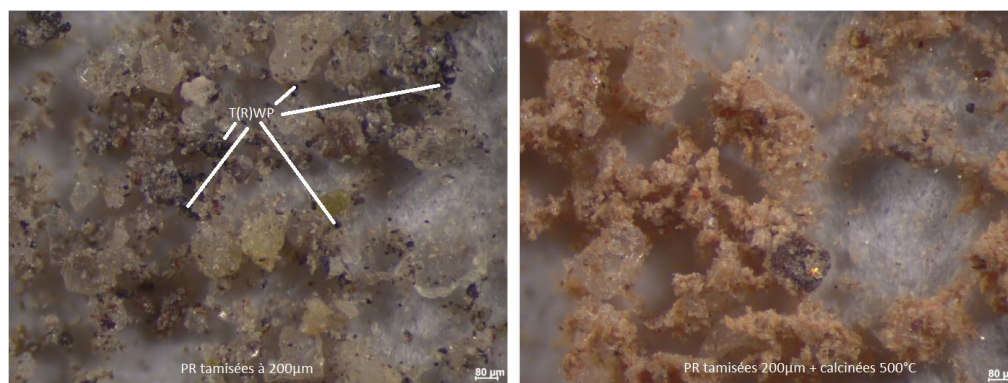


Figure 4 : images de microscopie optique de poussières de route déshydratées et tamisées à 200µm avant (gauche) et après (droite) pyrolyse à 550°C

Les particules noires observées sur l'image de gauche correspondent à la forme et la taille habituelles des T(R)WP (TWP avec inclusion de petites particules minérales issues du revêtement routier). L'image de droite a été obtenue après pyrolyse à 550°C de l'échantillon. L'absence de particules noires, ainsi que l'odeur de "pneu brûlé" perçue durant la pyrolyse, confirment la nature des particules noires : vraisemblablement des TWP. En considérant que la totalité de la masse perdue lors de la pyrolyse correspond aux TWP, les PR (<200µm) contiendraient donc 12% en masse sèche de particules d'usure de pneus, comparable aux valeurs de Eisentraut et al.¹⁶ (3.4–8.2% dw).

En revanche, les PR du 10/06/24 ne comportent que 4% de MO, dont près de 75% ne seraient pas des TW(R)P (observation microscopique non représentée). La teneur en 6PPD de ces PR est d'ailleurs extrêmement faible (0,24 µg/g), ce qui tend à confirmer la faible proportion de TWP dans cet échantillon de PR prélevé après d'intenses précipitations, qui ont probablement lessivé la chaussée et entraîné les TWP dans le fossé récepteur des eaux de ruissellement.

Un comptage sous microscopie optique des T(R)WP pourrait aussi constituer une méthodologie envisageable dans les PR. Des expérimentations ultérieures devront permettre de vérifier la faisabilité de cette quantification de TWP dans d'autres matrices (sédiments de lacs, sols, etc...) et de fiabiliser l'utilisation de la concentration en 6PPD dans ces échantillons comme proxy de la contamination par les particules d'usure de pneus.

¹⁶ Eisentraut P., et al., 2018, Two birds with one stone—fast and simultaneous analysis of microplastics: microparticles derived from thermoplastics and tire wear. Environm. Sci. Tech. Let., 5, 608-613

2. Evaluation de la stabilité de la 6PPDQ en milieu aquatique

Comme précisé ci-avant, la 6PPD présente dans les TWP s'oxyde notamment en 6PPDQ lors du contact du pneumatique avec les oxydants (O_3 et HO°) présents dans l'air au contact du pneu ou des particules érodées. Ce sous-produit d'oxydation, toxique pour les espèces piscicoles, a été quantifiée dans des eaux de ruissellement de chaussée et dans des milieux aquatiques récepteurs. Toutefois, les données relatives au devenir de la 6PPDQ en milieu aquatique sont encore rares.

Afin de déterminer la stabilité de la 6PPDQ en solution aqueuse, des solutions étalons de la molécule dissoute dans l'eau ultrapure (eau UHQ de résistivité $> 18 \text{ M}\Omega$) ont été exposées à la lumière naturelle en flacon verre, ouvert ou fermé, à différentes températures. La mesure de concentration de 6PPDQ dans l'eau est déterminée par LC MS² (après injection directe de l'échantillon aqueux selon un protocole publié¹⁷ et adapté au laboratoire EDYTEM).

temps (h)	4°C (concentration élevée - flacon fermé)	7°C (concentration élevée)	20°C (concentration élevée)	20°C (concentration faible)
0	9,62	2,31	2,63	0,81
8	-	1,99	-	0,18
24	9,32	1,52	1,07	0,07
32	-	-	-	0,01
72	8,98	1,73	0,38	<0,005
80	-	-	-	<0,005
168	7,48	1,23	-	-

Tableau 1 : évolution temporelle de la concentration de 6PPDQ en solution aqueuse dans différentes conditions

La concentration de 6PPDQ diminue rapidement au cours du temps lorsque le récipient est ouvert sur le compartiment atmosphérique. Cette diminution est d'autant plus rapide que la température de la solution est élevée. En flacon fermé et à température faible (4°C), la concentration diminue lentement (- 22 % en 7 jours). Ces constats mènent à la conclusion d'une perte principale de concentration en 6PPDQ par la volatilisation à l'interface eau-air.

Le temps de 1/2 vie de la 6PPDQ en solution aqueuse au contact de l'air est compris entre 6h et 18h (selon la concentration) à 20°C sous éclairage naturel. Ces valeurs sont inférieures à la valeur publiée par Hiki (33h à 23°C) dans une eau potable déchlorée¹⁸.

¹⁷ Xiaoli Chen et al., 2023, Analysis, environmental occurrence, fate and potential toxicity of tire wear compounds 6PPD and 6PPD-quinone, Journal of Hazardous Materials, Volume 452

¹⁸ 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. 8(9):779–784. doi: 10.1021/acs.estlett.1c00453.

Un suivi de la concentration en 6PPDQ a également été réalisée dans 500 mL d'eau UHQ mise au contact (sans agitation) des poussières de route (PR_{10juin24}) tamisées à 200µm (50 mg pour 1L eau UHQ et 10g pour 1L eau UHQ) et des particules d'usure de pneus (11 mgTWP_{Michelin}/L) dans des flacons en verre transparent fermés (20°C < température ambiante < 27°C) exposés à la lumière naturelle.

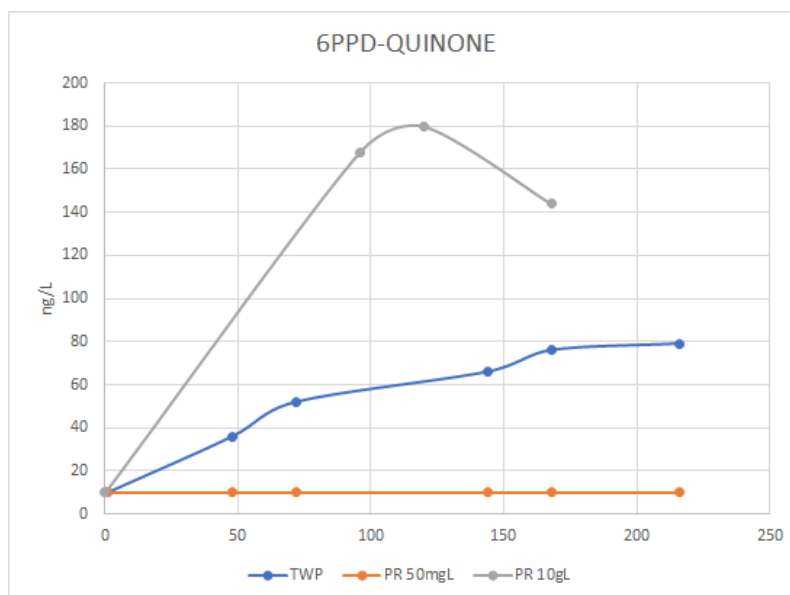


Figure 5 : Evolution temporelle de la concentration en 6PPDQ dans des suspensions aqueuses de poussières de route (PR) ou de particules d'usure de pneu (TWP)

Les concentrations détectées en solution aqueuse sont (très) faibles. Ceci est probablement lié à la faible teneur en 6PPD, tant dans l'échantillon de PR du 10/06/24 (240 ng6PPD/g) que dans les TWP du pneu Michelin (2100 ng6PPD/g). Par ailleurs, la cinétique de passage en solution de la 6PPDQ est relativement lente, comme observée par L. Fohet dans les expérimentations menées sur des TWP cryogénérées¹⁹. Lorsque les TWP sont mises en contact avec l'eau, dans des conditions proches de celles rencontrées dans l'environnement, la 6PPDQ est lixiviée progressivement ; les TWP constituent ainsi un réservoir de toxiques chimiques dans l'environnement aquatique.

Afin de s'assurer que la présence des TWP peut entraîner des concentrations suffisantes pour générer un impact toxique pour les organismes aquatiques, un dosage de 6PPD et 6PPDQ par LC MS² a été réalisé sur l'eau de ruissellement de chaussée prélevée dans un nid de poule de la D1504 à l'entrée du Bourget du Lac le 12 mars 2024. La fraction dissoute de l'échantillon contient 4,4 µg 6PPD/L et 0,6 µg 6PPDQ/L. La concentration totale (dissous + particulaire) en 6PPD atteint 12 µg6PPD/L. La concentration en 6PPDQ est donc suffisante pour induire un effet toxique chez des organismes piscicoles (la valeur 95ng/L est létale pour le saumon coho) et la teneur en 6PPD (dissoute et contenue dans la phase particulaire en suspension) constitue une réserve importante du précurseur de ce toxique. Ces valeurs imposent donc d'envisager sérieusement un apport de 6PPDQ soluble dans un écosystème aquatique susceptible d'impacter certaines espèces animales. En effet, l'évolution des concentrations en 6PPD et 6PPDQ durant 3 jours (tableau 2) révèle une diminution de la teneur en 6PPD (probablement par oxydation) mais une stabilité de la teneur en

¹⁹ Loélia Fohet, Dissémination et vieillissement des particules d'usure de pneumatiques : impacts environnementaux. thèse de doctorat Chimie analytique. Université Clermont Auvergne, 2023. NNT: 2023UCFA0056. tel-04414044

6PPDQ (vraisemblablement car volatilisation/dégradation de la molécule compensée par un nouvel apport lié à l'oxydation de la 6PPD présente en quantité suffisante).

Temps d'exposition à l'air (h)	[6PPD] µg/L	[6PPDQ] µg/L
0	4,42	0,63
5	2,92	0,61
72	0,17	0,58

Tableau 2 : évolution de la quantité dissoute dans une eau de ruissellement au contact de l'air à 25°C

3. Mise au point d'un protocole de dosage de la 6PPDQ dans les matrices biologiques

La procédure d'extraction a été adaptée de la méthode développée par Ji et al.²⁰ par extraction QuEChERS, de l'anglais "Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe", suivie d'une quantification par LC-MS². Cette procédure comporte deux étapes : une extraction solide - liquide (matrice végétale, déshydratant minéral MgSO₄ et citrate de sodium - acétonitrile) suivie d'une purification (MgSO₄ et amine secondaire) pour éliminer les sucres, les acides gras, les acides organiques et les pigments.

Après broyage dans un mortier, des œufs d'omble chevalier sont ajoutés dans le tube d'extraction avec de l'eau et de l'acétonitrile, agités sous "vortex" puis soumis aux ultrasons basse fréquence avant centrifugation. L'extrait organique est ensuite placé dans le tube de purification, vortexé et centrifugé. L'extrait est évaporé sous flux d'azote et dilué dans la phase mobile pour éviter les pics de déformations et les effets de matrice.

Un système PerkinElmer Altus® A-30 UPLC® avec colonne Quasar C18, couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle PerkinElmer QSight™ 210, est utilisé selon la méthode ci-dessous, avec eau UHQ additionnée de 0,05 % d'acide formique (solvant A) et méthanol avec 0,05 % d'acide formique (solvant B).

No	Temps	Débit (mL/min)	%A	%B
1	Initial	0,25	30	70
2	4,7	0,25	30	70
3	4,8	0,25	0	100
4	5,7	0,25	0	100
5	6,0	0,25	30	70
6	8,0	0,25	30	70
Pression	240 bars			
Température de four	40°C			
Volume injecté	10 µL			
Module échantillon	15°C			

Tableau 3 : Conditions opératoires LC MS/MS pour quantification de la 6PPDQ

Les transitions MRM et les paramètres de masse ont été optimisés par infusion dans le système triple quadripôle et sont listés dans le tableau suivant :

ESI	COMPOUND	Q1	Q3	RT	ΔRT	CE	EV	CCL2
Positive	6PPD-1	269	184	0.8	1	-39	5	-48
Positive	6PPD-2	269	212	0.8	1	-30	5	-44
Positive	6PPD quinone-1	299.3	209	3.10	1	-39	12	-84
Positive	6PPD quinone-2	299.3	175.2	3.10	1	-23	12	-52
Positive	6PPD quinone D5-1	304.3	192	3.10	1	-39	12	-84
Positive	6PPD quinone D5-2	304.3	220	3.10	1	-23	12	-52

Tableau 4 : conditions opératoires de spectrométrie de masse

²⁰ Jiawen Ji, Changsheng Li, Bingjie Zhang, Wenjuan Wu, Jianli Wang, Jianhui Zhu, Desheng Liu, Rumin Gao, Yongqiang Ma, Sen Pang, Xuefeng Li, Exploration of emerging environmental pollutants 6PPD and 6PPDQ in honey and fish samples. Food Chemistry 396, 2022, 133640

La 6PPD et la 6PPDQ ont été quantifiées à l'aide d'une courbe d'étalonnage de 0,01 à 4,5 µg/L. La méthodologie utilise une dilution d'étalon interne isotopique et une injection directe. La valeur R^2 est supérieure à 0,99.

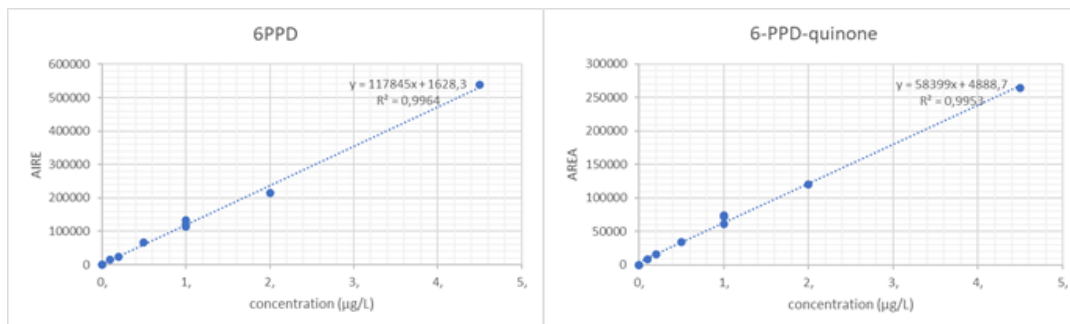


Figure 6 : droites d'étalonnage de 6PPD et 6PPDQ par LC/MSMS

Des tests ont été réalisés sur des œufs d'omble chevalier (2 g, soit une trentaine d'œufs), issus des expérimentations de contamination à la 6PPDQ par immersion dans une solution aqueuse à 0,5µg/L ou 3µg/L. La récupération des analytes a été évaluée à des concentrations de 50 ng/g et 10 ng/g. Toutes les récupérations étaient satisfaisantes et les écarts types relatifs inférieurs à 20 % pour les 2 composés.

Composé	Gamme (ng/mL)	R^2	Rapport S/B	LOQ (S/B $\geq$ 10) ng/mL	Rendement (%)	RSD (%)
6PPD	0,01-5	0,9964	303,890	0,02	69	15
6PPD-quinone	0,01-5	0,9953	399,545	0,01	106	14

Tableau 5 : caractéristiques des méthodes analytiques 6PPD et 6PPDQ

La méthode développée permet donc la quantification de la 6PPD et de la 6PPDQ sur une gamme de concentration de 0,01 à 5 ng/mL, avec une limite de quantification de 0,02 et 0,01 ng/mL respectivement.

Partie II : Effets constatés de l'exposition de l'omble-chevalier à la 6PPDQ

L'objectif principal de l'action PlastiOmble est d'apporter des connaissances relatives à l'effet de la 6PPDQ sur les premiers stades de vie de l'omble chevalier, afin d'identifier son rôle potentiel dans le déclin depuis une dizaine d'années des populations de cette espèce piscicole emblématique des grands lacs périalpins.

Les effets de la 6PPDQ ont donc été étudiés sur les premiers stades de développement de ce poisson, à deux températures d'eau différentes en vue de prendre également en compte les effets du réchauffement moyen des eaux lacustres. L'omble chevalier est un bon modèle d'étude en raison de son développement embryonnaire long dans les sédiments lacustres, site potentiel de piégeage des TWP soumises à lixiviation de la 6PPDQ qu'elles contiennent.

Ces expérimentations ont été menées dans la station d'expérimentation piscicole de l'équipe CARTEL à Thonon-les-bains, sous la responsabilité scientifique du Dr Emilie Realis.

1. Méthodologie

En raison de contraintes méthodologiques liées aux conditions d'exposition des organismes piscicoles, le protocole initialement envisagé a été modifié. Les essais d'exposition des œufs et larves à des sédiments contaminés par des TWP n'ont pu être réalisés. Par ailleurs, les concentrations en 6PPDQ ont été modifiées conformément aux valeurs récemment publiées pour les eaux naturelles.

Il a également été décidé de travailler sur deux populations génétiquement différentes : Léman et Annecy. Des ombles chevalier (21 mâles et 15 femelles) de poids moyen $858,5 \pm 65,9$ g et de taille moyenne $45,6 \pm 0,8$ cm provenaient de l'APPMA d'Annecy. D'autres géniteurs, 15 mâles ($1,5 \pm 1,7$ kg et $39,1 \pm 2,3$ cm) et 15 femelles ($2,3 \pm 0,9$ kg et $2,6 \pm 0,8$ cm), provenaient de la pisciculture de Rives. Douze (12) lots d'œufs issus de ces géniteurs d'ombles chevaliers ont été regroupés afin de minimiser l'effet parental. Ces lots d'œufs ont été divisés en deux, pour être incubés en bac thermostaté 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 ont ensuite été répartis en trois conditions de contamination par la 6 PPD-Q via la phase aqueuse, selon les valeurs publiées dans les eaux de rivière : (témoin) 0 µg/L, (seuil modéré) 1,5 µg/L et (seuil haut) 3,0 µg/L. Les organismes ont été contaminés par baignade de 6PPD-Q solubilisée dans de l'éthanol directement dans les bacs. Lors de la contamination, la circulation d'eau est interrompue pendant 48h et des bulleuses sont mises en place dans chaque aquarium.

Deux modalités de contaminations ont été réalisées : (i) soit uniquement au stade œillet, stade embryonnaire du développement du cerveau où les yeux sont visibles à travers le chorion (condition « E »), (ii) soit à chaque stade du développement embryo-larvaire (condition « EJ »).

Pour la condition EJ, une contamination a été réalisée aux stades :

- Œillet E,
- éclosion H (déterminée lorsqu'au moins 50 % des alevins quittent le chorion, c'est-à-dire la membrane qui entoure l'amnios et le sac vitellin),

- émergence EM (au moins 50 % des alevins ont une activité natatoire dans la colonne d'eau),
- alimentation mixte MF (50 % des alevins ont commencé à se nourrir de manière exogène, mais la réserve vitelline n'est pas encore résorbée),
- alimentation exogène EF (au moins 50 % des alevins ont consommé entièrement leur réserve vitelline),
- juvénile J1 (au moins 50 % des alevins ont une morphologie adulte).

Cinq périodes de développement sont définies entre ces différents stades biologiques (figure 7):

- P1 : allant de la fécondation au stade de l'éclosion,
- P2 : de l'éclosion à au stade d'émergence,
- P3 de l'émergence au stade d'alimentation mixte,
- P4 de l'alimentation mixte au stade d'alimentation exogène,
- P5 de l'alimentation exogène au stade juvénile 1.

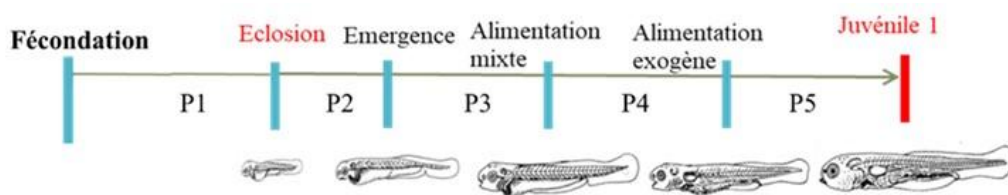


Figure 7 : stades biologiques étudiés et périodes de développement (d'après Vernier, 1969).

Les effets de la température et de la concentration en 6PPDQ ont été évalués par différents paramètres (morphologiques, comportementaux et physiologiques) détaillés ci-après.

(i) Temps de développement

La durée totale de développement pour chaque température, concentration en 6PPDQ et lac d'origine a été calculée en fin d'expérimentation comme le nombre de jours entre la fécondation et le stade juvénile. Le taux de développement en degrés-jours accumulés (ADD) a été calculé entre la fécondation et le stade juvénile 1. L'ADD est calculé comme le produit de température moyenne quotidienne x nombre de jours entre fécondation et stade juvénile 1.

La durée relative de développement (RT) entre deux stades a été calculée comme le pourcentage du temps global de développement pour le temps passé entre ces stades (en jours).

$RT = (\text{durée entre les deux étapes} \times 100) / \text{durée totale de développement}$

(ii) Taux de survie

Les œufs non fécondés (devenus blancs, opaques et vides en 24h) n'ont pas été pris en compte dans le calcul du taux de survie et retirés de l'analyse. Les œufs et les larves morts ont été retirés quotidiennement afin de calculer le taux de survie.

Le taux de mortalité (MR) entre chaque stade a été calculé pour chaque température, contamination en 6PPDQ et lac d'origine (de la fécondation au stade juvénile 1) selon $MR = 100 - (\text{nombre de morts cumulés entre deux stades biologiques} \times 100 / \text{nombre d'œufs fécondés à l'étape de fécondation})$.

(iii) Taux de malformation

Les observations ont été réalisées sous caméra (Appareil photo Nikon D5300 ; Zoom Sigma 105 mm F2.8 EX DG macro 06). Ces observations ont été réalisées sur 30 larves individualisées.

Les larves ont été classées comme bien formées ou mal formées. Les larves malformées sont identifiées comme celles présentant des malformations visibles, notamment des malformations de la colonne vertébrale (scoliose, cyphose et lordose), de la tête (mâchoire et œil) ou de la réserve vitelline (œdème).

Le taux de malformation (MF) a été calculé comme suit : $MF = (\text{nombre de larves malformées au stade biologique défini} \times 100) / 30$.

(iv) Taux de croissance spécifique (TCS)

Calculé à partir de la longueur totale (TL) et de l'efficacité d'utilisation de la réserve vitelline (EUV) selon $TCS = ((\ln(TL_{\text{à Jf}}) - \ln(TL_{\text{à Ji}})) \times 100 / (Jf - Ji))$, avec Ji le jour initial et Jf le jour final.

(v) Analyses comportementales

Elles ont été effectuées au stade émergence pour l'ensemble des conditions. Les paramètres suivants sont mesurés : vitesse de nage moyenne, distance parcourue, plus petite distance moyenne entre chaque individu (NND pour Near Neighbors Distance) et pourcentage de temps d'activité. Les tests ont été réalisés dans une arène circulaire (diamètre 30 cm - hauteur 10 cm) avec 6 cm de profondeur d'eau (de composition identique à celle du bac incubateur). Le fond de l'arène est translucide, éclairé à 5-10 lux sur le côté pour éviter les ombres des larves pendant l'enregistrement vidéo. Une acclimatation de 5 minutes est réalisée, puis les individus sont filmés 15 minutes pour chaque test à l'aide d'une caméra. Les séquences vidéo sont ensuite analysées via le logiciel @Lolitarck. L'ensemble des tests est effectué en triplica par lac/température/contamination avec 30 nouveaux alevins à chaque essai.

(vi) Paramètres physiologiques

Les larves ont été photographiées et mesurées avec le logiciel image@J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Ainsi, la longueur totale (TL) a été mesurée comme la distance entre l'extrémité de la bouche et le bout de la queue et le volume du sac vitellin a également été mesuré. Toutes les mesures ($n = 30$ alevins par lac/température/contamination) ont été effectuées sur des alevins bien formés avec une précision de 0,01 cm.

L'aire du corps (AC) et de la réserve vitelline (ASV) a été calculée entre chaque stade biologique et entre l'éclosion et le stade juvénile 1. A l'aide de ces deux paramètres, ont été calculés (i) le volume de la réserve vitelline (VSV) selon $VSV = \pi/6 \times LSV \times HSV^2$ (avec LSV la largeur de la réserve vitelline et HSV la hauteur de la réserve vitelline) et (ii) l'efficacité d'utilisation du vitellus (EUV) selon $EUV = (AC_{\text{à Jf}} - AC_{\text{à Ji}}) / (ASV_{\text{à Ji}} - ASV_{\text{à Jf}})$ avec AC aire du corps, ASV aire du sac vitellin, Ji jour initial et Jf jour final.

Les enzymes de stress oxydatif glutathion S-transférase (GST) et catalase (CAT) ont été quantifiées selon Réalis-Doyelle et al., 2023 pour 30 alevins par lac/température/contamination.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel @R v3.6.2 (R Development Core Team 2019). La température, la contamination en 6PPD-Q, le stade biologique et l'origine des animaux (lac d'origine) étaient les facteurs testés. La normalité de distribution des résultats obtenus a été testée par Kolmogorov-Smirnov. L'homogénéité des variances a été testée à l'aide du test F de Levene. Une première analyse globale est effectuée pour évaluer les effets de la température et de son interaction avec la contamination en 6PPD-Q ou le lac d'origine sur : le taux de survie, le temps de développement, le taux de malformation, les stress oxydatif (SOD) et neuronaux (AChE), l'efficacité d'utilisation de la réserve vitelline, le taux de croissance spécifique et le volume du sac vitellin ainsi que les paramètres comportementaux. Un modèle linéaire généralisé (GLMM) a alors été utilisé. La température, la contamination en 6PPD-Q et le lac d'origine ont été spécifiés comme effets fixes, tandis que l'identité du bac d'incubation a été définie comme un effet aléatoire. Puis, une seconde analyse est effectuée en prenant en compte le stade de développement. L'ensemble des résultats ont été considérés comme significatifs au seuil de $p < 0,05$. L'analyse a été suivie d'un test post hoc de Tukey pour calculer les différences par paires entre les moyennes, lorsque l'interaction entre les facteurs était significative. Tous les paramètres ont été exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

2. Résultats

A1 - Temps de développement

La durée totale (de la fécondation jusqu'au stade juvénile) est significativement différente selon les modalités de contaminations en 6PPD-Q et la température. Pour les deux populations, la contamination à 3 $\mu\text{g/L}$ de 6 PPQ à 5°C et les conditions 3EJ et 3E ont un temps de développement significativement réduit par rapport aux autres conditions (Figure 8).

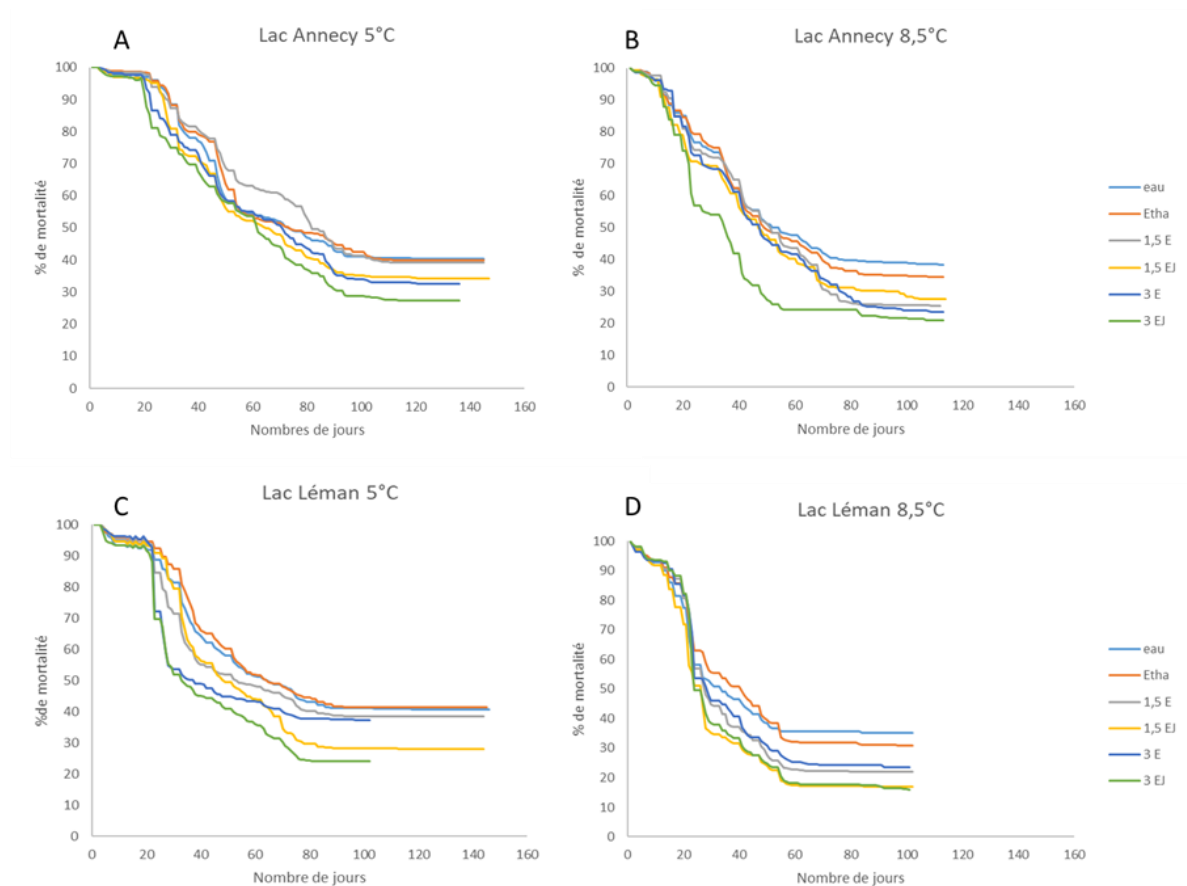


Figure 8 : Evolution temporelle du pourcentage de survie pour chaque condition. « Eau » correspond au témoin, « Etha » correspond au témoin solvant, « 1,5E » correspond à la contamination 1,5 µg/L au stade œillet, « 3E » correspond à la contamination 3 µg/L au stade œillet, « 1,5EJ » correspond à la contamination 1,5 µg/L du stade œillet à juvénile, « 3EJ » correspond à la contamination 3 µg/L du stade œillet à juvénile. « A » correspond au lac d'Annecy à 5°C, « B » correspond au lac d'Annecy à 8,5°C, « C » correspond au lac Léman à 5°C, « D » correspond au lac Léman à 8,5°C.

La durée relative du développement (RT) entre la fécondation et le stade juvénile 1 varie selon l'origine des animaux, les modalités de contamination en 6PPDQ, le stade de vie et la température (GLM : $F = 5.01$ $p < 0,01$). Les différences sont significativement différentes entre les lacs pour la période de développement P1 comprise entre fécondation et éclosion. Cette période est significativement raccourcie pour les deux lacs et pour les deux températures testées quelle que soit la contamination, à l'inverse de la période P2 comprise entre l'éclosion et l'émergence. Le Lac Léman se différencie du lac d'Annecy avec une période de développement P3, comprise entre l'émergence et l'alimentation mixte, et une période P4 entre l'alimentation mixte et exogène, rallongées pour les contaminations « 1,5EJ », « 3E » et « 3EJ » *a contrario* de la période P5 comprise entre l'alimentation exogène et juvénile (Figure 9).

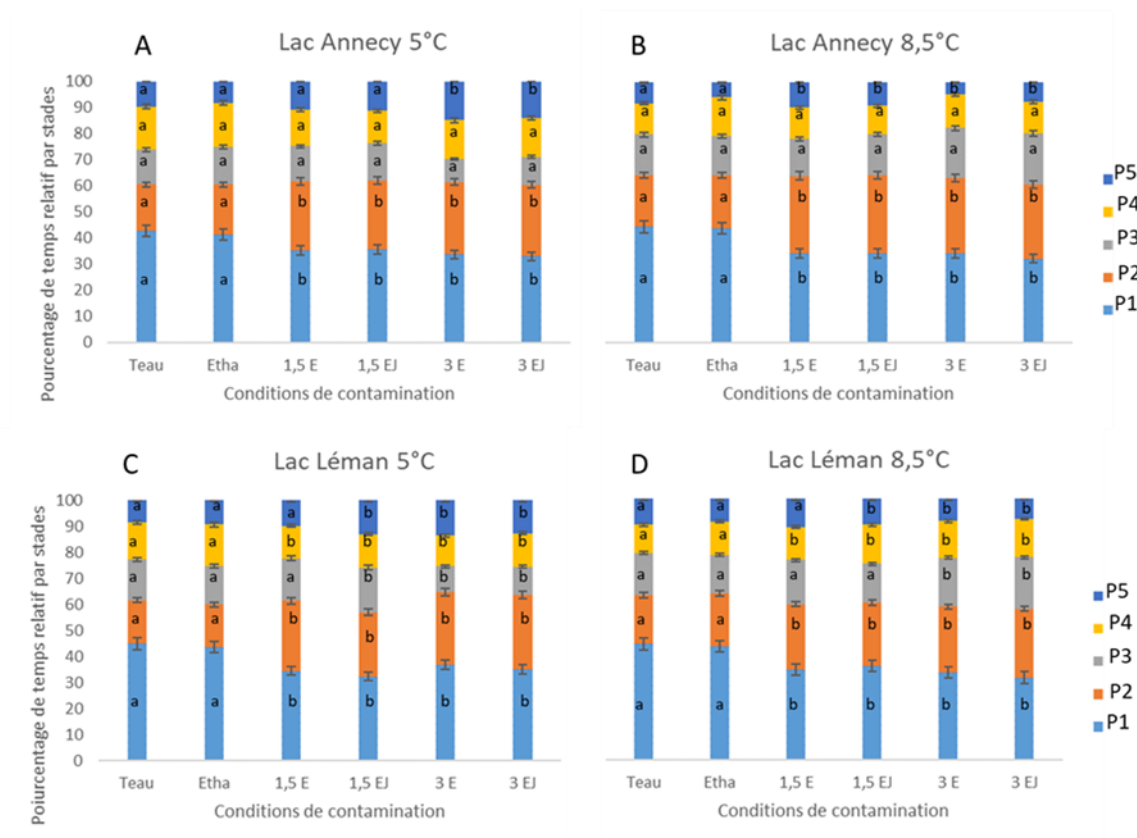


Figure 9 : Effet de la température et du temps relatif passé entre les stades biologiques (n= 6 par température). P1 = fécondation-éclosion ; P2 = éclosion-émergence ; P3 = émergence-alimentation mixte ; P4 = alimentation mixte-alimentation exogène et P5= alimentation exogène-juvénile 1. Données exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. Les lettres représentent les différences statistiques significatives (Chi 2 p < 0,05).

A2- Taux de survie

L'analyse de survie via le modèle de Cox montre un effet global de la température sur le taux de survie ($X^2 = 31.56$, $p < 0,05$) avec une diminution de la survie pour la température la plus élevée. Les taux de survie sont significativement différents en fonction de l'interaction entre la température d'incubation et le lac d'origine. Les taux de survie pour la concentration $3\mu\text{g/L}$ à $8,5^\circ\text{C}$ sont plus faibles pour le lac Léman (16%) et pour le lac d'Annecy (21%) comparé à l'incubation à température optimale de croissance (5°C) pour laquelle on observe des taux de survie de 24% et 27% respectivement. La contamination en 6PPDQ et la température ont aussi un impact significatif sur le taux de mortalité par stade. La période la plus critique se situe entre fécondation et éclosion ou entre éclosion et émergence pour $3\mu\text{g/L}$ à $8,5^\circ\text{C}$.

A3- Taux de malformation

Le taux de malformation est significativement différent selon la contamination en 6PPDQ, le stade de vie et la température. Le pourcentage d'alevins malformés est le plus élevé pour la température à 5°C comparé à $8,5^\circ\text{C}$ pour les populations d'Annecy et Léman, quelle que soit la contamination à

l'éclosion. Pour les autres stades de vie, le taux de malformation s'élève avec l'augmentation de température pour les deux populations et pour toutes les concentrations en 6PPDQ (Tableau 6).

	Lac Annecy											
	5°C						8,5°C					
Taux de malformation	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ
Eclosion	2,54 ± 0,04 a	7,5 ± 2,3 b	10 ± 0,19 c	22,5 ± 0,45 d	11,62 ± 0,22 c	20 ± 0,36 d	2,5 ± 0,04 a	6,75 ± 0,6 b	6,67 ± 0,90 b	25 ± 0,40 c	13,30 ± 0,23 d	19,04 ± 0,31 c
Emergence	2,55 ± 0,18 a	1,52 ± 0,34 a	12,12 ± 0,38 b	10,54 ± 1,65 b	25,25 ± 4,2 c	25,00 ± 0,09 c	2,05 ± 0,04 a	2,50 ± 0,04 a	2,56 ± 0,04 a	2,56 ± 0,04 a	25,70 ± 0,06 b	28,5 ± 0,49 b
Alimentation mixte	0	2,50 ± 0,04 a	10,00 ± 2,9 b	2,52 ± 0,05 a	5,6 ± 0,1 c	33,3 ± 3,3 d	2,5 ± 0,35 a	0	12,50 ± 0,23 b	15,25 ± 0,27 b	10,00 ± 3,60 c	9,75 ± 0,18 c
Alimentation Exogène	0	0	6,25 ± 0,11 a	9,90 ± 0,15 b	3,67 ± 1,5 c	36,6 ± 0,66 d	0	0	2,50 ± 0,05 a	7,50 ± 0,14 b	2,50 ± 0,50 a	36,3 ± 5,80 c
Juvenile	0	0	0	5,00 ± 0,10 a	11,23 ± 0,21 b	18,12 ± 0,33 c	2,50 ± 0,4 a	2,50 ± 0,43 a	5,00 ± 0,04 b	2,50 ± 0,40 a	2,50 ± 0,04 a	12,5 ± 0,22 b
	Lac Léman											
	5°C						8,5°C					
Taux de malformation	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ
Eclosion	1,25 ± 0,01 a	2,52 ± 0,3 b	2,56 ± 0,04 b	5,01 ± 0,05 c	2,52 ± 0,04 b	5,88 ± 0,11 c	10,50 ± 0,20 a	8,58 ± 1,5 a	30,52 ± 0,48 b	11,11 ± 0,18 c	20,00 ± 0,32 d	77,12 ± 0,84 e
Emergence	2,50 ± 0,04 a	2,50 ± 0,04 a	10,03 ± 1,10 b	5,32 ± 0,75 c	5,80 ± 1,30 c	12,5 ± 0,41 d	2,5 ± 0,61 a	2,5, ± 1,20 a	1,30 ± 0,65 b	2,56 ± 0,040 a	10,81 ± 0,570 b	36,11 ± 13,20 c
Alimentation mixte	2,50 ± 0,04 a	0	5,21 ± 1,50 b	0	6,60 ± 0,09 b	15,85 ± 0,27 c	0	2,50 ± 0,04 a	2,55 ± 0,04 a	21,10 ± 3,40 b	20,75 ± 0,48 b	33,50 ± 8,30 c
Alimentation Exogène	0	2,55 ± 0,42 a	3,12 ± 0,60 a	16,6 ± 2,30 b	15,78 ± 2,7 b	15,50 ± 1,3 b	0	0	5,69 ± 0,06 a	2,50 ± 0,04 b	10,75 ± 0,19 c	10,52 ± 0,20 c
Juvenile	0	0	2,50 ± 0,40 a	2,50 ± 0,45 a	10,56 ± 0,18 b	12,78 ± 1,40 b	0	0	5,15 ± 0,01 a	2,56 ± 0,04 b	5,58 ± 0,05 a	2,50 ± 0,04 b

Tableau 6 : Malformations observées. Teau témoin, Tetha témoin solvant, 1,5E 1,5 µg/L au stade œillet, 3E 3 µg/L au stade œillet, 1,5EJ 1,5 µg/L du stade œillet à juvénile, 3EJ 3 µg/L du stade œillet à juvénile. Données exprimées en moyenne ± écart-type. Les lettres représentent les différences statistiques significatives (p< 0.05) obtenues par le test de Student.

A-4 Taux de croissance spécifique

Le taux de croissance spécifique entre l'éclosion et le stade juvénile 1 est significativement impacté par l'origine des poissons, les modalités de contamination en 6 PPDQ et la température. Le taux de croissance spécifique est plus élevé chez les larves témoins des lacs Annecy et Léman incubées à 8,5°C (Figure 10). Pour le lac d'Annecy, le taux de croissance spécifique par rapport au témoin « eau » diminue avec la contamination en 6 PPDQ quelle que soit la concentration. Néanmoins pour la contamination à 3µg/L, le taux de croissance spécifique se distingue par une augmentation. Une tendance identique est observée pour le lac Léman à 8,5°C.

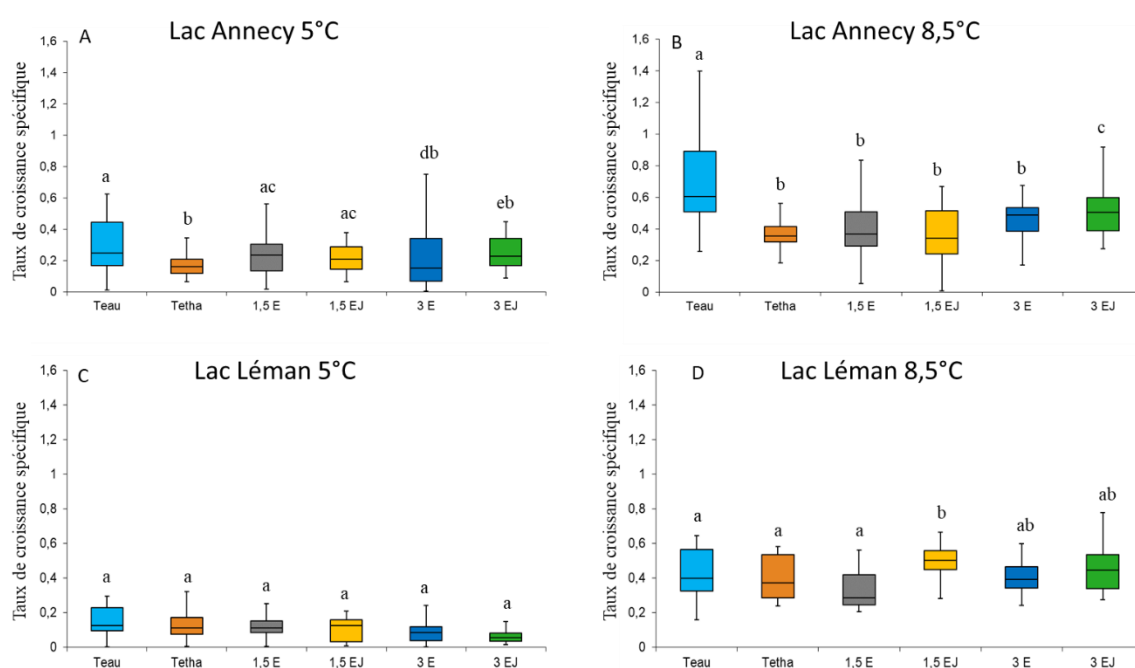


Figure 10 : Taux de croissance spécifique pour chaque population aux deux températures testées. Teau témoin, Tetha témoin solvant, 1,5 E 1,5 µg/L au stade œillet, 3 E 3 µg/L au stade œillet, 1,5 EJ 1,5 µg/L du stade œillet à juvénile, 3 EJ 3 µg/L du stade œillet à juvénile. Données exprimées en moyenne ± écart-type. Les lettres représentent les différences statistiques significatives ($p < 0.05$) obtenues par le test de Student.

B-1 Activité

La distance parcourue, la vitesse moyenne et l'accélération moyenne sont significativement impactées par l'interaction entre le lac d'origine, la température et la contamination en 6 PPDQ. Pour les deux lacs, la distance moyenne diminue à 5°C pour les contaminations en 6PPDQ : 1,5 EJ, 3 EJ et 3 E. A l'inverse, la distance moyenne parcourue augmente pour ces mêmes modalités à 8,5°C (Figure 11).

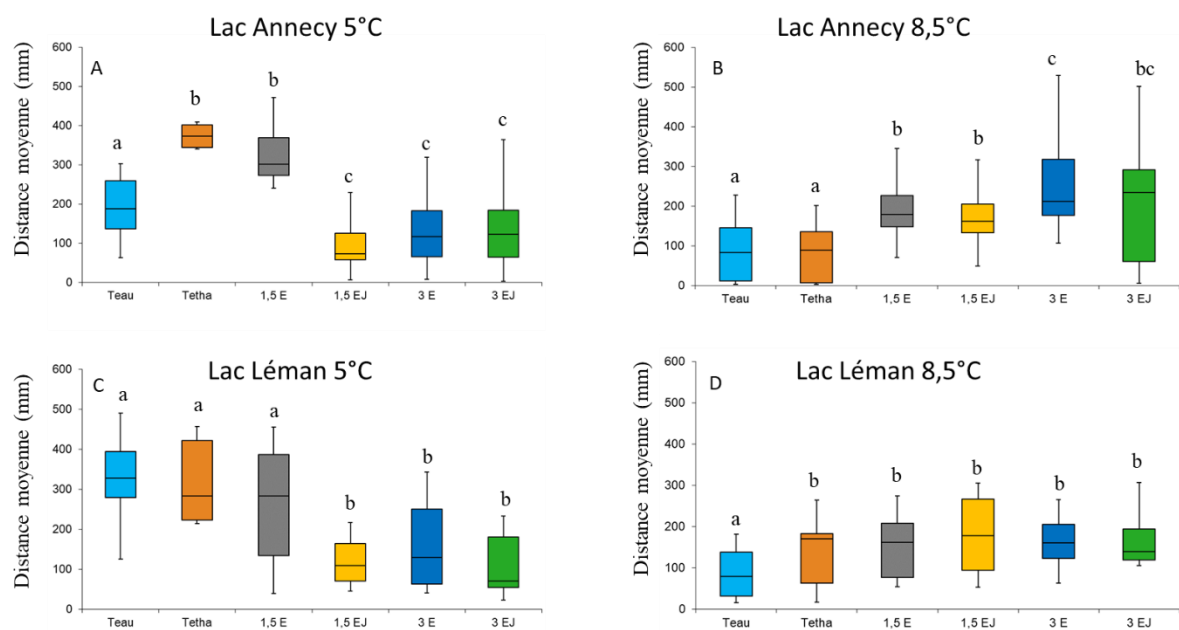


Figure 11 : Distance moyenne parcourue par les larves. Teau témoin, Tetha témoin solvant, 1,5 E 1,5 µg/L au stade œillet, 3 E 3 µg/L au stade œillet, 1,5 EJ 1,5 µg/L du stade œillet à juvénile, 3 EJ 3 µg/L du stade œillet à juvénile. Données exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. Les lettres représentent les différences statistiques significatives ($p < 0.05$) obtenues par le test de Student.

C-1 Paramètres de performance

Le volume de la réserve vitelline est significativement impacté par l'interaction entre la température, l'origine, le stade de vie et la contamination en 6 PPDQ. Le volume du sac vitellin est plus important avec contamination pour le lac d'Annecy à 8,5°C par rapport au témoin eau. Pour les deux lacs au stade d'alimentation mixte, la réserve vitelline est moins consommée que pour le témoin eau quelle que soit la contamination en 6PPDQ (Tableau 7).

	Lac Annecy											
	5°C						8,5°C					
Volume du sac vitellin	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ
Eclosion	0,483 ± 0,030 a	0,484 ± 0,080 a	0,502 ± 0,054 b	0,490± 0,026 b	0,492 ± 0,031 b	0,484 ± 0,035 a	0,486 ± 0,039 a	0,504 ± 0,021 b	0,493 ± 0,035 b	0,491 ± 0,030 b	0,491 ± 0,032 b	0,493 ± 0,024 b
Emergence	0,460 ± 0,017 a	0,473 ± 0,028 b	0,497 ± 0,094 c	0,491 ± 0,072 c	0,481 ± 0,025 b	0,479 ± 0,026 b	0,429 ± 0,065 a	0,449 ± 0,040 b	0,468 ± 0,030 c	0,467 ± 0,021 c	0,464 ± 0,024 c	0,470 ± 0,038 c
Alimentatio n mixte	0,412 ± 0,091 a	0,465 ± 0,080 b	0,434 ± 0,017 c	0,484 ± 0,023 d	0,355 ± 0,031 e	0,387 ± 0,016 f	0,366 ± 0,012 a	0,442 ± 0,059 b	0,451 ± 0,040 b	0,413 ± 0,059 c	0,426 ± 0,052 c	0,433 ± 0,070 c
	Lac Léman											
	5°C						8,5°C					
Volume du sac vitellin	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ
Eclosion	0,578 ± 0,039 a	0,571 ± 0,034 a	0,581 ± 0,04 b	0,567 ± 0,050 a	0,572 ± 0,04 a	0,561± 0,11 a	0,582 ± 0,035 a	0,572 ± 0,050 a	0,559 ± 0,36 b	0,563 ± 0,045 c	0,554 ± 0,052 d	0,579 ± 0,029 a
Emergence	0,577 ± 0,030 a	0,555 ± 0,028 b	0,570 ± 1,1 c	0,567 ± 0,75 c	0,562± 1,3 b	0,546 ± 0,4 c	0,561 ± 0,027 a	0,566 ± 0,027 a	0,553 ± 0,029 b	0,542 ± 0,022 a	0,536 ± 0,032 b	0,558 ± 0,072 c
Alimentatio n mixte	0,533 ± 0,049 a	0,463 ± 0,046 b	0,560 ± 1,50 c	0,546 ± 0,067 c	0,537 ± 0,09 c	0,540 ± 0,27 c	0,411 ± 0,150 a	0,523 ± 0,048 b	0,512 ± 0,052 b	0,513 ± 0,034 b	0,508 ± 0,054 b	0,550 ± 0,036 c

Tableau 7 : Volume de la réserve vitelline des larves. Teau témoin, Tetha témoin solvant, 1,5 E 1,5 µg/L au stade œillet, 3 E 3 µg/L au stade œillet, 1,5 EJ 1,5 µg/L du stade œillet à juvénile, 3 EJ 3 µg/L du stade œillet à juvénile. Données exprimées en moyenne ± écart-type. Les lettres représentent les différences statistiques significatives (p< 0.05) obtenues par le test de Student.

L'efficacité d'utilisation totale de la réserve vitelline est impactée par l'interaction entre l'origine des larves, les modalités de contamination en 6 PPDQ et la température. L'efficacité d'utilisation du

sac vitellin augmente pour les individus du Léman et d'Annecy avec la température et la concentration en 6PPDQ pour les conditions 1,5EJ, 3 E et 3EJ. Inversement, l'efficacité d'utilisation du sac vitellin diminue avec la concentration en 6PPDQ à 5°C pour les individus du Léman (Tableau 8).

	5°C						8,5°C					
EU	Teau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ	Teau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ
Lac Annecy	1,11 ± 0,28 a	1,13 ± 0,40 a	1,30 ± 0,66 a	1,40 ± 0,31 a	1,28 ± 0,16 a	1,64 ± 0,36 a	1,11 ± 0,38 a	1,01 ± 0,38 a	1,21 ± 0,28 b	1,23 ± 0,36 b	1,31 ± 0,34 b	1,40 ± 0,34 b
Lac Léman	1,10 ± 0,35 a	1,12 ± 0,53 a	0,70 ± 0,39 b	0,69 ± 0,21 b	0,73 ± 0,64 b	0,75 ± 0,22 b	1,09 ± 0,30 a	1,05 ± 0,25 a	1,28 ± 0,28 b	1,38 ± 0,24 b	1,30 ± 0,34 b	1,24 ± 0,25 b

Tableau 8 : Efficacité de l'utilisation de la réserve vitelline. Teau témoin, Tetha témoin solvant, 1,5 E 1,5 µg/L au stade œillet, 3 E 3 µg/L au stade œillet, 1,5 EJ 1,5 µg/L du stade œillet à juvénile, 3 EJ 3 µg/L du stade œillet à juvénile. Données exprimées en moyenne ± écart-type. Les lettres représentent les différences statistiques significatives ($p < 0.05$) obtenues par le test de Student.

L'interaction entre l'origine des animaux, les modalités de contamination en 6 PPDQ et la température impacte de façon significative la longueur totale à l'éclosion. Pour les deux lacs, la longueur totale à l'éclosion diminue avec la température pour les témoins. Pour le lac d'Annecy, la longueur à l'éclosion diminue pour 3µg/L EJ à 5°C et pour toutes les modalités de contamination à 8,5°C. A l'inverse pour les individus issus du Léman, la taille à l'éclosion est augmentée avec la contamination en 6PPDQ quelle que soit la température (Figure 12).

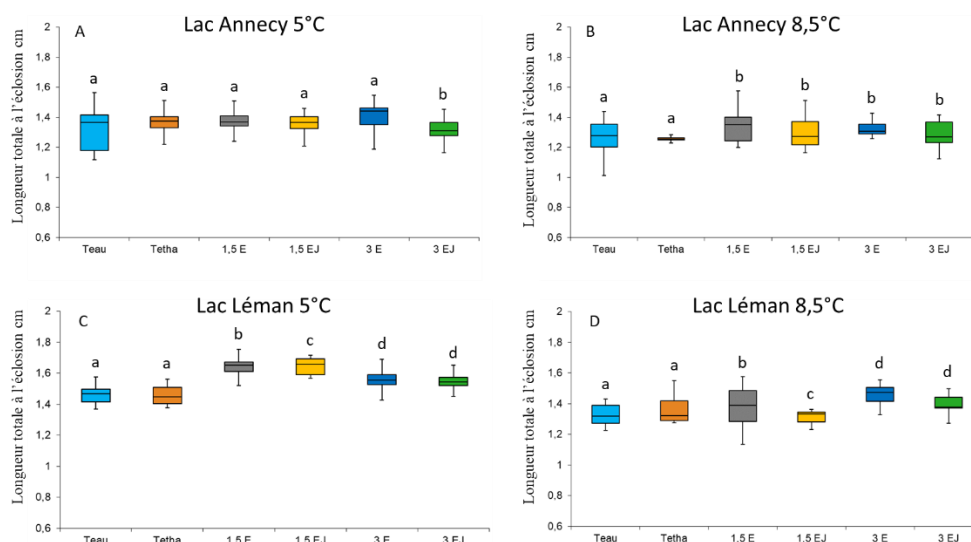


Figure 12 : Longueur totale des larves à l'éclosion. Teau témoin, Tetha témoin solvant, 1,5 E 1,5 µg/L au stade œillet, 3 E 3 µg/L au stade œillet, 1,5 EJ 1,5 µg/L du stade œillet à juvénile, 3 EJ 3

µg/L du stade œillet à juvénile. Données exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. Les lettres représentent les différences statistiques significatives ($p < 0.05$) obtenues par le test de Student.

C-2 Analyses de stress oxydatif

L'enzyme de stress GST est significativement impactée par l'interaction entre l'origine, les modalités de contamination en 6 PPDQ, la température et le stade de vie des poissons. L'activité de la GST à 5°C pour le lac d'Annecy augmente avec la contamination en 6PPDQ. L'augmentation la plus importante est observée pour la contamination au stade juvénile pour la modalité 3 EJ. A contrario, l'activité de la GST à 8,5°C pour le lac d'Annecy est augmentée avec la contamination pour les stades éclosion, émergence et alimentation mixte. L'augmentation la plus importante est observée pour le stade émergence avec la condition de contamination à 3 EJ. A contrario, pour les stades alimentation exogène et juvénile l'activité de la GST est la plus faible. Pour le lac Léman, l'activité de la GST augmente avec la contamination en 6PPDQ quels que soient le stade et la température. Cette augmentation est plus importante pour les larves incubées à 8,5°C et pour la modalité de contamination 3 EJ (Tableau 9).

Lac Annecy												
	5°C						8,5°C					
GST (nmol/min/mg frais)	T eau	T etha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ	T eau	T etha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ
Eclosion	6,20 ± 2,45 a	6,85 ± 3,54 a	5,69 ± 3,22 a	12,5 ± 3,21 b	7,73 ± 1,36 a	11,3 ± 3,81 b	2,77 ± 1,02 a	4,30 ± 1,2 b	5,05 ± 0,91 b	4,22 ± 2,04 b	5,88 ± 2,26 b	5,06 ± 3,54 b
Emergence	0,92 ± 3,71 a	2,41 ± 1,52 b	2,92 ± 2,02 b	7,29 ± 1,12 c	4,59 ± 1,14 d	12,12 ± 6,01 e	1,06 ± 0,08 a	2,86 ± 1,5 a	4,81 ± 2,09 b	5,15 ± 2,20 b	4,30 ± 2,45 b	17,69 ± 5,89 c
Alimentation mixte	2,5 ± 1,4 a	5,83 ± 3,56 b	6,49 ± 3,76 b	9,80 ± 2,9 c	11,4 ± 3,31 c	10,41 ± 4,56 c	2,5 ± 0,35 a	3,79 ± 1,58 a	7,29 ± 2,29 b	3,67 ± 3,17 a	6,70 ± 2,12 b	5,15 ± 1,42 b
Alimentation Exogène	4,71 ± 3,21 a	4,74 ± 1,88 a	11,1 ± 2,06 b	9,9 ± 2,03 b	8,54 ± 1,5 b	10,4 ± 3,47 b	2,65 ± 1,73 a	3,45 ± 2,52 a	13,41 ± 7,19b	8,74 ± 3,33 c	6,30 ± 4,78 d	2,64 ± 1,74 a
Juvenile	3,28 ± 1,45 a	4,09 ± 0,76 a	6,90 ± 3,05 b	7,87 ± 2,27 b	10,6 ± 2,03 c	18,1 ± 3,47 d	6,70 ± 2,56 a	6,60 ± 2,77 a	5,37 ± 2,26 b	4,37 ± 1,16 b	6,71 ± 1,48 a	2,13 ± 0,76 c
Lac Léman												
	5°C						8,5°C					
GST	T eau	T etha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ	T eau	T etha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ
Eclosion	3,65 ± 0,61 a	3,21 ± 1,24 a	3,94 ± 1,14 a	6,71 ± 3,21 b	6,56 ± 2,25 b	8,48 ± 2,2 b	3,79 ± 2,04 a	4,52 ± 1,02 a	12,54 ± 2,59 b	6,27 ± 3,64 c	5,54 ± 1,45 c	15,52 ± 1,66 b
Emergence	1,55 ± 0,60 a	1,54 ± 1,8 a	15,9 ± 1,65 b	2,65 ± 1,11 c	4,96 ± 2,05 d	19,9 ± 3,51 e	3,64 ± 1,02 a	2,04 ± 1,2 a	6,85 ± 1,86 b	6,56 ± 1,60 b	2,04 ± 1,66 a	8,45 ± 3,49 c
Alimentation mixte	3,50 ± 1,25 a	4,06 ± 1,32 a	4,96 ± 1,50 a	9,04 ± 0,53 b	3,21 ± 2,21 a	6,56 ± 3,22 c	2,62 ± 1,16 a	3,95 ± 2,04 a	11,81 ± 3,9 b	9,33 ± 4,34 b	5,54 ± 1,16 c	7,87 ± 2,25 d
Alimentation Exogène	2,5 ± 0,04 a	3,50 ± 1,3 a	10,5 ± 2,56 b	8,46 ± 2,3 c	NA	9,46 ± 2,3 c	3,46 ± 2,03 a	4,22 ± 1,02 a	7,87 ± 2,71 b	6,12 ± 2,04 b	19,24 ± 4,04 c	16,32 ± 4,56 c
Juvenile	4,56 ± 1,24 a	3,59 ± 0,41 a	11,2 ± 2,49 b	6,09 ± 1,44 c	10,5 ± 2,68 b	12,4 ± 3,12 b	3,06 ± 1,60 a	3,70 ± 3,49 a	15,74 ± 8,74 b	11,08 ± 8,74 c	12,25 ± 4,46 c	22,16 ± 5,67 d

Tableau 9 : Activité de la GST. Teau témoin, Tetha témoin solvant, 1,5E 1,5 µg/L au stade œillet, 3E 3 µg/L au stade œillet, 1,5EJ 1,5 µg/L du stade œillet à juvénile, 3EJ 3 µg/L du stade œillet à juvénile. Données exprimées en moyenne ± écart-type. Les lettres représentent les différences statistiques significatives (p< 0.05) obtenues par le test de Student.

Les modalités de contamination en 6PPDQ et le stade de vie des animaux impactent significativement l'activité enzymatique de la catalase. L'activité de la catalase est augmentée avec la contamination en 6PPDQ pour les larves issues des deux lacs. L'activité la plus importante de la catalase est observée pour la modalité 3EJ, excepté pour le stade juvénile à 8,5°C d'Annecy, où cette activité est équivalente à celle retrouvé chez les témoins (Tableau 10).

Lac Annecy												
	5°C						8,5°C					
Catalase (nmol/min/mg protéines)	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ
Eclosion	0,99 ± 0,012a	0,66 ± 0,09 a	2,69 ± 0,08 b	0,138 ± 0,62a	3,64 ± 1,60 b	1,93 ± 0,02 b	1,13 ± 1,51 a	1,05 ± 0,61 a	0,96 ± 1,56 a	4,22 ± 1,37 b	5,14 ± 2,26 b	4,81 ± 1,23 b
Emergence	2,82 ± 0,02 a	1,03 ± 0,76 a	6,06 ± 0,266b	7,72 ± 3,71 b	0,67 ± 0,265 b	7,05 ± 3,21 b	5,08 ± 3,71 a	5,34 ± 3,79 a	6,06 ± 2,40 a	NA	13,0 ± 3,73 b	15,29 ± 1,56 b
Alimentation mixte	10,23 ± 4,56 a	12,7 ± 4,45 a	16,25 ± 2,25 b	19,4 ± 2,11 c	19,4 ± 2,15 c	25,0 ± 10,2 d	12,8 ± 4,96 a	9,30 ± 2,09 a	23,93 ± 9,77 b	24,7 ± 6,9 b	29,4 ± 7,4 c	32,07 ± 16,57 c
Alimentation Exogène	22,1 ± 5,21 a	21,4 ± 14,2 a	36,9 ± 12,5 b	37,47 ± 5,26 b	41,5 ± 1,5 c	40,4 ± 2,15 c	31,67 ± 15,59 a	33,3 ± 13,0 a	35,2 ± 8,0 a	31,4 ± 6,4 a	34,0 ± 6,2 a	42,35 ± 9,44 b
Juvenile	14,9 ± 3,45 a	15,9 ± 8,2 a	18,2 ± 10,3 b	17,2 ± 2,0 b	25,7 ± 10,2 c	27,3 ± 6,1 c	14,12 ± 2,93 a	18,5 ± 6,2 a	31,18 ± 16,57 b	35,0 ± 12,5 b	26,6 ± 15,0 c	20,4 ± 6,4 a
Lac Léman												
	5°C						8,5°C					
GST (nmol/min/mg protéines)	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ	T eau	Tetha	1, 5 E	1,5 EJ	3 E	3 EJ
Eclosion	1,30 ± 0,62 a	0,822 ± 0,36 a	3,45 ± 1,57 b	NA	2,55 ± 1,52 b	3,30 ± 1,75 b	2,57 ± 1,26 a	1,58 ± 0,15 a	1,42 ± 1,158 a	NA	4,93 ± 1,69 b	7,96 ± 1,39 c
Emergence	1,01 ± 0,34 a	1,07 ± 0,15 a	3,98 ± 0,84 b	5,02 ± 2,89 c	2,08 ± 0,56 d	10,8 ± 5,04 e	6,22 ± 1,56 a	5,54 ± 2,53 a	8,19 ± 0,54 b	19,02 ± 0,43 c	16,42 ± 2,45 d	15,20 ± 3,12 d
Alimentation mixte	12,2 ± 5,23	10,35 ± 1,32 a	18,1 ± 4,3b	19,0 ± 10,2 b	18,7 ± 1,35 b	27,7 ± 5,32 c	11,22 ± 2,55 a	11,95 ± 7,04 a	14,31 ± 3,18 a	12,62 ± 0,89 a	42,5 ± 8,3 b	37,7 ± 10,2 b
Alimentation Exogène	22,0 ± 2,03 a	24,6 ± 6,3 a	36,0 ± 5,02 b	38,46 ± 3,42 b	36,8 ± 10,2 b	33,8 ± 7,53 b	18,80 ± 6,08 a	21,66 ± 9,23 a	25,8 ± 2,42 b	27,0 ± 4,8 b	28,8 ± 2,63 b	30,4 ± 2,36 b
Juvenile	12,5 ± 3,56 a	14,04 ± 1,05 a	16,5 ± 2,02 b	19,7 ± 6,21 b	29,2 ± 2,31 c	32,5 ± 12,2 c	16,5 ± 3,43 a	20,24 ± 1,35 a	43,9 ± 10,5 b	51,9 ± 6,3 c	59,1 ± 5,67 d	69,06 ± 2,93 e

Tableau 10 : Activité de la catalase. Teau témoin, Tetha témoin solvant, 1,5 E 1,5 µg/L au stade œillet, 3E 3 µg/L au stade œillet, 1,5 EJ 1,5 µg/L du stade œillet à juvénile, 3EJ 3 µg/L du stade

œillet à juvénile. Données exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. Les lettres représentent les différences statistiques significatives ($p < 0.05$) obtenues par le test de Student.

3. Discussion

Cette étude met en lumière l'effet combiné de la contamination en 6PPDQ et d'une élévation de la température de l'eau sur les premiers stades de la vie de l'omble chevalier, de façon différenciée selon l'origine des individus. Des effets potentialisateurs de la température sur la contamination en 6PPDQ ont été montrés pour de nombreux paramètres, tels que le taux de malformations, l'efficacité d'utilisation de la réserve vitelline, le taux de croissance spécifique, le temps de développement, l'activité et le stress (évalué par l'activité de GST).

Paramètres biodémographiques

La température, combinée à la contamination en 6PPDQ, impacte de façon synergique le temps de développement des larves d'omble chevalier selon le stade biologique et l'origine des animaux. L'effet de la température est largement référencé dans la littérature^{21 22 23 24 25 26}, ainsi que son impact sur la proportion de temps entre les stades de développement^{27 28 29}.

La température et le stade de vie contribuent de façon additive à la diminution de la survie. Le taux de survie diminue également quelle que soit l'origine des géniteurs par contamination en 6PPDQ pour la modalité 3EJ. Pour les larves issues des géniteurs du lac d'Annecy, les taux de survie à 8,5°C sont plus élevés (21%) par rapport à celles issues du lac Léman (16%). De plus, pour les individus issus du lac Léman, la modalité de contamination EJ se détache significativement de la modalité de contamination E, avec un surplus de mortalité lorsque la contamination est renouvelée à chaque stade biologique des individus. Le stade de vie le plus impacté, quel que soit le lac et la température, se situe entre la fécondation et le stade œillet, période décrite comme particulièrement sensible dans la littérature. La diminution de la survie peut s'expliquer par une

²¹ Wood H. 1932. The effect of temperature on the growth and respiration of fish embryos (*Salmo fario*). The Journal of Experimental Biology, 9, 271-275.

²² Embury G. 1934. Relation of temperature to the incubation periods of eggs of four species of trout. Transactions of the American Fisheries Society, 64, 281-292.

²³ Jungwirth, M., Winkler, H. 1984. The temperature dependence of embryonic development of grayling (*Thymallus thymallus*), danube salmon (*Hucho hucho*), arctic char (*Salvelinus alpinus*) and brown trout (*Salmo trutta fario*). Aquaculture, 38, 315-327.

²⁴ Ojanguren, A.F., Braña, F. 2003. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. Journal of Fish Biology, 62, 580-590.

²⁵ Lahnsteiner, F. 2012. Thermotolerance of brown trout, *Salmo trutta*, gametes and embryos to increased water temperatures. Journal of Applied Ichthyology, 28, 745-751

²⁶ Réalis-Doyelle E., 2016. Influence de la température sur les premiers stades de vie de trois espèces de poissons dulcicoles : étude de la survie et de la plasticité phénotypique, thèse de doctorat, Univ Lorraine, <https://www.theses.fr/2016LORR0272>

²⁷ Damsgard, B., Evensen, TH., Overli, O., Gorissen, M., Ebbesson, LOE., Rey, S., Hoglund, E., 2019 Proactive avoidance behaviour and pace-of-life syndrome in Atlantic salmon. R Soc Open Sci. 6(3):181859.

²⁸ Blaxter, J. H. S. 1991. The effect of temperature on larval fishes. Netherlands Journal of Zoology, 42(2-3), 336-357. <https://doi.org/10.1163/156854291X00379>

²⁹ Kamler, E. 2002. Ontogeny of yolk-feeding fish : an ecological perspective. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 12, 79-103. <https://doi.org/10.4324/9781315044569>

diminution de l'intégrité de la membrane cellulaire des organismes lors de l'accumulation de polluants organiques, conduisant à une diminution de l'activité de la cellule voire sa mort³⁰. La littérature rapporte des effets contrastés de la contamination en 6PPDQ seule en fonction de l'espèce et de la dose testée^{31 32 33 34 35}.

Les résultats obtenus dans ce projet montrent un effet synergique de la température et de la 6PPDQ sur le taux de malformation, différant selon l'origine des poissons (Annecy vs Léman). Une augmentation des malformations à l'éclosion et à l'émergence est observée quel que soit le lac d'origine. Cette augmentation est accentuée par élévation de la température uniquement pour les poissons issus du lac Léman. Pour ceux provenant du lac d'Annecy, le taux de malformation est le plus élevé pour la modalité 3EJ. En revanche, le taux de malformation des individus issus du lac Léman est identique pour la modalité 3E au stade « alimentation exogène » aux deux températures et au stade « juvénile » à 5°C.

Paramètres comportementaux

L'activité des larves est modifiée par contamination à la 6PPDQ, de façon synergique avec la température, quelle que soit l'origine des individus. L'activité des larves est diminuée pour les modalités de contamination 1.5EJ, 3E et 3EJ à 5°C (température optimale de croissance embryonnaire). Cette diminution est aussi rapportée dans la littérature suite à une contamination de *Danio rerio*³⁶. Ji et al ont observé une diminution de la vitesse et de la distance de déplacement, ainsi qu'une diminution des niveaux d'acétylcholine, expliquant en partie les changements de comportement moteur. La modification de comportement après exposition aiguë à la 6PPDQ pourrait être associée à des altérations neurotoxiques. L'hypoactivité induite par l'exposition à des concentrations non létales peut affecter le budget énergétique des organismes au détriment de leur croissance et de leur reproduction, mais aussi leur migration, leur comportement de recherche d'abri, leur comportement d'évitement, voire leur alimentation.

³⁰ Foekema, E. Parron, MP. Mergia, M. Carolus, E. Berg J., Kwadijk, C. Dao, Q. Murk, A. 2022. Internal effect concentrations of organic substances for early life development of egg-exposed fish, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 101, 2014, 14-22, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.006>.

³¹ Tian Z, Zhao H, Peter KT, Gonzalez M, Wetzel J, Wu C, *et al.* A ubiquitous tire rubber-derived chemical induces acute mortality in coho salmon. *Science* 2021;371(6525):185-9.

³² Tian Z, Gonzalez M, Rideout CA, Zhao HN, Hu X, Wetzel J, *et al.* 6PPD-Quinone: Revised Toxicity Assessment and Quantification with a Commercial Standard. *Environ Sci Technol Lett* 2022;9(2):140-6

³³ 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>.

³⁴ Varshney S, Gora AH, Siriappagounder P, Kiron V, Olsvik PA. Toxicological effects of 6PPD and 6PPD quinone in zebrafish larvae. *Journal of Hazardous Materials* 2022;424:127623.

³⁵ Brinkmann M, Montgomery D, Selinger S, Miller JGP, Stock E, Alcaraz AJ, *et al.* Acute Toxicity of the Tire Rubber-Derived Chemical 6PPD-quinone to Four Fishes of Commercial, Cultural, and Ecological Importance. *Environ Sci Technol Lett* 2022;9(4):333-8.

³⁶ Ji, J. Jinze Huang, Cao, N. Hao, X. Wu, Y. Ma, Y. An, D. Pang, S. Li, X. 2022. Multiview behavior and neurotransmitter analysis of zebrafish dyskinesia induced by 6PPD and its metabolites, *Science of The Total Environment*, Volume 838, Part 2, 156013, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156013>

Les différences d'activité à 5 et 8,5°C ont déjà été observées par De Lange et al.³⁷ sur *Gammarus pulex* exposé à des composés pharmaceutiques. Deux mécanismes d'action sont supposés : un premier, où l'activité, la vitesse et la distance parcourue diminuent en raison de l'effet neurotoxique, un second pour lequel la concentration du toxique sature les récepteurs-cibles cellulaires et induirait un stress entraînant une sur-activité.

Par analogie, à faible concentration, ou avec une seule exposition au stade œillet, les récepteurs cibles de la 6PPDQ seraient atteints mais non saturés, générant une diminution d'activité des larves. Lors de l'exposition à une concentration plus élevée (ou renouvelée à chaque stade biologique), une sur-activation des enzymes de stress oxydatif pourrait être responsable de la sur-activité observée à 8,5°C pour les larves issues des deux lacs.

Paramètres physiologiques

Les résultats révèlent un effet synergique « origine des animaux - modalité de contamination – température » sur l'efficacité d'utilisation de la réserve vitelline. Une augmentation de l'efficacité de la réserve vitelline est observée chez les individus « Annecy » quelle que soit la température, mais seulement à 8,5°C pour les individus « Léman ».

A contrario, seul un effet synergique « température - origine des animaux » est observé sur la taille à l'éclosion. La taille des larves à l'éclosion issues du lac Léman est significativement plus grande suite à une contamination en 6PPDQ. Ce phénomène est également observé pour les larves issues de la population d'Annecy incubée à 8,5°C. Cet effet correspondrait à un effet bénéfique du contaminant à faible dose pour les organismes, avant de subir des effets négatifs à une dose plus élevée, phénomène connu comme l'effet d'hormèse³⁸. Pour la population issue du lac Léman, cet effet d'hormèse serait observé lors de la contamination 6PPDQ et pour celle du lac d'Annecy lors du couplage contamination-augmentation de température. Cet effet d'hormèse pourrait également expliquer l'augmentation des taux de croissance spécifiques pour les larves issues des deux lacs à 8,5°C.

Enfin, un effet couplé « stade de vie – température » et « modalités de contamination - stade de vie » est observable pour l'activité de la catalase. L'augmentation de la température conduit à une augmentation de l'activité de la catalase des individus, témoignant de l'induction d'un stress oxydatif, comme observé chez la larve de truite marbrée (*Salmo marmoratus*)³⁹. La seule contamination par la 6PPDQ n'a pas d'impact sur l'activité de la catalase. Le toxique modifie l'activité de la catalase uniquement à 8,5°C. Ceci pourrait être lié à l'augmentation de l'activité métabolique des organismes lors de l'élévation de température, induisant une surcharge métabolique qui va mener soit à une augmentation de la prise en charge du stress, soit à une inhibition voire à un arrêt métabolique (avec inhibition de l'activité de la catalase) ayant pour objet de préserver l'énergie des

³⁷ De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lürling, M., Peeters, E.T.H.M., 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.002>

³⁸ Meador JP, Sommers FC, Cooper KA, Yanagida G. Tributyltin and the obesogen metabolic syndrome in a salmonid. *Environmental Research* 2011;111(1):50-6.

³⁹ Simčič, T., Jesenšek, D., Brancelj, A. 2015. Effects of increased temperature on metabolic activity and oxidative stress in the first life stages of marble trout (*Salmo marmoratus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 1005–1014. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0065-6>

organismes vivants en ne répondant plus aux pressions, dans l'attente d'une amélioration des conditions environnementales⁴⁰.

Les différences entre les deux populations (Annecy *versus* Léman) pourraient être liées à une divergence phénotypique. En effet, le lac d'Annecy présente des eaux plus chaudes que celles du Léman, et donc sa population d'ombles chevalier pourrait avoir développé une adaptation à une température plus élevée. Les larves issues des géniteurs du Léman sont donc potentiellement plus sensibles à la température et répondraient donc à la contamination en 6PPDQ (longueur des larves à l'éclosion, taux de malformation, survie) dès la température de 5°C.

⁴⁰ Gandar A. Réponse aux stress multiples chez les poissons : effets croisés de la température et des cocktails de pesticides [Internet]. 2015, thèse de doctorat, Univ Toulouse, <https://theses.hal.science/tel-01400793>

Conclusion générale et perspectives

En conclusion, les risques pour l'état écologique des masses d'eau liés aux TWP ne peuvent pas encore être évalués avec précision. Des incertitudes demeurent quant à (i) la nature et à la cinétique de libération des constituants des TWP, (ii) aux effets toxiques du mélange de ces composés pour les organismes aquatiques et (iii) aux quantités réelles de TWP (et des toxiques associés) rejoignant les milieux aquatiques.

Les principales conclusions de l'étude PLastiOmbles sont rappelées ci-après.

- (1) Le styrène n'a pu être extrait efficacement des particules d'usure de pneus TWP au moyen d'un protocole opératoire économique et rapide. En revanche l'additif anti-ozone 6PPD est extrait des TWP par le chloroforme sous ultrasons. Sa quantification par GC-MS a permis d'utiliser cette molécule comme proxy qualitatif de la présence de TWP dans les poussières de route PR ou dans les eaux de ruissellement.
- (2) Les teneurs en TWP dans les PR sont variables et peuvent atteindre de l'ordre de 10% en masse. La quantité de TWP en suspension dans l'eau de ruissellement d'une chaussée fréquentée en moyenne par 20000 véhicules/jour, lessivée par une pluie d'intensité 2mm/24h, est alors proche de 100 mgTWP/L.
- (3) La 6PPD est libérée dans l'eau de ruissellement de chaussée conjointement à son produit de transformation toxique 6PPDQ, à des concentrations de l'ordre du µg/L, supérieures à la toxicité reconnue (PNEC_{aqua} 28 ng6PPD/L et LC₅₀ Saumon coho 100 ng6PPDQ/L). Le temps de demi-vie dans l'eau de la 6PPDQ est estimé entre 6 et 30 h.
- (4) Les TWP s'accumulent (en partie) dans les sédiments de fossé de bord de route.
- (5) La 6PPDQ en solution aqueuse est 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.

Comme l'impact relatif du contrôle à la source de la 6PPDQ (les fabricants envisagent en effet une modification de la composition chimique des pneus en supprimant la 6PPD) reste inconnu car les compositions spécifiques des pneus des différents fabricants sont tenues secrètes et que d'autres toxiques peuvent être présents dans les TWP et les poussières de route, les recommandations suivantes sont formulées pour les recherches futures sur l'analyse des effets des eaux de ruissellement de chaussée sur l'environnement aquatique.

- (1) Il est nécessaire de quantifier les effets du vieillissement (mécanique, thermique, photochimique...) des TWP depuis leur site d'émission jusqu'au milieu naturel aquatique via les réseaux de collecte des eaux pluviales ou les zones de piégeage temporaires (fossés de bord de route, sols...), qui influent probablement sur le relargage de leurs constituants (6PPD et 6PPDQ notamment)
- (2) Il est fondamental de caractériser la bioaccumulation et les effets toxiques pour les organismes aquatiques (i) du cocktail de substances constitutives des TWP relarguées dans l'eau (HAP, Zn, 6PPD, 6PPDQ...), (ii) des TWP et (iii) des PR
- (3) Il est urgent d'estimer avec précision les flux de TWP vers les plans d'eau lacustre afin d'évaluer la nécessité de développer des contre-mesures, telle que l'interception des TWP contenues dans les eaux pluviales ou de ruissellement de chaussée.

L'action PlastiOmbre a permis d'initier le travail doctoral de Fanny-Laure Thomasson en octobre 2023, grâce à un cofinancement USMB-Michelin. Cette thèse vise à identifier les effets du cocktail 6PPDQ-BaP 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.

De plus, l'action ZABR STOC TWP qui débutera en 2025 a pour objet de vérifier 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, en utilisant le gammare comme espèce aquatique polluosensible.

L'ensemble de ces résultats permettra d'améliorer la connaissance relative au point (2) mentionné antérieurement. Des actions de recherche sont encore nécessaires pour déterminer les principaux facteurs influant le relargage des constituants toxiques des TWP et des PR, ainsi que les flux de ces particules (et xénobiotiques associés) vers les milieux aquatiques.