

Développement d'une méthodologie d'analyse multi-résidus sur organismes vivants : Application à la contamination du Gardon dans l'Orge

Cendrine Dargnat^{1*}, Martine Blanchard¹, Marie-Jeanne Teil¹, Pierre Labadie², Elodie Moreau-Guigon¹, Catherine Bourges¹, Annie Desportes¹, Marc Chevreuil¹

¹ EPHE, Laboratoire Hydrologie Environnement, UMR Sisyphe, UPMC Tour 46/56 4^{ème} ét., 4 place Jussieu 75005 Paris

² UMR Sisyphe / CNRS, UPMC Tour 46/56 4^{ème} ét., 4 place Jussieu 75005 Paris

* Cendrine Dargnat : cendrine.dargnat@ccr.jussieu.

L'impact de la contamination diffuse ou ponctuelle des milieux aquatiques par des molécules de synthèse industrielle a été étudié sur un poisson de la famille des Cyprinidés : le Gardon. Nous avons considéré deux familles de substances émergentes issues des activités anthropiques. Les phtalates qui sont principalement utilisés comme plastifiants, présents dans de nombreux éléments de notre environnement immédiat (emballages, vêtements, surfaces des habitations) ainsi que des composés polybromés, polybromodiphényléthers (BDE) ainsi que le tétrabisphtalate A (TBBPA) qui sont des retardateurs de flamme, employés dans la fabrication des matériaux ou d'appareils électriques ou électroniques. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui n'appartiennent pas à la catégorie des polluants émergents ont également été suivis car ils représentent une contamination chronique inévitable, étant issus des processus de combustion et des pertes d'hydrocarbures. L'espèce cible a été retenue pour ses caractéristiques : ubiquiste, rhéophile et relativement sédentaire.

1 Méthodologie

L'ensemble des procédures expérimentales utilisées pour la détermination des différents composés a été décrit par Labadie et al. (2008).

Les poissons ont été prélevés le 28 août 2007, au cours de la pêche électrique réalisée par l'ONEMA dans l'Orge, en zone urbaine à la station de Viry-Châtillon (91). Le muscle des gardons a été utilisé pour l'analyse des différents contaminants étudiés ici dans le laboratoire après lyophilisation, extraction et fractionnement/purification.

2 Résultats

2.1 Phtalates

Les phtalates ont été impliqués dans des perturbations endocriniennes de type oestrogénique, anti-oestrogénique, anti-androgénique ou immunodépresseur.

Les teneurs en phtalates du muscle de gardon et du sédiment ainsi que les concentrations dans l'eau brute, échantillonnées dans l'Orge en zone urbaine, à Viry-Châtillon, sont présentées dans le Tableau 1. Les poids corporels des poissons étaient homogènes. Dans le muscle des poissons et dans l'eau brute, les composés les plus représentés étaient le DEHP et le DEP, alors que pour le sédiment, il s'agit du DEHP, suivi du DnBP. Une étude aux Pays-Bas en zone fortement anthropisée (Vethaak et al., 2002) a montré chez un autre poisson dulcicole Cyprinidé, la Brème (*Abramis brama*), la présence de phtalates : le DEHP (1900-3120 ng g⁻¹ poids sec) suivi du DEP (800-720 ng g⁻¹ poids sec). Nos résultats dans les gardons de l'Orge indiquent des valeurs beaucoup plus basses, d'un facteur 10 à 20 pour le DEHP et 5 pour le DEP. Il se trouve que la rivière dans ce secteur ne reçoit que des rejets urbains de temps de pluie ponctuels.

Les teneurs corporelles en DEP et en DEHP des poissons femelles sont environ 4 fois plus élevées que celles des mâles, notamment pour le phtalate le plus abondant, le DEHP et pour le BBP. Il est intéressant de remarquer à cet égard, que pour une autre famille de contaminants interdits aujourd'hui mais très rémanents, les polychlorobiphényles (PCB), l'activité de dégradation métabolique chez les gardons prélevés en Seine, était supérieure chez les mâles, sans que toutefois, cette différence ne soit statistiquement significative (Blanchard et al., 1997).

Les teneurs corporelles des poissons femelles sont environ 4 fois plus élevées que celles des mâles, notamment pour le phtalate le plus abondant, le DEHP et pour le BBP.

Le coefficient de partage ($K_d = [\text{sédiment}] \text{ ng kg}^{-1} / [\text{eau}] \text{ ng L}^{-1}$) des phtalates entre l'eau et le sédiment présente une tendance à l'augmentation avec le poids moléculaire des composés sans toutefois atteindre une corrélation significative.

Le coefficient de bioconcentration ($K_b = [\text{muscle}] \text{ ng kg}^{-1} / [\text{eau}] \text{ ng L}^{-1}$) mesuré chez les poissons, indique globalement des valeurs du même ordre que pour le sédiment. Cela est en accord avec les données de la littérature. En effet, les activités de dégradation métabolique des phtalates particulièrement élevées ont été décrites pour l'embranchement des Vertébrés, ces composés étant hydrolysés, ensuite activement oxydés à différents niveaux subcellulaires puis conjugués avant élimination urinaire et biliaire (Barron et al., 1995). Chez les Mollusques, l'équipement enzymatique est plus rudimentaire et des teneurs plus élevées ($324 \cdot 10^3 \text{ ng g}^{-1}$ poids sec) ont été rapportées dans un gastéropode dulcicole du genre *Physa* (Staples et al., 1997).

Le BBP a présenté des teneurs plus importantes que les autres composés dans les gardons et sans relation avec celles du sédiment. Ce résultat devra être confirmé.

Tableau 1: Concentrations en phtalates dans l'eau et teneurs dans le sédiment et le muscle de gardon prélevés dans l'Orge à Viry-Châtillon (28 août 2007)

	Longueur (cm)	Poids corporel (g)	DMP	DEP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP	$\Sigma 6$
eau brute ng L ⁻¹			21.9	248.2	66.3	17.5	474.3	<10	828
sédiment									
ng g ⁻¹ poids sec			7.3	13.3	44.7	19.2	862.9	12.8	960
Kd			333	54	674	1095	1819		1159
gardon									
ng g ⁻¹ poids sec									
mâle	176	70	35.4	212.1	169.6	0.0	4.5	<4.6	422
mâle	200	85	34.3	45.5	16.0	3.8	6.8	<4.6	107
mâle	215	110	38.7	132.9	42.6	78.0	142.3	14.9	449
moyenne	197	88.3	36.2	130.1	76.1	27.3	51.2	14.9	336
Kb			1653	524	1147	1558	108		405
femelle	210	125	3.4	42.6	85.1	174.0	271.0	39.0	615
femelle	220	120	4.4	385.2	27.9	43.2	77.5	<4.6	538
femelle	230	140	3.9	37.0	29.7	119.0	208.4	33.8	432
moyenne	220	128.3	3.9	154.9	47.5	112.1	185.6	36.4	541
Kb			179	624	717	6405	391		653
limite de détection (LD) eau : 10 ng L ⁻¹ , organismes : 4.6 ng g ⁻¹									

2.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les HAP ont été exprimés par la somme de 14 composés les plus représentatifs de ce groupe: *naphtalène (NAP)*, *acénaphène (ACE)*, *fluorène (FLU)*, *phénanthrène (PHE)*, *anthracène (ANT)*, *fluoranthène (FTH)*, *pyrène (PYR)*, *benzo(a)anthracène (BaA)*, *chrysène (CHR)*, *benzo(b)fluoranthène*

(BbF), benzo(a)pyrène (BaP), dibenz(a,h)anthracène (DahA), benzo(ghi)pérylène (BghiP), indéno(1,2,3-c-d)pyrène (IcdP).

Certains HAP, le CHR, le benzo(b)fluoranthène (BbF) et le BaP exercent une activité anti-androgène in vitro. D'autres comme le DahA, sont des cancérogènes avérés (Stegeman et Lech, 1991).

Le Tableau 2 indique les concentrations dans l'eau brute, les teneurs dans les sédiments et dans les poissons.

Tableau 2: Concentrations en HAP ($\Sigma 14$) dans l'eau et teneurs dans le sédiment et le muscle des gardons prélevés dans l'Orge à Viry-Châtillon (28 août 2007)

	NAP	ACE	FLU	PHE	ANT	FTH	PYR	BaA	CHR	BbF	BaP	DahA	BghiP	IcdP	$\Sigma 14$
eau brute															
ng L ⁻¹	<LD	7.45	<LD	18.71	<LD	1.93	2.44	3.85	6.14	15.21	<LD	0.74	8.22	8.97	66.21
sédiment															
ng g ⁻¹ poids sec	<LD	2.16	2.75	21.41	<LD	40.99	63.43	6.52	<LD	57.75	7.27	5.28	49.11	62.60	317.10
Kd		290		1144		21237	25997	1694		3797		7131	5974	6979	4789
gardon															
ng g ⁻¹ poids sec															
mâle	<LD	<LD	1.49	1.63	1.03	0.96	1.31	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	6.42
mâle	<LD	<LD	1.50	1.21	1.03	1.01	1.31	<LD	<LD	<LD	1.22	<LD	<LD	<LD	7.28
mâle	<LD	<LD	1.58	1.16	0.00	0.98	0.00	<LD	<LD	<LD	1.23	<LD	<LD	<LD	4.95
moyenne	<LD		1.52	1.33	0.69	0.98	0.87	<LD	<LD	<LD	1.23	<LD	<LD	<LD	6.63
Kb				87		497	537								
femelle	<LD	<LD	1.66	1.17	<LD	0.97	1.34	<LD	<LD	<LD	1.23	<LD	<LD	<LD	6.37
femelle	<LD	<LD	1.91	1.26	<LD	1.04	<LD	<LD	<LD	<LD	1.28	<LD	<LD	<LD	5.49
femelle	<LD	<LD	1.90	1.76	<LD	1.03	<LD	<LD	<LD	1.42		<LD	0.61	<LD	8.30
moyenne	<LD		1.82	1.40	<LD	1.01	<LD	<LD	<LD	1.42	1.26	<LD	0.61	<LD	8.98
Kb				63		503	549								

LD : limite de détection

Le niveau de contamination de la rivière ($\Sigma 14$ HAP) a été comparable aux observations faites lors de précédentes études en Seine : 60 ng L⁻¹ (Ollivon et al., 1995) et 74 ng L⁻¹ (Blanchard et al., 1997).

Globalement, les coefficients de concentration sont plus élevés pour le sédiment que pour les poissons ce qui est en relation avec l'importance de l'aptitude à la biodégradation des HAP (Namour, 1991).

Les teneurs en HAP ($\Sigma 14$) semblent plus élevées chez les poissons femelles, bien que les effectifs soient ici trop limités pour pouvoir l'affirmer statistiquement. Les coefficients de concentration Kb reflètent cette tendance : 66 pour les mâles et 97 pour les femelles. Cette observation est à mettre en relation avec les résultats d'une étude antérieure montrant que les activités enzymatiques oxydatives de ce type de contaminants étaient légèrement supérieures chez les poissons mâles (Blanchard et al., 1997).

2.3 Polybromodiphényléthers

Il a été démontré expérimentalement démontré que les composés polybromés étaient impliqués expérimentalement dans des altérations du système nerveux et des fonctions endocriniennes (action oestrogénique et anti-thyroïdienne) et immunologiques (Fowles et al., 1994).

On observe une faible contamination des eaux de l'Orge par les PBDE, aussi bien dans la colonne d'eau (Σ

BDE : 0.15 ng L⁻¹) que dans le sédiment (Σ BDE : 3.98 ng g⁻¹) (Tableau 3).

La contamination du muscle de gardon est plus importante (Σ BDE : 8.25 ng g⁻¹). La présence de 4 composés a été mise en évidence contre un seul dans les sédiments (Tableau 3). Des résultats similaires ont été observés par d'autres auteurs chez des poissons Cyprinidés de la rivière Ebro en Espagne (Lacorte et al., 2006). Les composés détectés, sont ceux généralement majoritaires dans les tissus de poissons (De Wit, 2002; Lacorte et al., 2006 Guo et al., 2007). Le niveau de contamination des gardons, rencontré dans l'Orge est comparable à celui observé chez des poissons de l'estuaire de la rivière Pearl (Chine) : 7.6 ng g⁻¹ en Σ 15 BDE (Guo et al., 2007). Cependant, il est ici inférieur aux niveaux de la brème de la Meuse et du Rhin (110 et 90 ng g⁻¹ respectivement pour le seul BDE 47) qui sont parmi les valeurs les plus fortes rencontrées en Europe (Veethak et al., 2002).

Les faibles concentrations dans l'eau ne permettent pas d'établir une relation entre les poids moléculaires des différents composés et leurs teneurs musculaires. Le composé le plus abondant a été le BDE 47 (57 à 80 % de la Σ 9BDE) en accord avec le profil de la production industrielle de BDE et les données de la littérature. Le facteur de bioconcentration Kb pour ce composé, exprimé par le rapport entre la teneur musculaire moyenne du gardon et la concentration dans les eaux brutes déterminées lors de la campagne d'échantillonnage sur l'Orge, s'est élevé à 55000. Les valeurs du Kb mesurées chez le Gardon en Seine pour une autre classe de contaminants organique, les polychlorobiphényles (PCB) dont la structure chimique est analogue (2 noyaux benzéniques substitués par des halogènes), sont du même ordre : 29000 (Teil et al., 1996).

Le rapport moyen des teneurs poisson/sédiment est égal à 2.1, ce qui indique que les poissons accumulent davantage les BDE que les phtalates. Cette valeur est comprise dans l'intervalle de 0.4 à 49.8 observé par Lacorte et al. (2006).

Pour les PCB, une étude antérieure en Seine a montré dans le muscle de Gardon, des valeurs plus élevées environ d'un facteur 100, variant de 570 à 750 (Σ 7 PCB) ng g⁻¹ poids sec (Blanchard et al., 1997).

Cependant, il existe une grande variabilité des capacités d'accumulation des contaminants par les organismes vivants. L'aptitude de ces derniers à refléter le niveau de pollution ambiant, doit être considérée avec prudence. En effet, en plus de la famille chimique des contaminants considérés, divers facteurs d'influence doivent être pris en compte : les caractéristiques de l'espèce (longévité, particularités métaboliques, cinétique d'accumulation/vitesse de croissance, taux de lipides), le stade du cycle reproductif (Blanchard et al., 1999) et également, les conditions du milieu (température, saison, disponibilité de nourriture). Contrairement aux phtalates et à la tendance constatée pour les PCB, il n'y a pas de différence entre les teneurs musculaires en BDE entre les poissons mâles et femelles.

Tableau 3 : Concentrations en BDE dans l'eau et teneurs dans le sédiment et le muscle des gardons prélevés dans l'Orge à Viry-Châtillon Concentrations en HAP ($\Sigma 14$) dans l'eau et teneurs dans le sédiment et le muscle des gardons prélevés dans l'Orge à Viry-Châtillon (28 août 2007)

	BDE 28	BDE 47	BDE 99	BDE 100	BDE 153	BDE 154	BDE 183	BDE 209	$\Sigma 9$ BDE	BDE47 / Σ BDE
Eau ng L ⁻¹	< 0,08	0.15	< 0,14	< 0,14	< 0,07	< 0,07	< 0,11	< 0,39	0.15	
Sédiment ng g ⁻¹	< 0,12	3.98	< 0,22	< 0,22	< 0,26	< 0,26	< 0,2	< 0,39	3.98	1
Gardons ng g ⁻¹										
Mâle										
25	0.28	6.34	< 0,16	0.93	< 0,08	0.40	< 0,13	< 0,56	7.95	0.80
26	0.41	10.43	< 0,16	1.52	< 0,08	0.79	< 0,13	< 0,56	13.16	0.79
29	0.50	3.08	< 0,16	interf	< 0,08	0.58	< 0,13	< 0,56	4.16	0.74
Femelle										
27	0.37	7.03	< 0,16	1.69	< 0,08	0.90	< 0,13	< 0,56	9.98	0.70
28	0.46	5.70	< 0,16	0.80	< 0,08	0.55	< 0,13	< 0,56	7.51	0.76
30	0.43	3.87	< 0,16	1.70	< 0,08	0.75	< 0,13	< 0,56	6.74	0.57
								moyenne	8.25	0.73
								écart-type	3.06	0.08

Concernant le tétrabromobisphénol A (TBBPA) les teneurs musculaires sont plus faibles. Il existe peu de données dans la littérature concernant ce composé qui est généralement décrit avec un moindre coefficient de bioaccumulation. Le rapport des teneurs muscle/sédiment a été ici en moyenne de 3.5 (Tableau 4).

En l'absence de concentrations décelables dans l'eau, les teneurs du sédiment et de l'espèce cible peuvent constituer des indicateurs de contamination utiles.

Tableau 4 : Teneurs en TBBPA du muscle des gardons mâles et femelles prélevés à la station CSP de Viry-Châtillon (28 août 2007)

Teneurs (ng g ⁻¹ poids sec)	
Mâles	
25	0.80
26	non déterminé (interférence)
29	1.08
Femelles	
27	0.53
28	0.32
30	non déterminé (interférence)

3 Conclusion et Perspectives

L'impact de la contamination des poissons dépend des caractéristiques moléculaires des composés considérés.

Dans l'ensemble, les teneurs en phtalates et BDE sont en accord avec les données de la littérature et avec les paramètres biologiques étudiés antérieurement au laboratoire pour d'autres polluants.

Les phtalates et les HAP sont plus aptes à la dégradation métabolique et le faible niveau de leurs teneurs dans le muscle des gardons ne permet pas d'apprécier la présence dans le milieu de composés non détectables ou non quantifiables. Par contre, les BDE ont un facteur de bioconcentration important et pourraient comme les PCB, être utilisés comme marqueurs de la pollution, d'autant plus que les concentrations dans l'eau sont parfois inférieures à la limite de détection.

Cependant, bioaccumulation ne signifie pas nécessairement toxicité immédiate, cette dernière passant généralement par le métabolisme des composés. A cet égard, la recherche des produits de dégradation tels que le premier métabolite du DEHP, le mono-éthylhexyl phtalate (MEHP), constituerait un complément intéressant à ces investigations. Il en va de même des études permettant de caractériser les perturbations endocriniennes œstrogen-like, telles que l'induction de la synthèse de vitellogénine ou de protéine spiggin chez l'Épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) qui sont envisagées en collaboration avec des écotoxicologues au sein du PIREN (Sanchez et al., 2008).

L'étude simultanée de plusieurs types de contaminants est également intéressante car il est vraisemblable qu'ils exercent entre eux des interactions, non seulement parce que les capacités de détoxification des organismes face à une multitude de polluants sont plus vite saturées mais aussi, en raison de possibles synergies facilitatrices ou inhibitrices vis-à-vis des systèmes de transport membranaires qui font barrière entre les organismes vivants et leur milieu ambiant (Schermann, 2007).

Notre étude préliminaire a permis de mettre au point les techniques d'analyse multi résidus sur différents types d'échantillons environnementaux : liquides, solides ou biologiques. Ces premiers résultats devront être confirmés par des séries à effectif plus élevé permettant une analyse statistique.

Remerciements

Nous tenons à remercier toute l'équipe de l'ONEMA pour l'organisation de la pêche électrique dans l'Orge en Août 2007.

4 Références bibliographiques

- Barron M.G., Albio P.W. and Hayton W.L. (1995). Biotransformation of di (2-ethylhexyl) phtalate by Rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**, 873-876.
- Blanchard M., Carru A.M., Chesterikoff A., Chevreuil M., Garban B., Ollivon D. et Teil M.J. (avril 1997). Evaluation de l'utilisation de biomarqueurs en Seine. Rapport final AESN, Paris, France, 92p.
- Blanchard M., Teil M.J., Carru A.M., Ollivon D., Garban B., Chesterikoff A. and Chevreuil M. (1999). PCB and PAH impacts upon cytochrome P-450 dependent oxidases in the Roach (*Rutilus rutilus*) from the Seine river (France). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **37**, 242-250.
- De Wit C.A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, **46**, 583-624.
- Fowles J.R., Fairbrother A., Baecher-Steppan L. and Kerkvliet N.I. (1994). Immunologic and endocrine effects of the flame retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice. *Toxicology*, **86**, 49-61.
- Guo L., Qiu Y., Zhang G., Zheng G.J., Lam P.K.S. and Li X. (2007). Levels and bioaccumulation of organochlorine pesticides (OCPs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fishes from the Pearl River estuary and Daya Bay, South China. *Environmental Pollution*, available online.
- Lacorte S., Raldua D., Martinez E., Navarro A., Diez S., Bayona J.M. and Barcelo M. (2006). Pilot survey of a broad range of priority pollutants in sediment and fish from the Ebro river basin (NE Spain). *Environmental Pollution*, **140**, 471-482.

- Namour P. (1991). Les monoxygénases de poissons, un outil pour la caractérisation des pollutions chroniques. Mémoire de diplôme d'Ingénieur CNAM en Biochimie, Lyon, 222 p.
- Schermann J.M. (2007). Protective role of blood-brain barrier towards uptake of xenobiotics. Colloque Toxicocinétique des xenobiotiques dans l'évaluation des risques pour l'Homme et l'environnement. ARET. ENVA, 94704 Maisons-Alfort.
- Ollivon D., Garban B, Chesterikoff A. (1995) Analysis of the distribution of some polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended matter in the river Seine. *Water, Air and Soil Pollution*, **81**, 135-152.
- Staples C.A., Peterson D.R., Parkerton T.F. and Adams W.J. (1997). The environmental fate of phthalates esters : a literature review. *Chemosphere*, **35**, 667-749.
- Stegeman J.J. and Lech J.J. (1991). Cytochrome P-450 monoxygénase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environmental Health Perspectives*, **90**, 101-109.
- Teil MJ, Blanchard M., Chesterikoff A. and Chevreuil M. (1996). Partition of metallic and organochlorinated pollutants and monoorthosubstituted PCB pattern in the trophic web from different areas of the river Seine. *The Science of the Total Environment*, **181**, 111-123.
- Vethaak A.D., Lahr J., Schrap S.M., Belfroid A.G., Rijs G.B.J., Gerritsen A., de Boer J., Bulder A.S., Grinwis G.C.M., Kuiper R.V., Legler J., Murk T.A.J., Peijnenburg W., Verhaar H.J.M. and de Voogt P. (2002). An integrated assessment of oestrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of the Netherlands. *Chemosphere*, **59**, 511-524.