

Influence du niveau trophique sur l'imprégnation des chevesnes par les micropolluants organiques en agglomération parisienne

Aurélie Goutte^{1*}, Fabrice Alliot¹, Sam Azimi², Sabrina Guérin², Noëlie Molbert¹, Vincent Rocher²

¹ Sorbonne Université, UMR Metis, Paris

² SIAAP, Direction du développement et de la prospective, Colombes.

* aurelie.goutte@upmc.fr

Résumé

Une précédente action du PIREN-Seine a permis de caractériser le transfert des micropolluants organiques au sein d'un réseau trophique sur l'Orge, mettant en évidence la bioamplification trophique (du biofilm vers les macroinvertébrés benthiques et les poissons) des polluants organiques persistants, tels que les PCBs et les pesticides organochlorés, et une dilution trophique des micropolluants rapidement métabolisables, comme les phtalates et les HAPs.

*L'objectif de cette étude est de tester l'influence du niveau trophique sur les teneurs en micropolluants persistants et métabolisables, à l'échelle d'une espèce, le chevesne *Squalius cephalus*. Quatre sites suivis par la Syndicat interdépartemental pour l'assainissement de l'agglomération parisienne ont été étudiés en amont et en aval de l'agglomération parisienne sur la Marne et la Seine. Les teneurs musculaires en micropolluants ont été analysées sur un total de 39 chevesnes et la signature isotopique en azote a été mesurée comme proxy du niveau trophique des individus.*

Les teneurs en micropolluants organiques sont principalement expliquées par le site, et très peu influencées par le niveau trophique. Seules les teneurs musculaires en phtalates déclinent avec le niveau trophique des chevesnes sur un site, à Triel sur Seine, ce qui corrobore la dilution trophique des polluants métabolisables.

Points clefs

- ✓ *Imprégnation des muscles de chevesnes par : $\sum 7$ Phtalates > $\sum 7$ pesticides pyréthrinoides > $\sum 7$ PCB > $\sum 16$ HAP > $\sum 5$ pesticides organochlorés > $\sum 7$ PBDE*
- ✓ *Forte variabilité inter-sites d'imprégnation par les micropolluants*
- ✓ *Peu de corrélations entre les teneurs en micropolluants et le niveau trophique des chevesnes*

1. Introduction

La directive-fille « Substances » de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE 2013/39/UE) et le Guide relatif à l'évaluation de l'état des eaux de surface (2016) exigent que les états-membres complètent l'évaluation de l'état chimique des eaux par la surveillance des micropolluants dans les organismes aquatiques, en appliquant en priorité les Normes de Qualité Environnementale sur le biote (NQE_{biote}). Les poissons d'eau douce représentent de bons indicateurs de ces pollutions diffuses car ils occupent différents maillons trophiques et sont exposés tout au long de leur vie.

La bioaccumulation et la bioamplification trophique des polluants organiques persistants (POP) historiques, et notamment des PCB (polychlorobiphényles) et des pesticides organochlorés (POC) ont été très étudiées. Ainsi, plus un poisson est âgé, plus les teneurs en POPs sont élevées (Vives et al., 2005). Plus le niveau trophique (proies consommées) d'un poisson est élevé, plus on s'attend à une plus forte contamination en POP, comme montré chez les perches communes *Perca fluviatilis* de plus de 20 cm (Olsson et al. 2000), mais pas chez l'omble chevalier *Salvelinus alpinus* (Dufour et al., 2001).

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les plastifiants comme les diesters de phtalates ou les pesticides pyréthrinoides sont, quant à eux, plus rapidement métabolisés par les poissons (Varanasi 1989 ; Barron *et al.* 1995 ; Demoute 1989). La trophodynamique de ces micropolluants métabolisables est alors très différente, puisqu'on observe une dilution des HAP et des phtalates dans le réseau trophique (Labadie et al. 2017). L'objectif de cette étude est d'étudier l'influence du niveau trophique sur l'imprégnation en polluants à l'échelle d'une espèce, les chevesnes *Squalius cephalus* en agglomération parisienne.

2. Matériel et méthodes

2.1. Collecte des échantillons

Les poissons ont été prélevés sur les sites suivis par le SIAAP (Syndicat interdépartemental pour l'assainissement de l'agglomération parisienne, figure 1). Les pêches électriques ont été réalisées par le bureau d'étude Hydrosphère, mandaté par le SIAAP en juillet 2017. Un total de 39 chevesnes est inclus dans cette étude (Tableau 1). Les échantillons de muscles ont été congelés dans les 3 heures après dissection, puis lyophilisés pendant 48h à une température de -50°C et une pression de 0.12 mbar.

Tableau 1. Récapitulatif des échantillons prélevés pour la caractérisation du niveau trophique.

Date	Commune	Cours d'eau	Effectif (chevesnes)
24/07/2017	Gournay sur Marne	Marne	10
27/07/2017	Levallois-Perret	Seine	10
28/07/2017	Le Pecq	Seine	9
31/07/2017	Triel sur Seine	Seine	10

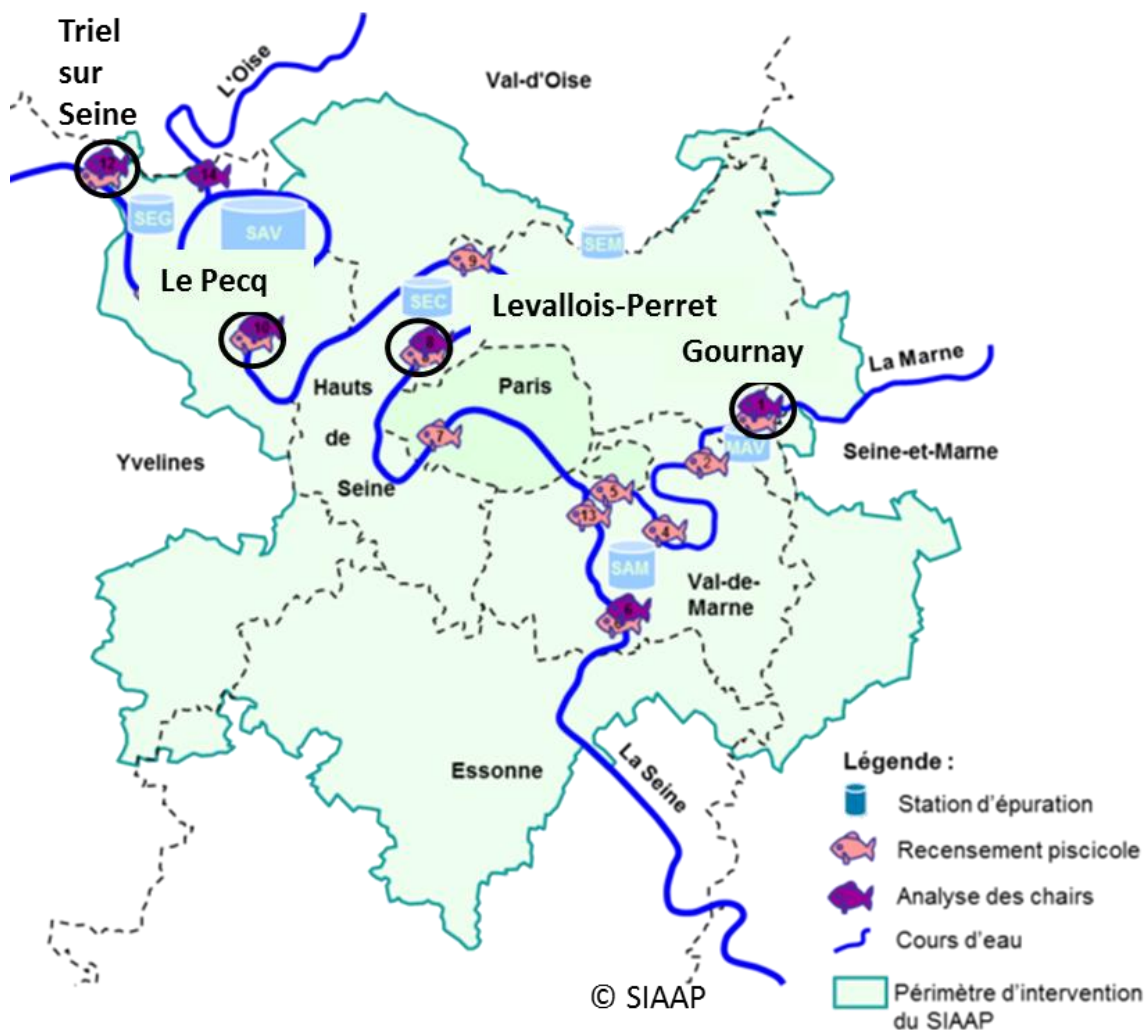


Figure 1. Sites de pêche suivis par le SIAAP et l'Agence France de la Biodiversité pour les inventaires piscicoles et les analyses de micropolluants dans les muscles de poissons (© SIAAP).

2.2. Analyses des isotopes stables

Entre 200 et 250 µg d'échantillons de muscle ont été broyés et homogénéisés. Les rapports isotopiques de l'azote et du carbone ont été mesurés à l'aide d'un analyseur élémentaire (ThermoFisher Flash HT), couplé à un spectromètre de masse isotopique (ThermoFisher Delta V advantage). Les abondances relatives des isotopes stables, notées δ , sont exprimées en ‰ selon la formule :

$$\delta X = [(R_{\text{ech}}/R_{\text{standard}})-1]*1000,$$

avec X correspondant à l'isotope lourd (i.e. ^{13}C ou ^{15}N) et R représentant le rapport entre l'isotope lourd et l'isotope léger d'un même élément (i.e. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). L'azote atmosphérique et le Pee Dee Belemnite (rostre de bélemnite, fossile calcaire) ont été utilisés comme standards pour le calcul du $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ respectivement.

2.3. Analyses de micropolluants

Un total de 48 micropolluants a été recherché et quantifié dans les muscles de ces 39 chevesnes, à savoir:

- 6 HAPs : naphthalène, acénaphtylène, acénaphène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, indeno(1,2,3-cd)pyrène, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)perylène et pyrène
- 7 Phtalates (di-isobutyle phtalate (DiBP), di-isononyl phtalate (DiNP), di-isodécyle phtalate (DiDP), diméthyle phtalate (DMP), diéthyle phtalate (DEP), n-butyl benzyl phtalate (BBP), di-2-ethylhexyl phtalate (DEHP), di-n-butyle phtalate (DnBP) et di-n-octyle phtalate (DnOP))
- 7 pesticides pyréthrinoïdes (bifenthrine, cyfluthrine, cyperméthrine, deltaméthrine, fenvalérate, perméthrine et phénothrine)
- 7 PCBs (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153 et PCB 180)
- 7 PBDEs (BDE 28, BDE 47, BDE 99, BDE 100, BDE 153, BDE 154, BDE 183) : retardateurs de flammes bromés
- 4 pesticides organochlorés (4,4'-DDE, Lindane, PeCB, HCB)

Afin de limiter la contamination, la verrerie utilisée a été placée au four à 400°C pendant 4 heures avant d'être stockée dans des feuilles d'aluminium. Des seringues automatiques en verre (Evol, Australie) ont été utilisées pour prélever des micro-volumes. Pour chaque série de 12 analyses, des blancs ont été réalisés suivant les mêmes étapes de traitements que les échantillons, sous conditions contrôles de laboratoire. Des standards internes de HAP et PCB (Phénanthrène d10 ; Pyrène d10 ; Benzo(a)anthracène d12 ; PCB 30 ; PCB 107) ont été fournis par Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-la-Grande, France), par LGC standards (Molsheim, France) pour les phtalates, pyréthrinoïdes et organochlorés (DEP d4 ; DEHP d4 ; perméthrine13C ; Lindane d6) et par BCP instruments (Oullins, France) pour les PBDE (PBDE 47 13C ; PBDE 153 13C).

Des échantillons de 500 mg de poids sec de muscle lyophilisés et broyés ont été placés en cellule d'extraction solide-liquide (Accelerated Solvent Extraction, ASE 350) de 5 ml, ont été mis en présence de 500 mg de dispersant, préalablement passés au four à 400°C, et de standards internes puis rincés à l'acétone (50 µL). Les cellules préparées ont été placées à 4°C pendant la nuit. Les échantillons ont ensuite subi une double extraction, hexane/dichlorométhane (1/1) et hexane/acétone (1/1) respectivement, comprenant chacune 3 cycles de 5 min à 100°C suivis d'une purge de 2min et d'un flush de 100%. Les extraits ont été reconcentrés sous EZ-2 (time to final stage : 5min, final stage : 20min) jusqu'à environ 1 mL puis passés sous flux d'azote (à 60°C) jusqu'à 0,5 mL. Les extraits ont été purifiés sous cartouches Florisil (Supelco 1g/6mL, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), préalablement conditionnées avec 10 mL d'un mélange hexane/acétone (1/1) suivi de 10 mL hexane/dichlorométhane (1/1) sans aller à sec. L'étape de purification s'est effectuée en deux éluions afin d'éliminer les composés non voulus pouvant interférer avec l'étape de qualification et de quantification. Les extraits déposés sur les cartouches, et rincés avec 2x100 µL d'hexane, ont été élués avec 10 mL du mélange hexane/dichlorométhane (1/1) suivi de 10 mL d'hexane/acétone (1/1). L'extrait purifié a été reconcentré sous EZ-2 (time to final stage : 5min, final stage : 15min) puis sous flux d'azote (à 60°C) et transférée en vial avec restricteur à fond plat (400 µL) après rinçage avec 2x75 µL d'hexane.

Les échantillons extraits ont été conservés à -18°C avant injection en GC-MS/MS. Les analyses ont été effectuées en adaptant le protocole décrit par Sanchez-Avila et al. (2011), à l'aide d'un ensemble 7890A GC System (Agilent Technologies, Les Ulis, France) couplé à un spectromètre de masses 7000B MS/MS Triple Quad (Agilent Technologies, France), fonctionnant en source d'ionisation à impact électronique (+70eV) et en mode d'acquisition MRM (Multiple Reaction Monitoring). Ce dernier a été préféré pour permettre la sélection spécifique de composés cibles à détecter et quantifier (ions précurseurs et ions produits) au cours d'une même séquence d'analyses. Une pré-colonne en Silice désactivée, 0,25 mm diamètre interne (i.d.) (Restek, Lisses, France) suivie d'une colonne Zebtron SemiVolatils (Phenomenex, Le Pecq, France) 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25µm, ont été utilisées comme phase stationnaire. Des extraits de 1µL ont été injectés en mode « pulsed splitless ». La température de l'injecteur a été fixée à 290°C. Un flux d'hélium (99,999% ; Air liquide, Paris, France), en débit constant de 1,6 mL.min⁻¹, a servi de gaz vecteur. La température du four a

été programmée à 70°C pendant 4 min puis à 150°C (0 min), suivi d'une montée à 225°C (0 min) avant de terminer à 310°C pendant 10 min. De l'azote (99,999% ; Air liquide, Paris, France) a été utilisé en tant que gaz de collision à 1.5 mL.min⁻¹. La température des quadripôles et de la ligne de transfert ont été fixés à 150°C et 250°C respectivement. Des courbes de calibration, basées sur 5 à 8 points de gammes, ont été construites en utilisant des méthodes de régression linéaire (R²). La quantification des composés a été effectuée à partir des rapports d'aires des pics du composé sur l'étalon interne correspondant. L'acquisition des données a été réalisée à l'aide du logiciel Mass Hunter Quantitative Analysis (version B.02, Agilent Technologie).

2.4. Traitement statistique

Les différences entre stations ont été testées à l'aide d'ANOVA suivis de tests post-hoc de Tukey pour les isotopes stables et de tests non paramétriques de kruskal wallis, suivis de tests post-hoc avec une correction de Bonferroni pour les micropolluants. Des tests de corrélation de spearman ont été utilisés pour tester un lien entre les niveaux de micropolluants dans le muscle de chevesne et le niveau trophique mesuré à l'aide du $\delta^{15}\text{N}$, site par site.

3. Résultats et discussion

3.1. Isotopes stables

Les rapports d'isotopes stables d'azote ($\delta^{15}\text{N}$) et de carbone ($\delta^{13}\text{C}$) varient entre stations (Figure 2, ANOVA : $F_{3,33} = 11.29$, $p < 0.001$ et $F_{3,33} = 12.33$, $p < 0.001$ respectivement), et de façon significative à Triel-sur-Seine (tests post hoc, $p < 0.05$), avec un plus haut $\delta^{15}\text{N}$, pouvant découler d'un enrichissement suite à des rejets urbains (rejets de stations d'épuration / rejets urbains de temps de pluie) et/ou au fait que les chevesnes capturés se nourrissent à un niveau trophique plus élevé.

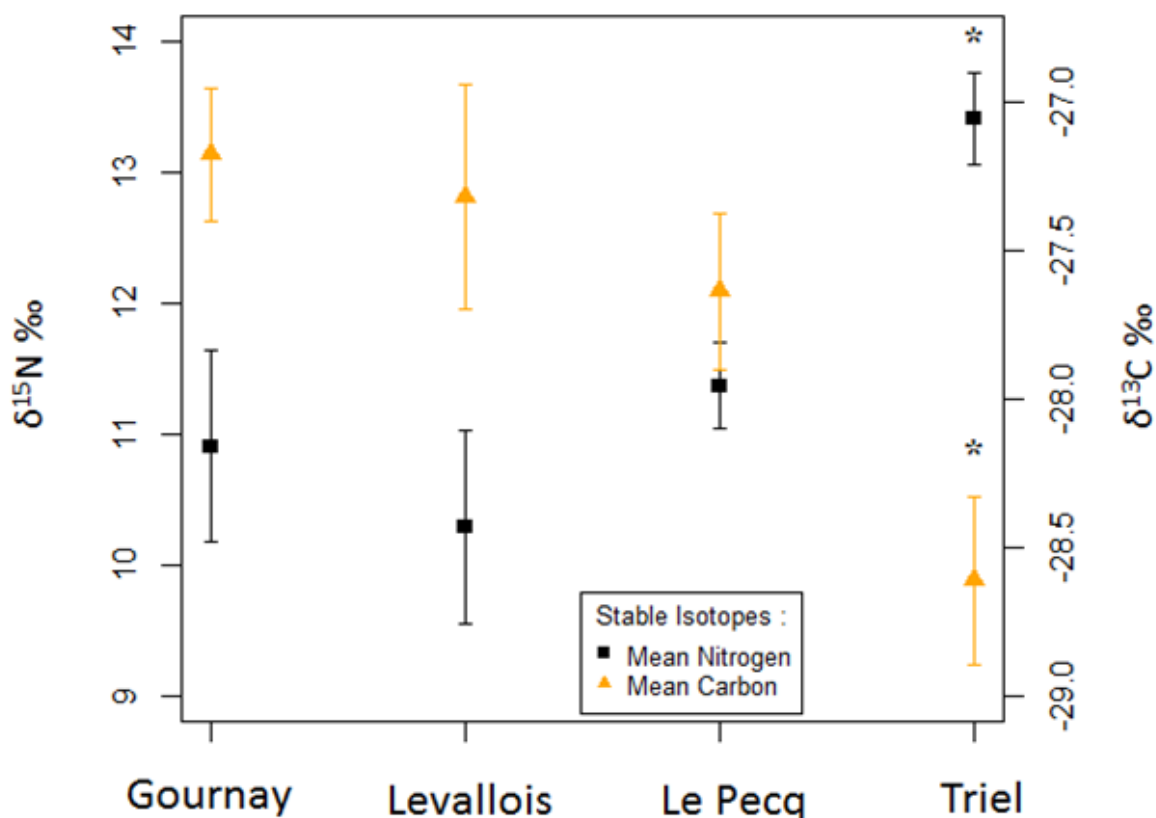


Figure 2. Rapports d'isotopes stables d'azote ($\delta^{15}\text{N}$, carrés noirs) et de carbone ($\delta^{13}\text{C}$, triangle orange).

3.2. Micropolluants rapidement métabolisables

Les principaux micropolluants rapidement métabolisables retrouvés dans les muscles de chevesnes sont les phtalates, quel que soit le site.

Les chevesnes pêchés au Pecq sont les plus contaminés en phtalates suivis par les chevesnes de Triel, de Levallois-Perret et enfin de Gournay sur Marne (Figure 3, Kruskal Wallis $\chi^2=18.432$, $df=4$, $p<0.01$, test post hoc, $p < 0.05$). Concernant les HAPs, les chevesnes de Levallois-Perret sont les plus imprégnés (Figure 3, Kruskal Wallis $\chi^2=10.471$, $df=4$, $p<0.05$, test post hoc, $p < 0.05$). Concernant les pesticides pyréthrinoïdes, l'absence de différences significatives entre les stations (Kruskal Wallis $\chi^2=8.426$, $df=4$, $p=0.077$) peut s'expliquer par la faible détection de ces composés dans les matrices étudiées (le pourcentage de détection de 6 composés sur les 7 recherchés est inférieur à 50%).

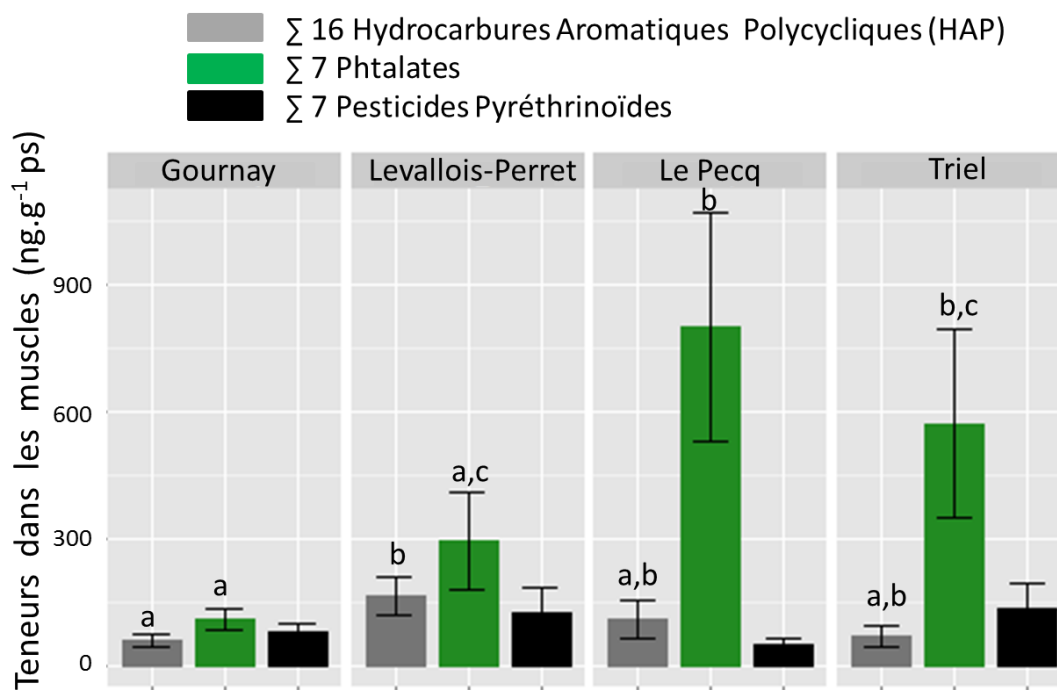


Figure 3. Teneurs (moyenne \pm SD, en ng/g poids sec de muscle de chevesnes) en $\Sigma 7$ Phtalates (vert), $\Sigma 16$ HAP (gris clair) et $\Sigma 7$ Pesticides pyréthrinoïdes (gris foncé). [a, b] représente les différences significatives entre stations (tests de Kruskal-Wallis suivis de tests post-hoc).

Les corrélations entre le niveau trophique des chevesnes, mesuré par la signature isotopique en azote et les teneurs en micropolluants organiques dans les muscles, ont été étudiées station par station. Au niveau de Triel-sur-Seine seulement, les teneurs en somme des 7 phtalates diminuent significativement avec $\delta^{15}N$ et donc avec le niveau trophique des chevesnes (Figure 4, $t = -2.9097$, $df = 7$, $p<0.05$, $R^2=0.48$), ce qui corrobore nos précédents résultats sur une dilution trophique de ces micropolluants métabolisables. Les autres micropolluants ne sont pas corrélés au $\delta^{15}N$ et donc au niveau trophique des chevesnes, ce qui peut être expliqué par la rapide métabolisation et excrétion des HAP et des pesticides pyréthrinoïdes chez les vertébrés et la forte variabilité d'exposition des individus.

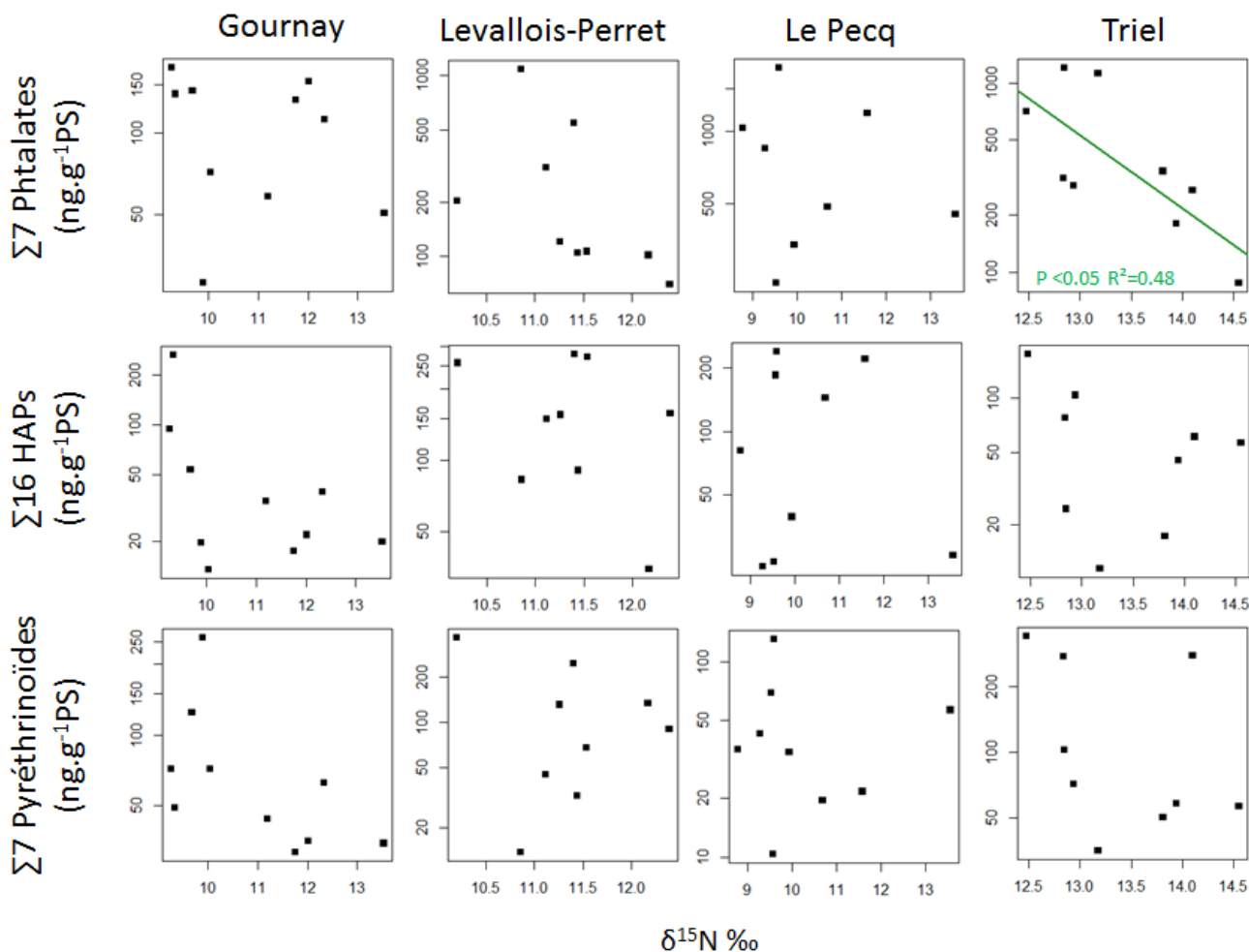


Figure 4. Relations entre l'imprégnation en Σ7 Phtalates, Σ16 HAP et Σ7 Pesticides pyréthriñoïdes (ng/g Poids Sec) et le niveau trophique (δ¹⁵N ‰) dans le muscle des chevesnes.

3.3. Micropolluants peu métabolisables

Les principaux micropolluants peu métabolisables retrouvés dans les muscles de chevesnes sont les PCBs, avec des niveaux significativement plus élevés à Le Pecq comparé à Levallois-Perret (Figure 5). Une plus forte imprégnation des chevesnes Du Pecq par les PCBs est observée par le SIAAP certaines années (2013 et 2015), sans que les causes soient identifiées. Pour les pesticides organochlorés, les plus fortes teneurs ont été mesurées chez les chevesnes capturés à Gournay sur Marne (Figure 5, Kruskal Wallis $\chi^2=15.731$, $df=4$, $p<0.01$). Concernant les PBDE, les niveaux sont très faibles dans les muscles de chevesnes et aucune différence inter-sites n'a été détectée (Figure 5, Kruskal Wallis $\chi^2=2.192$, $df=4$, $p<0.701$).

Pour les polluants persistants, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le niveau trophique des chevesnes et leur imprégnation en PCBs, pesticides organochlorés et PBDEs (Figure 6).

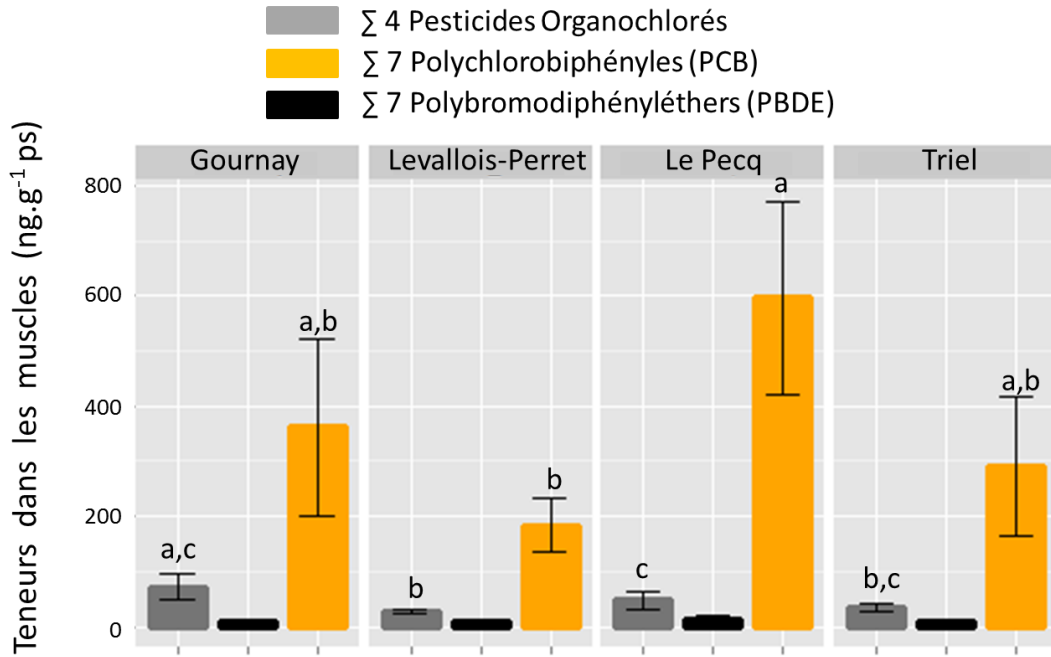


Figure 5. Teneurs (moyenne \pm SD, en ng/g de poids sec de muscle de chevesnes) en Σ 7 PCBs (orange), Σ 6 PBDE (gris clair) et Σ 4 Pesticides organochlorés (gris foncé). [a,b] représente les différences significatives entre stations (tests de Kruskal-Wallis suivis de tests post-hoc).

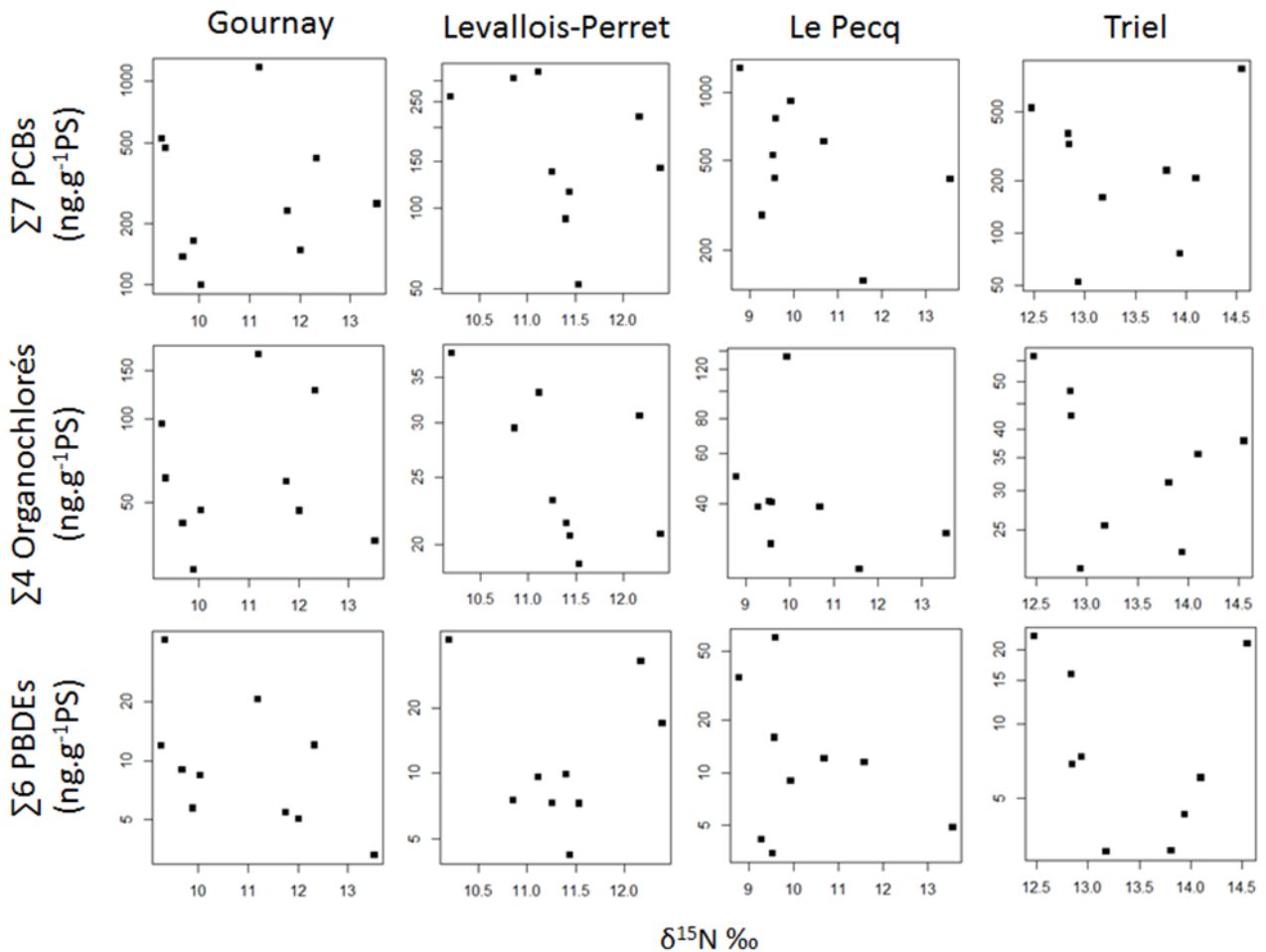


Figure 6. Relations entre l'imprégnation en Σ 7 PCB, Σ 4 pesticides organochlorés et Σ 6 PBDE (ng/g de Poids Sec) et le niveau trophique ($\delta^{15}N$ ‰) dans le muscle des chevesnes.

4. Conclusion

A l'échelle d'une espèce, le chevesne, le niveau trophique mesuré à l'aide de la signature isotopique en azote, ne permet pas d'expliquer les niveaux d'imprégnation des muscles, que ce soit par les polluants peu métabolisables comme les PCB, pesticides organochlorés et les PBDE ou les micropolluants plus facilement métabolisables, comme les phtalates, les HAP et les pesticides pyréthrinoïdes, et ce malgré une forte variabilité dans les niveaux de $\delta^{15}\text{N}$ et donc de niveau trophique dans les chevesnes. Le jeu de données reste relativement faible pour confirmer certaines tendances observées. Cette absence de lien entre niveau trophique et niveaux de contamination des poissons peut être expliquée par les différentes voies d'exposition (proies, mais aussi exposition par diffusion branchiale), la dynamique des micropolluants dans les organismes aquatiques et notamment les processus de stockage, métabolisation, excrétion, ainsi que l'influence d'autres facteurs individuels (âge, sexe, condition corporelle, etc.). Ces résultats rejoignent ceux d'une étude menée plus en amont, sur la Marne et ses affluents (Goutte, 2018).

Bibliographie

- Barron, M. G., Albro, P. W., & Hayton, W. L. (1995). Biotransformation of di (2- ethylhexyl) phthalate by rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 14(5), 873-876.
- Demoute, J. P. (1989). A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pesticide Science*, 27(4), 375-385
- Dufour, E., Gerdeaux, D., Corvi, C., Khim- Heang, S., & Mariotti, A. (2001). Assessment of the contaminant concentration variability among Lake Geneva Arctic char using stable isotopic composition ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$). *Environmental Toxicology: An International Journal*, 16(2), 185-191.
- Goutte, A. (2018). Métabolisation des micropolluants: Imprégnation et dommages potentiels chez les poissons d'eau douce de la Marne et de ses affluents. Rapport final Agence de l'Eau Seine Normandie
- Labadie P., Simonnet-Laprade C., Maciejewski K., Lachaux V., Le Menach K., Budzinski H., Alliot F., Chevreuil M., Santos R., Goutte A. (2017). Transferts de micropolluants dans les réseaux trophiques lotiques : exemple de l'Orge. Rapport Piren Seine
- Olsson, A., Valters, K., & Burreau, S. (2000). Concentrations of organochlorine substances in relation to fish size and trophic position: a study on perch (*Perca fluviatilis L.*). *Environmental science & technology*, 34(23), 4878-4886.
- Varanasi, U. (1989). Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. CRC Press.
- Vives, I., Grimalt, J. O., Ventura, M., Catalán, J., & Rosseland, B. O. (2005). Age dependence of the accumulation of organochlorine pollutants in brown trout (*Salmo trutta*) from a remote high mountain lake (Redo, Pyrenees). *Environmental Pollution*, 133(2), 343-350