



HAL
open science

Identification des périodes de vulnérabilité de la biodiversité face aux fluctuations temporelles de contaminants d'origine agricole en zone tampon humide artificielle

Alexandre Michel

► To cite this version:

Alexandre Michel. Identification des périodes de vulnérabilité de la biodiversité face aux fluctuations temporelles de contaminants d'origine agricole en zone tampon humide artificielle. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-04186455

HAL Id: hal-04186455

<https://hal.inrae.fr/hal-04186455v1>

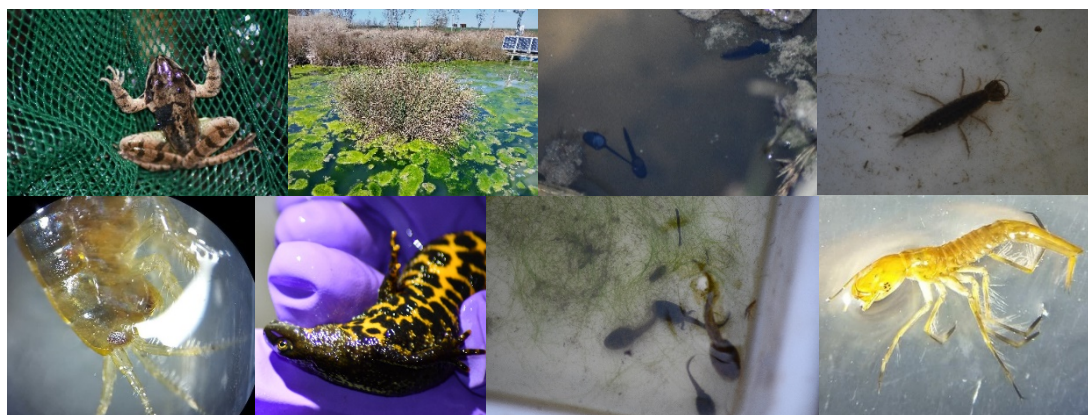
Submitted on 23 Aug 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MASTER RISQUES ET ENVIRONNEMENT
Parcours Biodiversité, Santé - Environnement

Identification des périodes de vulnérabilité de la biodiversité face aux fluctuations temporelles de contaminants d'origine agricole en zone tampon humide artificielle



Rapport de stage de Master 2

Alexandre MICHEL

Structure d'accueil : INRAE Ile-de-France – Jouy-en-Josas –
Antony ; Centre d'Antony ; 1 rue Pierre
Gilles de Gennes, 92160 Antony

Dates du stage : du 1^{er} février 2021 au 31 juillet 2021

Maîtres de stage : Aliénor JELIAZKOV et Jérémie LEBRUN

Tuteur universitaire : Stéphane BETOULLE

Équipe pédagogique : Michel COUDERCHET, Stéphane
BETOULLE, Élise DAVID



Sommaire

Page de garde	
Sommaire.....	
Remerciements et abréviations.....	
Liste des figures et des tableaux	
Liste des annexes	
Introduction.....	1
Matériel et méthodes	7
1. Site d'étude	7
2. Dynamiques chimiques et risque écologique	7
3. Inventaires écologiques.....	8
3.1. Les Macro-invertébrés benthiques	8
3.2. Les Amphibiens	8
4. Reconstruction des dynamiques écologiques et des périodes d'exposition.....	10
5. Superposition du risque écologique et des périodes d'exposition.....	11
6. Expérimentation pour l'étude de la vulnérabilité écologique au niveau des fonctions d'une espèce (<i>Gammarus fossarum</i>).....	11
6.1. Prélèvement des organismes.....	11
6.2. Conditions de stockage et nourrissage	12
6.3. Tri des mâles et des femelles.....	12
6.4. Préparation des feuilles	12
6.5. Exposition des gammares à un cocktail de contaminants.....	13
6.6. Mesures des paramètres biologiques.....	14
6.7. Traitements statistiques.....	14
Résultats.....	15
1. Dynamiques chimiques et risque écologique	15
2. Inventaires écologiques.....	15
2.1. Les Macro-invertébrés benthiques	15
2.2. Les Amphibiens	16
3. Reconstruction des dynamiques écologiques et des périodes d'exposition.....	16
4. Superposition du risque écologique et des périodes d'exposition	17
5. Sensibilité de <i>Gammarus fossarum</i> à un cocktail de contaminants	18
5.1. Conditions physico-chimiques	18
5.2. Réponses biologiques	19
5.3. Analyses multivariées	20
Discussion.....	21
1. Dynamiques chimiques et risque écologique	21
2. Inventaires et dynamiques écologiques	22
3. Superposition du risque écologique et des périodes d'exposition.....	23
4. Sensibilité de <i>Gammarus fossarum</i> à un cocktail de contaminants	24
Conclusion et perspectives	29
Bibliographie	
Sitographie	
Annexes	
Résumé	

Remerciements et abréviations

Je tenais, tout d'abord, à sincèrement remercier le directeur d'unité HYCAR, Vazken Andréassian pour son accueil, la Fédération Île-de-France de recherche sur l'environnement pour le financement de mon stage, Colin FONTAINE (Muséum national d'histoire naturelle) pour sa collaboration et la société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée pour son invitation à présenter mes travaux à leur colloque. Je remercie bien évidemment Aliénor et Jérémie en tant que tuteurs, en tant que guides et surtout en tant que figures amicales qui m'auront appris énormément et avec lesquels j'ai passé de très bons moments, surtout pour les sorties nocturnes Amphibiens qui ont généré quelques fous rires et pas mal de frayeurs aussi ! Merci à toi Aliénor pour ta présence et ton encadrement sans failles ! Merci à toi Jérémie pour ta bonne humeur et pour ta confiance ! Merci à Julien, en tant que super chef d'équipe. Merci aussi à Cédric pour ton expertise, ta polyvalence et pour ton travail sur les chroniques de pesticides qui m'a économisé énormément de temps ! Un grand merci à Virginie également pour ta gentillesse et ton expertise d'hydrobiologiste ! Merci à toi Guillaume pour tes travaux ! De manière plus générale, je remercie aussi l'équipe HEF, l'équipe ARTEMHYS, de m'avoir accueilli et pour les quelques moments passés ensemble ! Merci à Nathalie, Véronique et Catherine pour leur soutien administratif ! Je tenais à remercier très chaleureusement et avec beaucoup de nostalgie, Élise DAVID, Stéphane BETOULLE, Michel COUDERCHET, Claudia COSIO, Alain GEFFARD, Odile DEDOURGE-GEFFARD, Marc BONNARD, Mélissa PALOS-LADEIRO, Aurélie BIGOT-CLIVOT, Séverine PARIS, Émilie LANCE, Franck DARGENT, Jérémy MIROIR. Certains d'entre vous font partie des premières figures auxquelles je me suis fortement attaché au cours de mon passage à Reims et que j'ai côtoyées pendant presque six années. Merci pour tout !

AESN : Agence de l'eau Seine-Normandie

EFESE : Évaluation française des écosystèmes et des services écosystémiques

FIRE : Fédération Île-de-France de recherche sur l'environnement

INRA : Institut national de la recherche agronomique

INRAE : Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

IRSTEA : Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture

MNHN : Muséum national d'histoire naturelle

NQE : Norme de qualité environnementale

OFB : Office français pour la biodiversité

PNEC : *Predicted no effect concentration* = Concentration prédite sans effet

SEFA : Société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée

VGE : Valeur guide environnementale

ZTHA : Zone tampon humide artificielle

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Zone tampon humide artificielle (ZTHA) de Rampillon (Seine-et-Marne, 77) (p. 7)

Figure 2 : Fonctionnement de la ZTHA (p. 7)

Figure 3 : Les trois mares ayant fait l'objet d'inventaires écologiques en 2021 (p. 9)

Figure 4 : Schéma du protocole standardisé nocturne pour les inventaires et l'identification des espèces d'Amphibiens en milieu naturel (Jeliaskov et *al.*, 2013) (p. 9)

Figure 5 : Schéma du protocole de traitement des données de dynamiques écologiques (p. 11)

Figure 6 : Ru de Saint-Blandin (p. 12)

Figure 7 : Organismes non-cibles (p. 12)

Figure 8 : Armoire thermostatée (p. 12)

Figure 9 : Bacs de gammares femelles et mâles (p. 12)

Figure 10 : Protocole de l'expérience mésocosmes (p. 13)

Figure 11 : Mésocosmes aveugles (à gauche) et mésocosmes visibles (à droite) (p. 13)

Figure 12 : Dopage des mésocosmes visibles avec le cocktail de contaminants (p. 13)

Figure 13 : Une cage à gammares (p. 13)

Figure 14 : Bêchers pour l'expérience mésocosmes (p. 14)

Figure 15 : Distribution de la concentration moyenne (moyenne de 2011 à 2020) (en $\mu\text{g/L}$) de chaque grande famille chimique pour chaque quinzaine sur une année (p. 15)

Figure 16 : Concentration moyenne (moyenne de 2011 à 2020) de NO_3 (en mg/L) et des produits phytosanitaires totaux (en $\mu\text{g/L}$) pour chaque quinzaine sur une année (p. 15)

Figure 17 : Histogramme de la distribution de la somme des unités toxiques (ΣTU) (sans unité) basées sur les concentrations moyennes de toutes les molécules ciblées pour chaque quinzaine pour une année (p. 15)

Figure 18 : Les différents Macro-invertébrés benthiques recensés dans la ZTHA de Rampillon, en 2021 (p. 15)

Figure 19 : Les espèces d'Amphibiens inventoriées durant les sorties nocturnes (p. 16)

Figure 20 : Dendrogramme des groupes fonctionnels de Macro-invertébrés aquatiques (p. 16)

Figure 21 : Nombres d'espèces d'Amphibiens et groupes trophiques de Macro-invertébrés aquatiques exposés au cours d'une année (p. 17)

Figure 22 : Superposition du risque écologique (ΣTU) et du nombre d'espèces ou groupe d'espèces exposés aux contaminants dans la mare au cours d'une année (p. 17)

Figure 23 : Histogramme de la distribution de l'indice de vulnérabilité de la biodiversité de la mare terminale de la ZTHA de Rampillon face aux fluctuations temporelles de contaminants agricoles au cours d'une année (**p. 17**)

Figure 24 : Évolution des différentes conditions physico-chimiques au cours de l'expérience mésocosmes (**p. 18**)

Figure 25 : Boxplots des réponses des gammares selon les différentes conditions d'exposition en mésocosme (**p. 19**)

Figure 26 : Analyses en composantes principales (ACP) des résultats de l'expérience mésocosmes (**p. 20**)

Figure 27 : Analyse discriminante des redondances (RDA) des résultats de l'expérience mésocosmes (**p. 20**)

Tableau 1 : Liste des 76 molécules ciblées (**p. 8**)

Tableau 2 : Inventaire des Amphibiens et des Macro-invertébrés présents dans la mare en 2017 (Letournel, 2017) (**p. 8**)

Tableau 3 : Traits biologiques et écologiques des Macro-invertébrés benthiques et leurs modalités selon Tachet et *al.* (2010) (**p. 10**)

Tableau 4 : Phases d'exposition des Amphibiens et des Macro-invertébrés aux contaminants d'origine agricole dans la mare (**p. 17**)

Liste des annexes

Annexe I : Cycles de vie des Macro-invertébrés et cycles de vie des Amphibiens

Annexe II : Phases des cycles de vie des Amphibiens

Introduction

L'institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE) est issu de la fusion entre l'institut national de la recherche agronomique (INRA) et l'institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (IRSTEA) le 1^{er} janvier 2020. Il a pour vocation d'accompagner l'émergence de systèmes agricoles et alimentaires durables grâce à la recherche scientifique, l'innovation et l'appui aux politiques publiques afin de lier la performance des systèmes agricoles, l'assurance d'une alimentation humaine équilibrée et équitable ainsi que la pérennité des environnements naturels (inrae.fr, 2021). L'unité de recherche HYCAR (UR HYCAR), acronyme d'Hydrosystèmes Continentaux Anthropisés – Ressources, Risques, Restauration, est une unité de recherche implantée sur le site du centre INRAE d'Antony (Hauts-de-Seine, 92). L'unité mène des recherches visant à évaluer la qualité, la quantité des ressources en eau et les risques liés à l'eau mais également à restaurer les milieux aquatiques soumis aux activités anthropiques (jouy.inrae.fr, 2021).

L'office français pour la biodiversité (OFB) déclare en 2015 que plus de la moitié, soit environ 56 % des masses d'eau de surface françaises, sont évaluées en état moyen, médiocre ou mauvais (SDES et OFB, 2020). En 2014, la concentration totale en pesticides mesurée dans les eaux souterraines du département de la Seine-et-Marne s'élevait à 2,05 µg/L. La concentration en pesticides était ainsi 9,5 % au-dessus de la moyenne nationale (data-pesticide.fr, 2021 ; jbigdata.fr, 2021). La Seine-et-Marne est classée en tant que zone vulnérable, depuis 2007, du fait des concentrations en nitrates mesurées dans les eaux souterraines et de surfaces (DRIEE Ile-de-France, 2021). Un consensus est aujourd'hui établi quant à la causalité entre le niveau d'usage et de diffusion des produits phytosanitaires dans les écosystèmes agricoles et la dégradation des milieux (EFESE, 2020). Une partie des contaminants agricoles (pesticides, azote) épandus sur les sols cultivés atteint effectivement l'hydrosphère par diverses voies, comme le ruissellement par exemple, notamment dans un contexte de drainage des agroécosystèmes (Tournebize et *al.*, 2017) avec des conséquences avérées sur les écosystèmes aquatiques et leurs fonctions (Kohler et Tribskorn, 2013 ; Schäfer et *al.*, 2012).

Les zones tampons humides artificielles (ZTHA) sont des éléments paysagers à l'interface entre la parcelle et le milieu aquatique conçus pour limiter les transferts de produits phytosanitaires (pesticides, nitrates) par ruissellement et drainage et pour réduire leurs concentrations grâce à des fonctionnalités épuratoires naturelles (Tournebize et *al.*, 2017). Néanmoins, ces zones constituent des réservoirs potentiels de contaminants susceptibles d'impacter les espèces sauvages qu'elles abritent.



Le terme « biodiversité », popularisé par le Sommet de la Terre de Rio en 1992, englobe la diversité écologique (au niveau écosystémique), la diversité spécifique (au niveau des espèces vivantes) et la diversité génétique (au sein même des espèces). En Europe, la croissance des populations humaines a conduit à la destruction de bon nombre d'habitats naturels, habitats primaires des espèces vivantes. Une partie de la biodiversité trouve ainsi refuge dans les paysages agricoles auxquels elle est devenue particulièrement dépendante. Cette dépendance conduit donc les espèces vivantes à subir les effets positifs et négatifs de la gestion des territoires par les activités agricoles (Le Roux et *al.*, 2012). C'est le cas des oiseaux notamment ; la pression chimique générée par ces activités et les pratiques mécaniques impactent négativement leurs communautés (Jeliazkov et *al.*, 2016). Par ailleurs, la qualité de l'eau au sein des paysages agricoles a une très grande influence sur les communautés d'Amphibiens (Jeliazkov et *al.*, 2014).

Les Amphibiens sont les organismes vertébrés dont la situation écologique est la plus dramatique : leur déclin est plus important que celui des mammifères et des oiseaux. L'exposition aux xénobiotiques, la destruction des habitats, les zoonoses, la compétition avec les espèces invasives et la surexploitation sont les causes du déclin des Amphibiens notamment. La susceptibilité de ces animaux face aux xénobiotiques provient notamment du fait que certaines espèces résident ou migrent au sein des paysages agricoles, paysages très soumis à diverses pressions chimiques liées à l'utilisation de produits phytosanitaires et d'engrais pour les activités agricoles. En effet, organophosphates, organochlorines, carbamates et pyréthroides sont autant de substances chimiques ayant des propriétés toxiques sur la batrachofaune. Les voies d'exposition majoritaires sont le contact avec l'eau et le sédiment. Les Amphibiens sont exposés aux contaminants présents dans l'eau qui proviennent des pulvérisations aériennes de produits, du ruissellement, du réseau de drainage et de la déposition atmosphérique. Leurs niveaux d'exposition écotoxicologiquement pertinents (EREQ) sont reliés directement aux concentrations dissoutes dans l'eau. Les organismes sont également exposés oralement, de façon cependant minoritaire, lorsqu'ils consomment des organismes animaux, végétaux ou microbiens. Les pyréthroides sont particulièrement concernés par cette voie d'exposition puisqu'ils ont une forte capacité d'adsorption. L'EREQ (Ecotoxicologically Relevant Exposure Quantities) orale est reliée à la masse prise par un individu journalièrement. Enfin, l'inhalation de substances dans l'air constitue une voie d'exposition, cependant caractérisée comme voie mineure comparée aux voies orale et de contact (EFSA, 2017).



D'autre part, l'écophysiologie des Amphibiens joue un rôle important dans leur vulnérabilité face aux pesticides. La poïkilothermie des organismes Amphibiens joue effectivement un rôle majeur dans leur toxico-susceptibilité face aux contaminants. Leur taux métabolique, supérieur à celui des homéothermes, est responsable d'une demande énergétique plus importante et d'un taux de respiration plus conséquent favorisant l'entrée de pesticides par inhalation. L'étude de Belden et *al.* (2010) montre qu'une exposition à un fongicide par voie aérienne (spray) de même importance que dans les conditions normales d'utilisation pour l'agriculture induit une mortalité de 100% chez les têtards de *Bufo cognatus*. Le seul contact avec un sol contaminé constitue aussi une voie d'exposition pour les organismes, même si cette voie d'exposition reste moins cruciale que la voie d'exposition aérienne. L'exposition via l'alimentation et via la voie dermique sont d'importances égales. Le cycle de vie de ces animaux a une influence majeure sur leur exposition (EFSA, 2017). Des études de terrain et de laboratoire établissent le caractère toxique / écotoxique des pesticides d'origine agricole sur ces animaux, l'exposition à ces substances est donc susceptible de provoquer le déclin de leurs populations. Des effets létaux, tératogènes, endocriniens, reproducteurs, comportementaux, immunosuppresseurs et génotoxiques des pesticides sur les Amphibiens sont démontrés par de nombreuses études (EFSA, 2017).

Les insecticides organochlorés, comme le DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane) sont aujourd'hui interdits en raison de leur toxicité et de leur écotoxicité, mais certains de leurs composés étaient encore retrouvés 25 ans après leur interdiction dans les tissus des Amphibiens (Duguet et Melki, 2003). D'autres insecticides, comme les pyréthriinoïdes peuvent s'avérer hautement toxiques pour les Amphibiens en interagissant avec les membranes des neurones. En effet, des effets neurotoxiques de la cyperméthrine et la deltaméthrine, deux insecticides, ont été montrés chez *Physalaemus gracilis* (Anoure) par exemple (Macagnan et *al.*, 2017). Le glyphosate (notamment utilisé dans le cocktail testé sur le gammare), herbicide total, est toxique pour plusieurs espèces d'Amphibiens (Howe et *al.*, 2004 ; Wagner et *al.*, 2013). L'acétochlore (herbicide) peut induire une action mimétique des hormones impliquées dans la métamorphose (acide rétinoïde) et modifie la vitesse de développement en fonction de la période d'exposition (Cheek et *al.*, 1999). Les nitrites, eux, induisent une toxicité aiguë chez les têtards. Le pouvoir toxique des nitrates est en général moins important que celui des nitrites mais dépend de l'espèce considérée (Shinn et *al.*, 2008 ; Hecnar, 1995). L'eutrophisation induite par les nitrates, conduisant à la prolifération d'hydrophytes, comme les lentilles d'eau notamment (famille des Araceae) peut faire chuter le taux d'oxygène disponible pour les espèces aquatiques vivant dans la colonne d'eau et être ainsi indirectement responsable du déclin des densités d'Amphibiens (Duguet et Melki, 2003).



Dans une autre mesure, les Macro-invertébrés benthiques sont aussi des organismes sensibles aux pressions chimiques d'origine agricole. De nombreuses données sur la sensibilité des invertébrés aquatiques sont disponibles dans la littérature et permettent de mieux cerner la vulnérabilité de ces organismes face à ces substances. Les pesticides utilisés en Europe peuvent être responsable du déclin de jusqu'à 42 % des espèces d'invertébrés aquatiques des milieux lotiques (Beketov, 2013). Selon plusieurs auteurs, de nombreux ordres de Macro-invertébrés sont sensibles mais les ordres *Plecoptera*, *Ephemeroptera*, *Diptera* et *Trichoptera* seraient les plus sensibles aux pesticides et leurs communautés peuvent être impactées par ces substances (Schulz et Liess, 1999 ; Wogram et Liess, 2001 ; Berenzen et al., 2005). Kristoff et coll. ont montré, par exemple, en laboratoire que le pesticide carbaryl (carbamate) avait des effets inhibiteurs sur deux enzymes, la cholinestérase et la carboxylestérase chez un gastropode (*Biomphalaria glabrata*) et un oligochète aquatiques (*Lumbriculus variegatus*) (Kristoff et al., 2010).

Dans le contexte d'un environnement soumis aux pressions chimiques pouvant impacter la qualité des milieux et les ressources en eaux potables, l'équipe ARTEMHYS (Atténuation, Remédiation, Transfert et Modélisation des HydroSystèmes) au sein de l'UR HYCAR travaille, depuis 2005, sur la mise en place et l'utilisation d'une zone tampon humide artificielle. Entre 1949 et 1970 ce qui allait devenir aujourd'hui la ZTHA de la commune de Rampillon était un espace de friche humide, qui peu à peu, allait se convertir en zone boisée, servant d'appoint pour la production de bois et pour le pâturage des animaux. Entre 1970 et 1990, la zone redevient une friche humide, mais dès 1990, elle est convertie en zone de production agricole et perd son caractère humide en 1997. Étant cependant trop peu productive, elle regagne, progressivement, son statut de zone humide naturelle et en 2010 est créée la ZTHA sous la tutelle du syndicat mixte des quatre vallées de la Brie (Chaumont et al., 2017).

Cette zone expérimentale, intégrée en plein bassin agricole et située entre la parcelle agricole et le cours d'eau, est utilisée, depuis 2012, par l'UR HYCAR en tant que site pilote instrumenté pour le suivi de la qualité de l'eau (suivis continus des flux de nitrates et pesticides) et pour le suivi de la biodiversité. Elle est conçue pour collecter les eaux de ruissellement et de drainage de son bassin versant agricole. Ces eaux, chargées en engrais et pesticides, sont collectées en amont de la zone de captage. Les substances sont dégradées par l'action conjointe du soleil (photolyse), des bactéries et des végétaux (biodégradation) ou piégées par séquestration dans les sédiments (une partie marginale peut également être volatilisée et hydrolysée). Ainsi, le but du projet, dans lequel s'intègre cette ZTHA, est de réduire, les pollutions diffuses et les transferts par interception des flux



d'eau. La ZTHA de Rampillon réduit environ 40% des pollutions liées aux pesticides (artemhys.inrae.fr, 2021).

Cependant, en jouant le rôle de zone tampon, la ZTHA de Rampillon agit comme un réservoir de contaminants pouvant impacter la biodiversité qui y vit. Letournel (2017) a inventorié et fait l'état de la biodiversité de la ZTHA. Cette richesse se traduit au travers de :

- la mammalofaune : ragondins (*Myocastor coypus*), campagnol amphibie (*Arvicola sapidus*), chiroptères,
- l'herpétofaune : une dizaine d'espèces d'Amphibiens, des reptiles tels que la couleuvre à collier (*Natrix natrix*), l'orvet fragile (*Anguis fragilis*),
- l'avifaune : rossignol philomèle (*Luscinia megarhynchos*), poule d'eau (*Gallinula chloropus*) (une cinquantaine d'espèces au total),
- l'ichtyofaune : gambusie (*Gambusia affinis*), loche d'étang (*Misgurnus fossilis*), tanche (*Tinca tinca*),
- la faune macro-invertébrée : odonates, arachnides, crustacés (aselle (*Asellus aquaticus*), gammares (*Gammarus sp.*)), coléoptères, hémiptères aquatiques, etc.),
- la flore (*Carex sp.*, *Phragmites sp.*, joncs,),
- etc.

La zone humide est écologiquement pertinente avec sa connectivité non négligeable au reste du paysage, liée à la présence du ru des Gouffres (trame bleue) et ses habitats diversifiés (mare, bois, friche) (Letournel et al., 2021). La biodiversité y est importante, le risque écologique lié à la pression chimique pesant sur les espèces vivantes de la mare est donc potentiellement important.

En vue d'évaluer l'impact potentiel des polluants piégés par la ZTHA sur la biodiversité, l'objectif des recherches entreprises est d'identifier les périodes et les facteurs de vulnérabilité des communautés d'êtres vivants face aux pressions chimiques agricoles dans la ZTHA. Pour répondre à cette problématique, plusieurs tâches sont réalisées, faisant respectivement appel à (i) de la chimie environnementale pour décrire les dynamiques chimiques dans la ZTHA, (ii) de l'écologie descriptive pour décrire les dynamiques biologiques potentielles dans la ZTHA, (iii) de l'écotoxicologie pour comprendre les processus sous-tendant les réponses écologiques aux contaminants.

Dans un premier temps, l'utilisation et le traitement des données chroniques de flux de pesticides alimentées depuis 2011 permettra, de rendre compte, de manière synthétique, de la distribution des différents contaminants d'origine agricole au cours du temps, puis de relier ces dynamiques chimiques à des valeurs seuils environnementales



telles que les valeurs guides environnementales (VGE), les concentrations prédites sans effet (PNEC) ou les normes de qualité environnementale (NQE) et ainsi définir des valeurs d'unités toxiques (« *toxic unit* » (TU) en anglais).

Parallèlement, pour rendre compte des dynamiques écologiques potentielles de la ZTHA, nous proposons de reconstruire les cycles de vie des espèces d'Amphibiens et de Macro-invertébrés recensées dans la ZTHA lors des inventaires de Letournel (2017). À partir de recherches bibliographiques et d'observations de terrain, les cycles de vie d'espèces de ces communautés seront reconstruits pour identifier les phases se déroulant en milieu aquatique et donc potentiellement exposées (par exemple, reproduction, développement larvaire) aux contaminants issus des eaux de drainage. La superposition des dynamiques chimiques avec ces dynamiques écologiques (phases d'exposition) permettra de développer un indice de vulnérabilité de la biodiversité et de rendre compte, à un certain niveau de vraisemblance, du risque écologique que représente la pression chimique de la ZTHA.

Afin de tester plus finement la vulnérabilité écologique de la biodiversité face aux contaminants, des gammares (*Gammarus fossarum*) seront exposés en mésocosmes dans une eau chargée en contaminants d'origine agricole (pesticides et nitrates) et quatre réponses fonctionnelles (locomotion, alimentation, survie, reproduction) seront mesurées. L'analyse statistique des résultats expérimentaux permettra de vérifier l'hypothèse d'une influence négative du cocktail de contaminants sur ces réponses au niveau individuel et, par voie de conséquence, sur les fonctions écosystémiques telles que la dégradation de la litière.

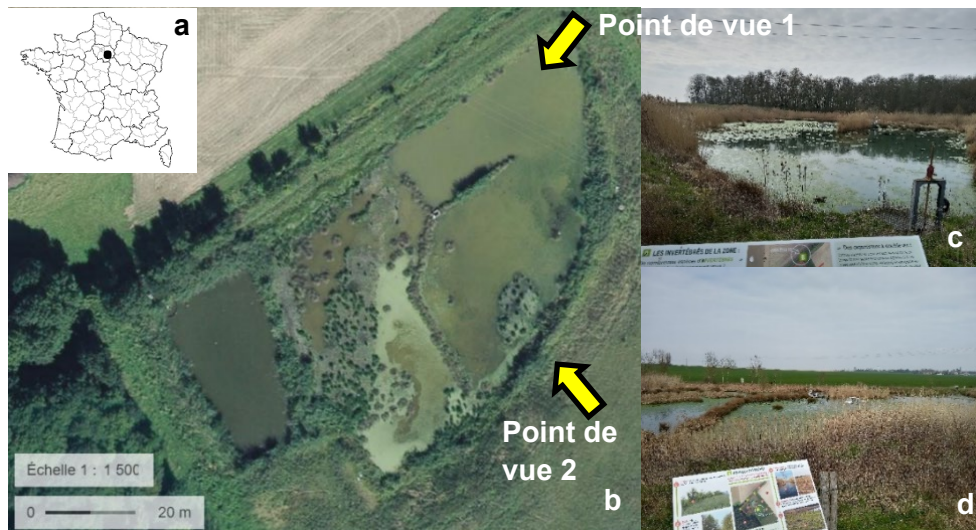


Figure 1 : Zone tampon humide artificielle (ZTHA) de Rampillon (Seine-et-Marne, 77). (a) Carte de la situation géographique de la ZTHA en France métropolitaine (point noir). (b) Image satellite de la mare (échelle : 1/1.500) (Géoportail – Images satellites 2017). (c et d) Photographies de la mare prises le 25 mars 2021. (c) point de vue 1 ; (d) point de vue 2. Photographies b : Cédric CHAUMONT, Julien TOURNEBIZE. Photographies c et d Alexandre MICHEL.



Figure 2 : Fonctionnement de la ZTHA (Cédric CHAUMONT, Julien TOURNEBIZE).

Matériel et méthodes

1. Site d'étude

Le site d'étude est la zone tampon humide artificielle située dans la commune de Rampillon en Seine-et-Marne (77) (Figure 1). La commune de Rampillon est située dans l'écozone du paléarctique, dans l'écoprovince atlantique, dans l'écorégion des forêts de feuillus caducifoliées tempérées (Udvardy, 1975). La mare repose sur une couche d'argile verte, de glaises à cyrènes et/ou marnes vertes et blanches (argile verte de Romainville) (infoterre.brgm.fr, 2021). Elle s'élève à 130 m d'altitude par rapport au niveau de la mer (geoportail.gouv.fr, 2021). Elle bénéficie des conditions météorologiques du climat océanique altéré (meteofrance.com, 2020). La zone appartient à l'hydroécocorégion des tables calcaires (Chandesris et al., 2006). La ZTHA de Rampillon intercepte les eaux de drainage d'un bassin versant de 355 ha soumis à des cultures intensives. Elle est à l'amont d'une zone d'engouffrement directe dans la nappe de Champigny expiquant les enjeux environnementaux et sanitaires. Deux petites mares sont situées dans le bois à environ 50m de la ZTHA (geoportail.gouv.fr).

2. Dynamiques chimiques et risque écologique

Un suivi haute fréquence en continue de l'azote en entrée et en sortie de la ZTHA, est assuré par des sondes spectrophotométriques UV. Un suivi hebdomadaire des pesticides et des nitrates par prélèvement d'échantillons composites moyennés asservis au débit est effectué en trois points (en entrée, en sortie de la ZTHA et à l'exutoire du bassin versant) selon une fréquence moyenne de 10 jours (une à deux semaines) selon la saison hydrologique et les écoulements observés (Tournebize, 2016) (Figure 2). Cette base de données initiée en 2011 et stockée sous Excel (Microsoft), recense, notamment, les données de flux de pesticides et d'azote, les données hydrologiques et météorologiques sur le site de Rampillon et les données techniques sur les modalités de prélèvements. Une concentration moyenne périodique pour chaque substance est définie sur des périodes allant de 8 à 21 jours de prélèvement environ (moyenne de 10 jours). Pour chaque substance, une concentration moyenne pour chaque jour des années 2011 à 2020 est attribuée en considérant la concentration moyenne obtenue pour ces périodes comme représentative des concentrations moyennes journalières au cours de ces même périodes. Ensuite, les concentrations journalières d'une substance donnée sont moyennées pour chaque quinzaine. Les concentrations moyennes obtenues, pour une substance, pour une quinzaine donnée, sont moyennées pour toutes les années de suivi. En conclusion, pour une quinzaine donnée, sur une année « type », est attribuée la concentration moyenne (moyenne sur 9 ans de suivi) d'une substance donnée.

Tableau 1 : Liste des 76 molécules ciblées.





Chloridazone	Trisulfuron-méthyl	Atrazine 2-hydroxy
Bentazone	Benoxacor	AMPA
Métolachlor	Dicamba	Atrazine déséthyl
Imazamox	Dinoterb	Atrazine désopropyl
Glyphosate	Terbuthylazine	Terbuthylazine 2-hydroxy (Hydroxyterbuthylazine)
Chlorotoluron	Florasulam	2,6-dichlorobenzamide
Diflufenicanil	Dimetachlore	Dimetachlore-ESA (dimetachlore CGA 354742)
Lenacilic	Clopyralid	Métolachlor- OXA (métolachlor oxalinic acid)
Quinmerac	Isoproturon	Métolachlor- ESA (métolachlor ethylsulfonic acid)
Atrazine	Cyproconazole	Flufenacet-OXA
Ethofumesate	Boscalid	Flufenacet-ESA
Propyzamide	Oxadixyl	Dimethenamide-ESA
Mesosulfuron methyl	Tebuconazole	Metazachlor-ESA (metazachlor sulfonic acid)
Mesotrione	Epoxyconazole	Dimethenamide-OXA
Metamitron	Azoxystrobine	
Nicosulfuron	Pentachlorophénol	Légende :
Pendimethaline	Metconazole	 Herbicide
Fluroxypyr	Flutriafol	
Acifluorfen	Prochloraz	 Fongicide
Prosulfocarbe	Siltiofam	
2,4-MCPA	Metaxyl	
Prosulfuron	Picoxystrobine	 Insecticide
Dimethenamide	Propiconazole	
Flurtamone	Flusilazole	
Tribenuron-méthyl	Pyraclostrobine	 Métabolite
Flufenacet	Cyprodinil	
Métazachlor	Fluxapyroxad	
Clomazone	Imidaclopride	
Napropamide	Thiamethoxam	
2,4-D	Giothiandine	
Bromoxynil	Pymcarbe	

Tableau 2 : Inventaire des Amphibiens et des Macro-invertébrés présents dans la mare en 2017 (Letournel, 2017). En rouge : les deux espèces d'Amphibiens potentiellement présentes mais non recensées.

Vertebrata	Invertebrata
Anura	<i>Acilius sp</i>
<i>Alytes obstetricans</i>	<i>Aeshna</i>
<i>Bufo bufo</i>	<i>Anopheles</i>
<i>Hyla arborea</i>	<i>Asellus asellus</i>
<i>Lithobates catesbeianus</i>	<i>Berosus sp</i>
<i>Rana dalmatina</i>	<i>Boyeria irene</i>
<i>Rana temporaria</i>	<i>Brachytron pratense</i>
<i>Pelophylax sp.</i>	<i>Cloeon sp</i>
Caudata	<i>Enallagma cyathigerum</i>
<i>Triturus cristatus</i>	<i>Erythroma viridis</i>
<i>Lissotriton helveticus</i>	<i>Gerris sp</i>
<i>Lissotriton vulgaris</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>
	<i>Helochares lividus</i>
	<i>Hydaticus sp</i>
	<i>Hyphydrus ovatus</i>
	<i>Ischnura sp</i>
	<i>Laccophilus</i>
	<i>Micronecta sp</i>
	<i>Naucoris sp</i>
	<i>Noterus sp</i>
	<i>Notonecta sp</i>
	<i>Orthetrum cancelatum</i>
	<i>Physa sp</i>
	<i>Planorbarius sp</i>
	<i>Plea leachi</i>
	<i>Radix sp</i>
	<i>Ranatra linearis</i>
	<i>Ranthus sp</i>
	<i>Sphaerium</i>
	<i>Stagnicola sp</i>
	<i>Tanytarsini sp</i>

Via l'outil Excel, des boîtes à moustaches (boxplots) ont été réalisées pour représenter la distribution de la concentration moyenne annuelle pour une substance ou une famille chimique par quinzaine. Un total de 76 substances sont ciblées parmi 575 molécules suivies (les substances jamais détectées ne sont pas prises en compte, d'où le fait que seulement 13 % des 575 substances soient ciblées) (Tableau 1). Le risque écologique (RE) pour chaque quinzaine est égal à la somme, pour toutes les molécules, du rapport entre la concentration observée de la substance et la norme environnementale en vigueur pour cette substance (rapport connue aussi sous le nom d'unités toxiques, ou *TU* pour *Toxic Unit* ou de quotient du risque, ou QR pour *Quotient Risk*) (norme basée sur la PNEC, la VGE ou la NQE selon les données disponibles) (Ginebreda et al., 2014 ; Hela et al., 2005) :

$$RE_{quinzaine} = \sum_{i=1}^{n=76} TU_{i,quinzaine} = \sum_{i=1}^{n=76} \frac{C_{i,quinzaine}}{Norme_i}$$

Où *quinzaine* correspond à la période de 15 jours ciblée, *i* à la substance, *n* au nombre total de substances étudiées, *TU_{i, quinzaine}* l'unité toxique de la substance *i* pour la période *quinzaine*, *C_{i, quinzaine}* la concentration de la substance *i* observée pendant la période *quinzaine*, et *Norme_i* la norme environnementale en vigueur pour la substance concernée.

Les valeurs de normes environnementales ont été fournies par la base de données *substances chimiques* de l'INERIS (substances.ineris.fr). Lorsqu'aucune valeur de norme n'est disponible pour une substance, elle s'est vue appliquée une valeur de seuil de 0,1 µg/L par défaut (senat.fr, 2021). Ce travail m'a permis d'évaluer le risque écologique associé à la pression chimique au cours d'une année (Résultats – 1.).

3. Inventaires écologiques

3.1. Les Macro-invertébrés benthiques

L'inventaire de Letournel (2017) a recensé, dans la mare, une trentaine d'espèces de Macro-invertébrés (Tableau 2). En complément de ces inventaires, pour vérifier l'état actuel de cette communauté, un relevé simplifié (non standardisé) a été réalisé au mois de mars 2021 sur quatre sites de prélèvement dans la mare de sorte à échantillonner des habitats différents (par exemple, les sédiments, les zones à macrophytes) à l'aide d'un filet trouble-eau de type Surber.

3.2. Les Amphibiens

L'inventaire de Letournel (2017) a recensé, dans la mare, huit espèces ou groupes d'espèces d'Amphibiens (Tableau 2). Un dossier de demande de dérogation pour la capture ou l'enlèvement de spécimens d'espèces animales protégées CERFA est mis en place afin d'être autorisé à prospector les mares de Rampillon et à manipuler les Amphibiens.

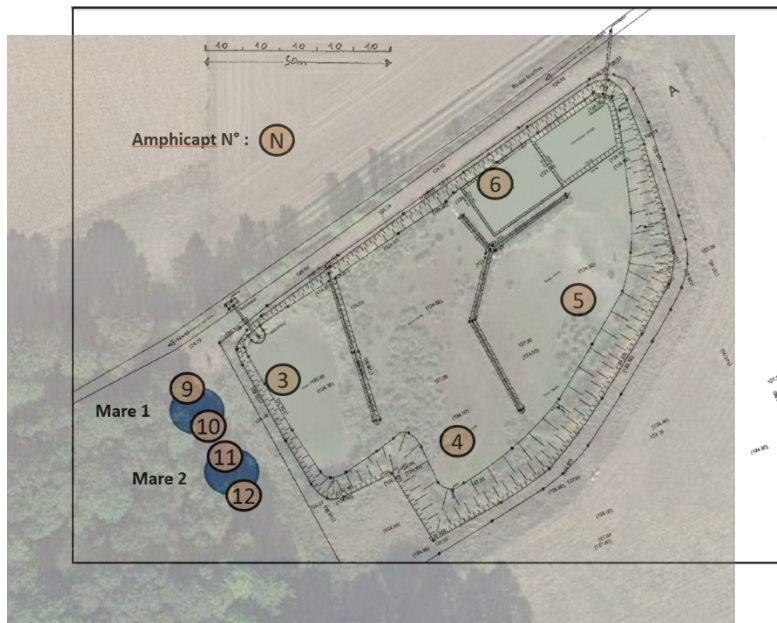


Figure 3 : Les trois mares ayant fait l'objet d'inventaires écologiques en 2021. La mare 1 et la mare 2 correspondent aux mares du bois adjacent à la mare terminale. La position des amphicapt est indiquée dans les cercles beige



Figure 4 : Schéma du protocole standardisé nocturne pour les inventaires et l'identification des espèces d'Amphibiens en milieu naturel (Jeliaskov et al., 2013). (a) Découpage de la mare en cinq transects. (b) Session de cinq minutes d'écoute des chants d'anoures (c, d, e) Prospection des cinq transects à l'aide de lampes (f, g) Échantillonnage par épumette de larves / têtards (ou d'individus adultes) au niveau des cinq placettes. Photographies Aliénor JELIAZKOV, Alexandre MICHEL

Des sorties nocturnes sont réalisées tous les 15 jours ou 21 jours à partir du 1^{er} avril 2021 dans la commune de Rampillon (77) (soit un total de six sessions d'environ 5h chacune) afin d'inventorier l'herpétofaune et ainsi valider certaines étapes du cycle de vie des espèces rencontrées. Une première session de prospection en avril, cible les espèces précoces d'Amphibiens principalement au stade adulte (notamment grenouilles brunes, crapauds, certains tritons qui se reproduisent tôt dans l'année par rapport à d'autres) et pontes. Les sessions suivantes sont prévues chaque mois (i) pour couvrir plusieurs phases de cycle (reproduction, pontes, phases têtards/larves) de différentes espèces, et (ii) détecter des espèces tardives (notamment Grenouilles vertes, certains Tritons). La mare terminale et les deux mares du bois adjacentes sont inspectées car susceptibles d'être connectées par des échanges d'individus du fait de leur proximité (Figure 3).

La diversité et le nombre de détections par espèces d'Amphibiens sont évalués par protocole standardisé au niveau des cinq placettes équidistantes (de 2 à 3m de long sur la berge) pour chaque mare (Figures 3 et 4a) (Jeliazkov et *al.*, 2014). La prospection débute à la tombée de la nuit par l'identification au chant pour les anoues (Figure 4b). Le reste des observations se fait par détermination à vue grâce à des lampes torches (Figure 4c, d, e). Lorsque l'identification à vue des individus adultes n'est pas possible, la capture de l'animal, à l'aide du filet, est nécessaire pour l'observer de près et recenser les critères permettant son identification. L'observation dure dans ce cas moins de 5 minutes puis l'animal est immédiatement relâché dans son milieu, à l'endroit où il a été capturé. Il est à noter que dans le cadre de cette étude, les trois différentes espèces du complexe des Grenouilles vertes (*Pelophylax sp.*) ne sont pas distinguées, les critères d'identification étant particulièrement difficiles à vérifier sur ce type de terrain. Pour détecter les individus aux stades larvaires/têtards, il est nécessaire de réaliser une capture à l'aide d'une épuisette (de maille 5 mm) dans les cinq placettes par mare (Figure 4f, 4g). Une fois identifiés, les animaux sont immédiatement relâchés. Cette méthode de capture consiste à racler le fond de la mare avec l'épuisette sur un mètre environ. La manipulation des individus se fait avec des gants qui sont changés entre chaque mare pour éviter toute contamination par la chytridiomycose, batrachodermatomyose provoquée par un champignon aquatique, *Batrachochytrium dendrobatidis*, et responsable du déclin de leurs populations (Kriger et Hero, 2006). L'épuisette, seul matériel susceptible d'entrer en contact avec les animaux, est également désinfectée à l'alcool à 70% au-dessus d'un bac collecteur en évitant tout épandage dans le milieu.

Enfin, pour compléter ces observations, des amphicaptis (Maillet, 2013) sont posés et relevés pour les trois mares, permettant d'améliorer la détectabilité des tritons qui est très faible comparée à celles des anoues (Figure 3).

Tableau 3 : Traits biologiques et écologiques des Macro-invertébrés benthiques et leurs modalités selon Tachet et al. (2010). En vert : traits sélectionnés pour leur pertinence dans la compréhension des réponses écotoxicologiques (Nombre de génération/an, stades aquatiques, techniques de reproduction, mode d'alimentation, forme de résistance, respiration, mode de locomotion / relation au substrat, nourriture, substrat, statut trophique du milieu, valeur saprobiale)

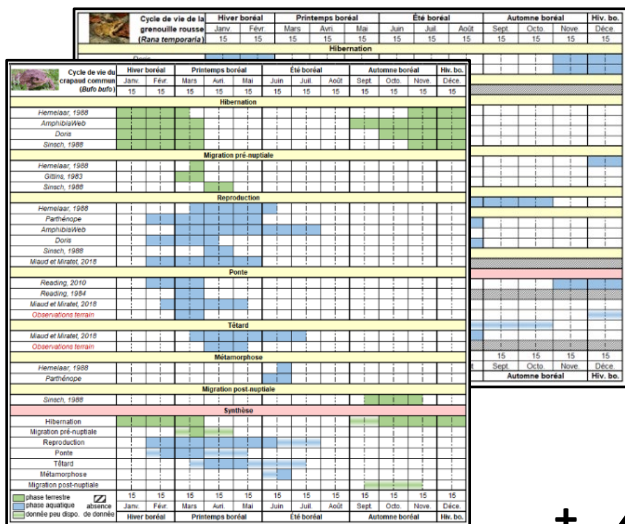
Trait	Modalité	Trait	Modalité	
Taille maximale	≤ 25 cm	Formes de résistance	eggs, statoblasts	
	> 25- 5 cm		cocoons	
	> 5-1 cm		housings against desiccation	
	> 1-2 cm		diapause or dormancy	
	> 2-4 cm		none	
	> 4-8 cm		tegument	
	> 8 cm		gill	
Durée du cycle vital	≤ 1 year	Respiration	plastron	
	> 1 year		spiracle	
Nombre de générations/an	< 1		hydrostatic vesicle	
	1		flier	
Stades aquatiques	> 1	Mode de Locomotion / Relation au substrat	surface swimmer	
	egg		full water swimmer	
	larva		crawler	
	nymph		burrower	
	adult		interstitial	
Technique de Reproduction	ovoviviparity	temporarily attached		
	isolated eggs, free	permanently attached		
	isolated eggs, cemented	microorganisms		
	clutches, cemented or fixed	detritus (< 1mm)		
	clutches, free	dead plant (>= 1mm)		
	clutches, in vegetation	living microphytes		
	clutches, terrestrial	living macrophytes		
Dispersion	asexual reproduction	Nourriture	dead animal (>= 1mm)	
	aquatic passive		living microinvertebrates	
	aquatic active		living macroinvertebrates	
	aerial passive		vertebrates	
Mode d'alimentation	aerial active		Substrat	flags/boulders/cobbles/pebbles
	absorber			gravel
	deposit feeder			sand
	shredder	silt		
	scraper	macrophytes		
	filter-feeder	microphytes		
	piercer	twigs/roots		
	predator	organic detritus/litter		
	parasite	mud		
	Distribution transversale	river channel		Vitesse du courant
banks, connected side-arms		slow (< 25 cm/s)		
ponds, pools, disconnected side-arms		medium (25-50 cm</s)		
marshes, peat bogs		Statut trophique	fast (> 50 cm/s)	
temporary waters			oligotrophic	
lakes			mesotrophic	
Distribution longitudinale	groundwaters	eutrophic		
	crenon	Salinité	freshwater	
	epirithron		brackish water	
	metarithron	Température	cold (< 15°C)	
	hyporithron		warm (> 15°C)	
	epipotamon		eurythermic	
	Altitude	metapotamon	Valeur saprobiale	xenosaprobic
estuary		oligosaprobic		
outside river system		b-mesosaprobic		
Zones biogéographiques	lowlands	a-mesosaprobic		
	2 : Pyrenees	polysaprobic		
	4 : Alps	≤ 4		
	8 : Vosges, Jura, Massif Central	> 4-4.5		
	13a : lowlands (oceanic)	> 4.5-5		
Zones biogéographiques	13b : lowlands (mediterranean)	> 5-5.5		
		> 5.5-6		
		> 6		

4. Reconstruction des dynamiques écologiques et des périodes d'exposition

Pour cibler un nombre raisonnable d'espèces de Macro-invertébrés pour lesquelles reconstruire les dynamiques écologiques et qui soient représentatives de différents groupes fonctionnels, 11 des traits biologiques sur les 22 disponibles selon Tachet et *al.* (2010) sont sélectionnés (11 sur 22 traits) (Tableau 3). Ces traits sont le plus à même de constituer des groupes fonctionnels dont les réponses physiologiques des représentants à la pression chimique sont potentiellement similaires (traits écotoxicologiquement pertinents). Afin de rassembler les taxons par groupes fonctionnels, il est nécessaire d'évaluer statistiquement leur degré de ressemblance / différence sur la base de la matrice de traits. Pour ce faire, à l'aide de l'outil de traitement de données biostatistiques R, j'ai réalisé une analyse en coordonnées principales (PCoA) (package « ape ») puis une analyse de classification hiérarchique (fonction « hclusts », package « StatMatch ») par la méthode de « Ward.d », ce qui m'a permis de mettre en évidence et visualiser les grands groupes fonctionnels de Macro-invertébrés benthiques dans la zone. Les représentants les plus abondants de ces groupes fonctionnels sont sélectionnés puis leur cycle de vie est réalisé (voir section 4).

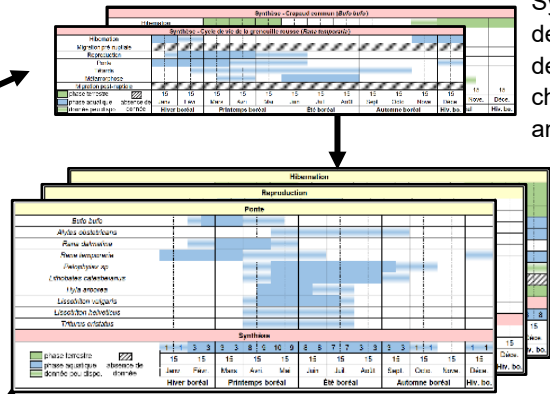
Pour reconstruire les cycles de vie des espèces présentes dans la ZTHA, j'ai réalisé une fouille bibliographique sur la base de divers ouvrages, numériques et non numériques, et de publications scientifiques. Les moteurs de recherche, comme Google Scholar et Scopus m'ont permis de réaliser des recherches spécifiques par mots-clefs pour trouver de la littérature informant les phases de cycles de vie et les périodes associées pour chaque espèce (par exemple : « *Rana dalmatina spawning period* »).

L'ensemble des informations des phases de cycles de vie des Amphibiens et des Macro-invertébrés sont résumées dans des figures réalisées à l'aide du tableur Excel. Concernant les Amphibiens, leurs cycles vitaux sont établis grâce aux informations, notamment, de l'ouvrage ACEMAV (Duguet et Melki, 2003) et l'ouvrage de Miaud et Miratet (2018), des sites Internet *Amphibia Web* (amphibiaweb.org), Doris (doris.ffesm.fr) et de l'institut national du patrimoine naturel du muséum national d'histoire naturelle (inpn.mnhn.fr) (voir sitographie). Une fois la synthèse du cycle de vie de chaque espèce réalisée, les données sont synthétisées dans une matrice combinant les données de l'ensemble des espèces, et chaque phase du cycle de vie. Une seconde synthèse rend compte de l'étendue de chaque phase dans le temps et du nombre d'espèces réalisant cette phase pour chaque quinzaine afin de savoir comment varie au cours de l'année le nombre d'espèces se trouvant en phase aquatique. En effet, les périodes où les organismes sont potentiellement exposés sont les phases qui se déroulent en milieu aquatique, à savoir les phases d'hibernation, lorsqu'elles sont aquatiques, de reproduction, de ponte, les stades larvaires et têtards et le stade de métamorphose. Nous considérons que les organismes ne sont pas



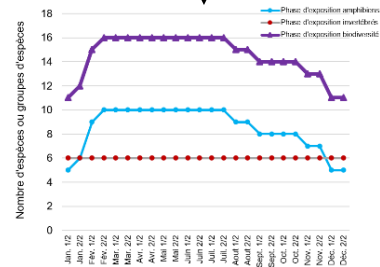
Description des cycles de vie pour chaque amphibien selon la bibliographie

Synthèse des cycles de vie de chaque amphibien



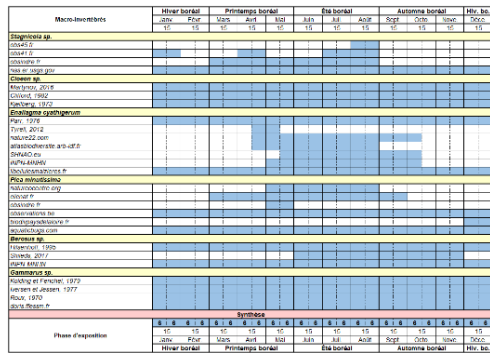
Dynamique de chaque grande phase du cycle de vie (hibernation, reproduction, etc.) et nombre d'espèce réalisant chaque phase par quinzaine.

	Hiver boréal		Printemps boréal				Été boréal			Automne boréal			Hiv. bo.						
	Janv.	Févr.	Mars	Avril	Mai	Jun	Juil.	Août	Sept.	Octo.	Nov.	Déc.							
Phase d'exposition amphibiens	5	6	9	10	10	10	10	10	10	10	9	8	8	8	7	7	5	5	
Phase d'exposition invertébrés	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Phase d'exposition biodiversité	11	12	15	16	16	16	16	16	16	16	16	15	15	14	14	14	13	11	11

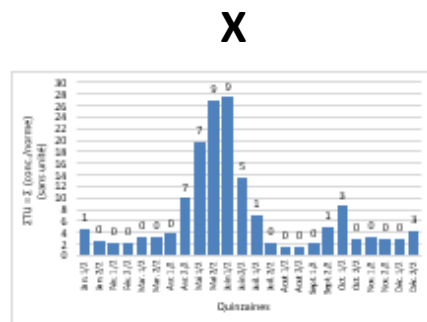


Phases au cours desquelles les Amphibiens et les Macro-invertébrés sont exposés. Somme des espèces qui sont exposées pour chaque quinzaine.

Cycles de vie individuels des Macro-invertébrés aquatiques



Périodes de vulnérabilité de la biodiversité face aux fluctuations temporelles de pesticides



Représentation graphique du risque écologique (= ΣTU)

Figure 5 : Schéma du protocole de traitement des données de dynamiques écologiques. Il permet d'obtenir a) une représentation graphique de l'évolution du nombre d'espèces exposées au cours d'une année, puis b) les périodes de vulnérabilité de la biodiversité.

exposés aux contaminants lors de l'hibernation terrestre, et des migrations pré et post-nuptiales, car ils sont absents de la mare. Le nombre d'espèces exposées est ainsi obtenu pour chaque quinzaine.

Afin d'identifier les périodes de vulnérabilité de la biodiversité, le nombre d'espèces d'Amphibiens potentiellement exposés est sommé au nombre d'espèces ou taxons de Macro-invertébrés benthiques potentiellement exposés pour chaque quinzaine. L'évolution de l'exposition potentielle de cette biodiversité exposée au cours de l'année est représentée graphiquement via Excel (Figure 5).

5. Superposition du risque écologique et des périodes d'exposition

Afin de combiner les informations du risque écologique (section 2) et des périodes d'exposition de la biodiversité (section 4), nous proposons un indice de vulnérabilité de la biodiversité tel que :

$$\text{Indice de vulnérabilité} = RE \times \text{Nb sp. exposées}$$

Avec RE = Risque écologique (= Σ TU) et Nb sp. exposées = Nombre d'espèces ou taxons exposés aux contaminants d'origine agricole dans la mare (Figure 5).

6. Expérimentation pour l'étude de la vulnérabilité écologique au niveau des fonctions d'une espèce (Gammarus fossarum)

Afin d'appuyer expérimentalement les hypothèses émises quant à la sensibilité des organismes présents dans la mare face aux contaminants d'origine agricole (impacts), une expérience a été réalisée sur *Gammarus fossarum*, Crustacé Amphipode détritivore présent dans la mare et acteur clé de la dégradation de la litière, une fonction écosystémique capitale. Elle consiste en l'exposition de *G. fossarum* en mésocosmes dopés avec un cocktail de contaminants.

6.1. Prélèvement des organismes

Des gammares (*Gammarus fossarum*) sont prélevés dans le ru de Saint-Blandin dans la commune de Gérard – La-Celle-sur-Morin (Seine-et-Marne, 77) (Figure 6). La méthode du *kick sampling* (coups de pieds dans le lit pour retourner le sédiment et les blocs rocheux) est entreprise à l'aide de bottes en caoutchouc. Les gammares délogés sont récupérés à l'aide d'un filet puis triés grâce à des tamis de mailles décroissantes disposés en série. Les individus de $1 \pm 0,2$ cm sont sélectionnés et disposés dans une glacière remplie d'eau du ru. Les organismes non-cibles (autres espèces, gammares parasités) sont remis à l'eau (Figure 7).



Figure 6 : Ru de Saint-Blandin. a) aval, b) profil et c) amont (Seine-et-Marne, 77). Photographies Alexandre MICHEL

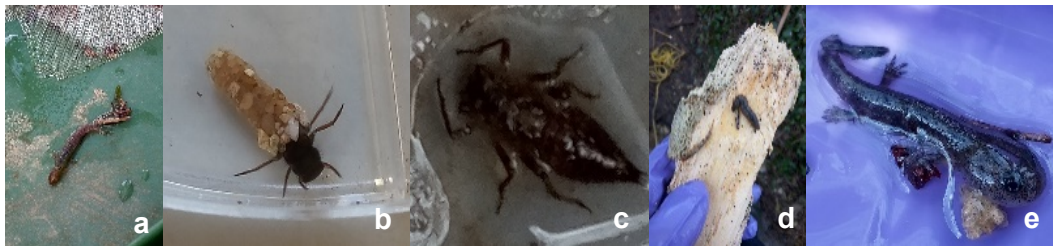


Figure 7 : Organismes non-cibles. (a) Larve de Coléoptère Dytiscidae. (b) Larve de Trichoptère Limnephilidae. (c) Larve d'Odonate Aeshnidae. (d) Larve de Diptère Tipulidae (en haut) et de Coléoptère Dytiscidae (en bas). (e) Larve de Salamandre tachetée (*Salamandra salamandra*). Photographies Alexandre MICHEL



Figure 8 : Armoire thermostatée. Photographie Alexandre MICHEL



Figure 9 : Bacs de gammarus femelles et mâles. Photographies Alexandre MICHEL

Le premier lot de gammares pour l'exposition en mésocosmes a été prélevé le 22 mars 2021 dès 9h15. Le pH, la température de l'eau et la conductivité étaient de 8,32 ; 5,5°C et 676 µS/min. Le deuxième lot est prélevé le 6 avril 2021 dès 9h15. Le pH, la température de l'eau et la conductivité étaient de 7,68 ; 3,5°C et 717 µS/cm.

6.2. Conditions de stockage et nourrissage

Les gammares sont stockés dans des boîtes en plastique (32 cm de long, 23 cm de large, 13 cm de hauteur) remplies d'eau du ru puis disposées dans une armoire thermostatée réglée à 10°C (Figure 8). Ils sont placés sous une lumière non directe (sur chaque étage de l'armoire, un calendrier en carton est placé entre les néons et les boîtes contenant les gammares) et selon un cycle d'éclairement 12h-12h pour mimer les conditions naturelles. Des pompes à oxygène Tetra™ assurent l'oxygénation de l'eau en permanence. Des feuilles d'aulne entières, comme sources d'alimentation, sont généreusement réparties dans chaque boîte de gammares. L'eau des contenants est changée une fois qu'elle devient trop chargée en matière organique.

6.3. Tri des mâles et des femelles

Les individus de sexes opposés doivent être triés pour être répartis correctement dans les milieux d'exposition. Les couples en amplexus sont récupérés et séparés à l'aide d'un filet en plastique pour constituer des lots de mâles et femelles. Mâles et femelles sont distingués grâce à leur position, le mâle est positionné dorsalement par rapport à la femelle. Les gnathopodes postérieurs très développés des mâles constituent un critère supplémentaire d'identification (Hume et *al.*, 2005). Les gammares en amplexus sont sélectionnés pour s'assurer que ces derniers soient susceptibles de s'accoupler (pour le paramètre reproduction). Ces contenants sont généreusement fournis en feuilles d'aulne (Figure 9) puis sont remis dans l'armoire thermostatée.

6.4. Préparation des feuilles

En guise de source d'alimentation pour les gammares encagés, des feuilles d'aulne (*Alnus sp.*) mortes ont été récupérées à l'automne 2020. Les feuilles sont réhydratées dans un seau en plastique rempli d'eau du robinet pendant une journée. Une fois réhydratées, elles sont lavées à la main, sous un filet d'eau de robinet et frottées à l'aide des doigts. Leur pétiole est retiré et jeté, car c'est une partie très ligneuse qui n'est pas consommée par les gammares. Une fois les feuilles lavées, elles sont mises à sécher sur du papier absorbant pendant au moins trois jours. Elles sont pesées une fois sèches. En moyenne, deux feuilles sont attribuées pour chaque condition d'exposition. À chaque fin d'exposition des gammares, les feuilles sont récupérées dans les milieux d'exposition, et sont mises à sécher au moins trois jours. Une fois sèches, elles sont à nouveau pesées.

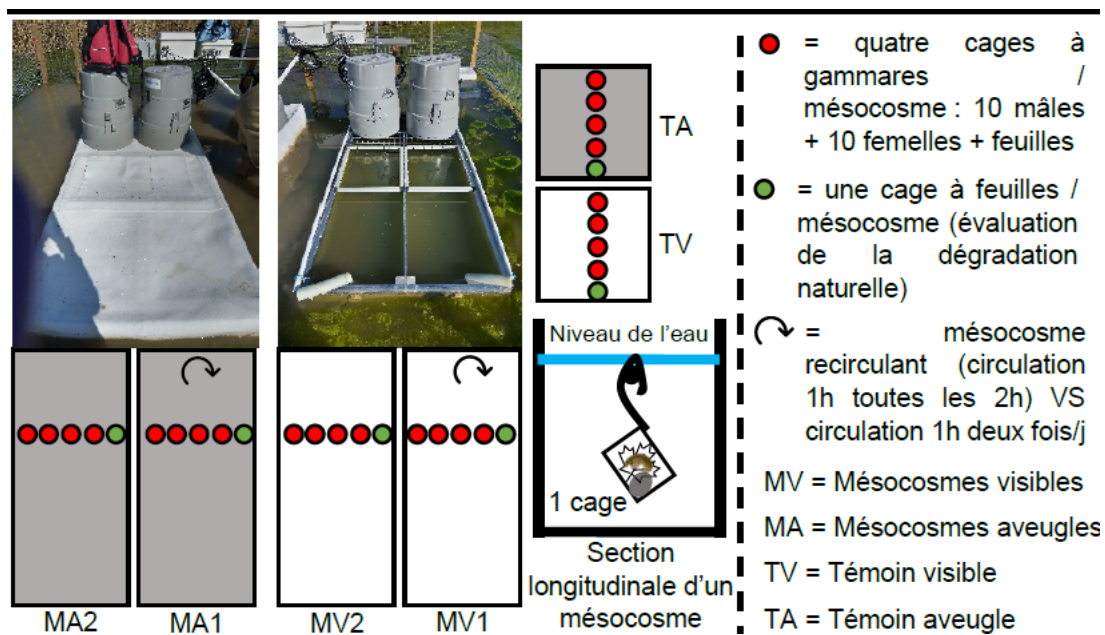


Figure 10 : Protocole de l'expérience mésocosmes.



Figure 11 : Mésocosmes aveugles (à gauche) et mésocosmes visibles (à droite). Les mésocosmes témoins sont en arrière-plan, derrière les mésocosmes visibles. Photographie Alexandre MICHEL



Figure 12 : Dopage des mésocosmes visibles avec le cocktail de contaminants. Photographie Alexandre MICHEL



Figure 13 : Une cage à gammarus. Photographie Alexandre MICHEL

6.5. Exposition des gammares à un cocktail de contaminants

Le schéma expérimental de l'expérience mésocosmes se base sur le schéma initial d'une expérience de mesure de l'évolution du niveau d'abattement d'un cocktail de contaminants en mésocosmes. Le schéma expérimental de l'expérience est présenté en Figure 10 et 11, seuls les mésocosmes témoins ont été rajoutés pour l'exposition gammare.

Six mésocosmes, contenants rectangulaires en PVC Glass, sont installés dans la zone tampon humide artificielle de la commune de Rampillon (Figures 10 et 11). Deux d'entre eux sont des mésocosmes témoin et sont deux fois plus petits que les mésocosmes dopés (car ne faisaient pas partie de l'installation initiale). Les quatre autres mésocosmes sont les mésocosmes dopés en contaminants et font 200 cm de long, 50 cm de large et 50 cm de hauteur pour 1m² de surface. Ils contiennent entre 300 et 350L d'eau de la mare. L'un des deux mésocosmes témoin est dit à modalité « aveugle » (recouverts par une couverture protectrice blanche géotextile de 6 mm d'épaisseur (Figures 10 et 11)), comme deux des quatre mésocosmes dopés. Ces modalités aveugles sont prévues initialement pour l'expérience de chimie environnementale et permettent d'estimer l'influence de la photolyse sur la dégradation des contaminants. Les quatre mésocosmes sont dopés le 26 mars 2021 avec un cocktail de contaminants d'origine agricole, contenu dans des bouteilles en plastique, composé de : 10 µg/L d'aclonifen, 10 µg/l de métolachlor, 10 µg/L de pendiméthaline (trois herbicides), 10 µg/L de boscalid, 10 µg/L d'époxyconazole, 10 µg/L de tébuconazole (trois fongicides), 10 µg/L de glyphosate, 10 µg/L de chloroluron, 10 µg/L de métazachlore et 15 mg/L de brome (utilisé en tant que traceur conservatif non réactif pour les suivis hydrométriques) (Figure 12).

Trente boîtes en plastique de 10 cm de hauteur et de 6 cm de diamètre ont été modifiées (Figure 13) : le couvercle et le fond sont découpés et remplacés par deux fragments de filet en plastique à mailles fines (1 mm), collés sur la boîte. Des crochets fabriqués à partir de fil de fer permettront de fixer les cages autour d'un axe métallique dans chaque mésocosme. Au total, trente cages sont disposées dans les six mésocosmes (5 cages X 6 mésocosmes). Par mésocosmes, quatre cages contiennent 20 gammares (10 mâles et 10 femelles) plus deux feuilles d'aulne (comme source de nourriture). La cinquième cage contient un lot de feuilles sans gammares et servira à l'évaluation de la dégradation naturelle des feuilles en mésocosme. Quatre séries de gammares sont exposées pendant le mois d'expérience. La première série de gammares est exposée du 25 mars au 1^{er} avril ; la seconde, du 1^{er} au 8 avril ; la troisième, du 8 au 15 avril et la dernière du 15 au 22 avril 2021. Les gammares sont exposés pendant sept jours.



Figure 14 : Bêchers pour l'expérience mésocosmes. *Photographie Alexandre MICHEL*

6.6. Mesures des paramètres biologiques

Pour évaluer l'impact de l'exposition des gammares en mésocosmes, j'ai mesuré les paramètres biologiques comportementaux, comme le nombre d'amplexus, la locomotion et le taux d'ingestion, puis non comportementaux (nombre de survivants), après 168h d'exposition pour les quatre séries d'encagement (autrement dit à J+7, J+14, J+21 et J+28 après le premier encagement et la première mise à l'eau de gammares). Les gammares de chaque cage sont disposés dans des béciers en plastique, sur une paillasse installée dans la mare pour la mesure des paramètres (Figure 14). Une fois que les nombre de survivants et d'amplexus sont comptés, la locomotion est mesurée, selon le protocole de Lebrun (2017). Pour cela, le nombre de passage de gammares est comptabilisé pendant deux minutes. Le passage d'un couple compte pour un passage car lors de l'amplexus, seul le mâle est responsable de la locomotion. Une fois les traits comportementaux mesurés, les gammares sont séchés à l'aide de papier absorbant puis sont répartis dans des tubes Falcon et placés à 0°C (glace) puis placés au congélateur le plus rapidement possible (fig. 20). Les tubes Falcon sont pesés vides (avant récupération des gammares) et pesés une fois les gammares recueillis et congelés. Après pesée des feuilles sèches avant consommation et après consommation, et la pesée des gammares, nous pouvons calculer le taux d'ingestion selon la formule suivante :

$$TI (= IR : \text{ingestion rate}) = \frac{\frac{\text{Biomasse sèche de feuille consommée}}{\text{Biomasse sèche de gammares}}}{\text{Nombre de jour d'exposition}}$$

(en mg de biomasse sèche de feuille / mg de biomasse sèche de gammares / jour)

6.7. Traitements statistiques

Les résultats de l'expérience mésocosmes sont traités à l'aide d'Excel et de R. Les résultats obtenus pour les réplicats pour chaque condition sont compilés sous forme de boxplots et le test U est appliqué (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney) pour analyser le niveau de différence sur les médianes de chaque condition.

Parallèlement, pour étudier les différents liens entre les paramètres étudiés et les variables explicatives, j'ai réalisé une analyse en composantes principales (ACP) sur les résultats obtenus pour les paramètres étudiés (survie, alimentation, locomotion, reproduction), et une autre ACP sur les variables explicatives (lumière, température de l'eau, pH, taux d'O₂, conductivité, taux de nitrates). J'ai également réalisé une analyse discriminante des redondances (RDA) sur les paramètres étudiés et les variables explicatives.

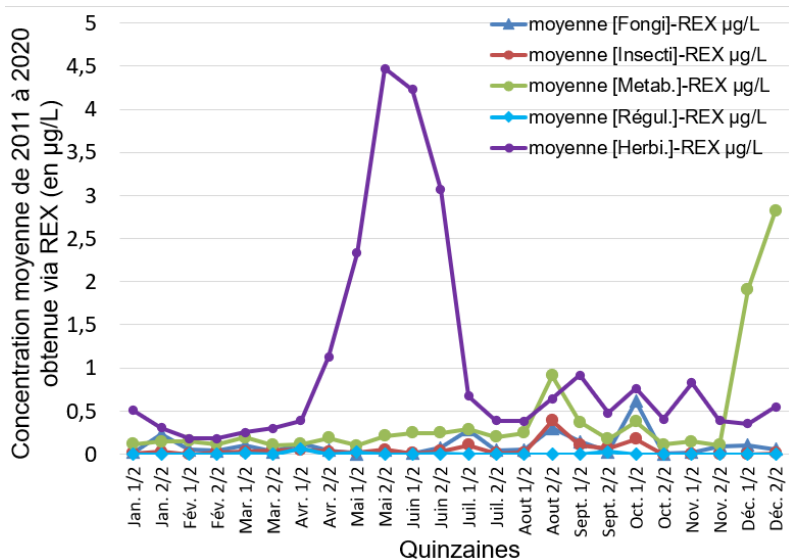


Figure 15 : Distribution de la concentration moyenne (moyenne de 2011 à 2020) (en µg/L) de chaque grande famille chimique pour chaque quinzaine sur une année

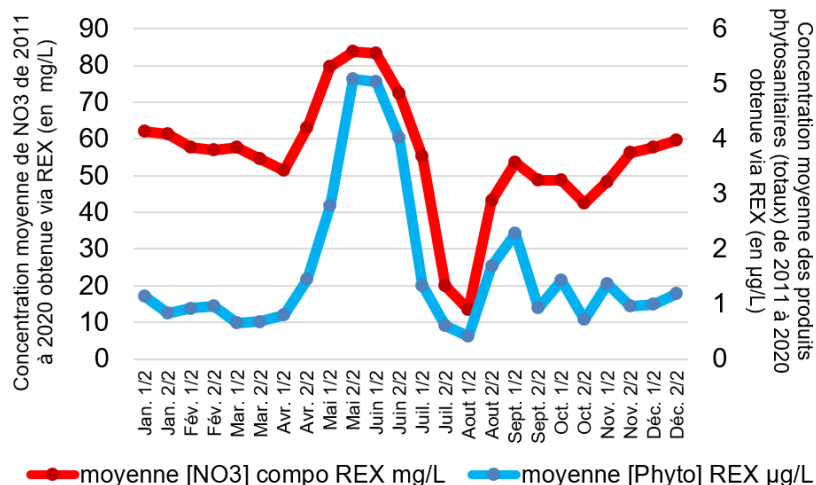


Figure 16 : Concentration moyenne (moyenne de 2011 à 2020) de NO3 (en mg/L) et des produits phytosanitaires totaux (en µg/L) pour chaque quinzaine sur une année

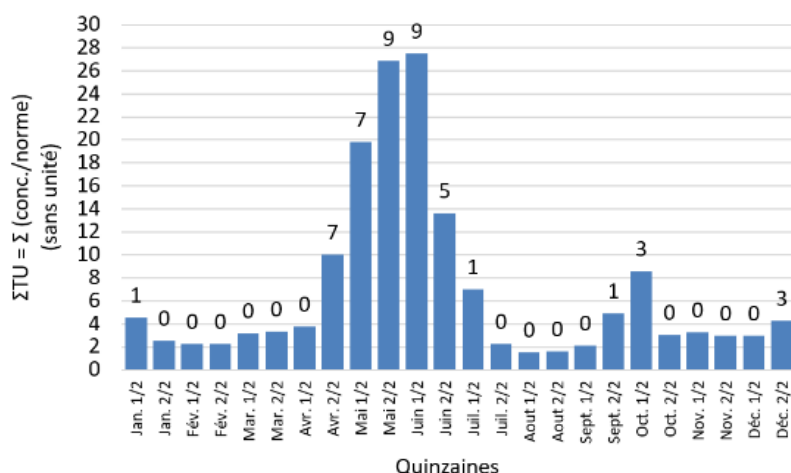


Figure 17 : Histogramme de la distribution de la somme des unités toxiques (ΣTU) (sans unité) basées sur les concentrations moyennes de toutes les molécules ciblées pour chaque quinzaine pour une année. Au-dessus de chaque barre de donnée : nombre de substance dépassant le seuil de 1.



Chironomidae (à gauche). *Asellus aquaticus* : Aselle (à droite). Planorbidae en bas à gauche.



Chironomidae (à gauche). *Asellus aquaticus* : Aselle (à droite)



Larve de coléoptère.



Gammarus sp. (Gammare).

Figure 18 : Les différents Macro-invertébrés benthiques recensés dans la ZTHA de Rampillon, en 2021. Photographies Alexandre MICHEL.

Résultats

1. Dynamiques chimiques et risque écologique

Les fongicides, les insecticides et les métabolites suivent les mêmes tendances de fluctuations temporelles au cours d'une année (Figure 15). Du mois de janvier jusqu'à la mi-août, leurs concentrations moyennes non cumulées ne dépassent pas les 0,5 µg/L. Leurs concentrations augmentent d'août à novembre avec des phases de diminution mais elles ne dépassent pas les 1 µg/L. Du mois de janvier jusqu'aux deux premières semaines d'avril, la concentration moyenne des herbicides suit les mêmes tendances que celles des autres substances. Un pic remarquable de la concentration moyenne en herbicide est observable dès la seconde moitié du mois d'avril avec un maximum absolu à 4,5 µg/L obtenu lors de la seconde moitié du mois de mai. La concentration moyenne en herbicides descend en dessous du seuil des 0,5 µg/L au cours de la seconde moitié du mois de juillet.

La distribution de la concentration moyenne en produits phytosanitaires totaux (PT) suit, approximativement, la tendance de celle des herbicides (Figure 16). De début janvier à mi-avril, la concentration des PT ne dépasse pas les 20 µg/L mais un pic est observé de la seconde moitié du mois d'avril à début juillet avec un maximum de 78 µg/L atteint au cours de la seconde moitié du mois de mai. La concentration PT est à son minimum lors de la première moitié d'août (7 µg/L). Les fluctuations temporelles de concentrations en nitrate (NO_3^-) suivent à peu près les mêmes tendances que celles des PT, avec un ordre de grandeur cependant différent (concentrations de nitrates en mg/L et pas en µg/L comme pour les PT). Un pic est observable dès la seconde moitié du mois d'avril avec un maximum à environ 83 mg/L en mai. Un minimum est atteint au mois d'août (environ 12 mg/L).

Le risque écologique (RE) (voir équation p. 8) se distribue de façon hétérogène au cours du temps (Figure 17). Deux pics de RE peuvent être observés : un pic de la seconde moitié du mois d'avril jusqu'à la première moitié du mois de juillet, avec un maximum de quasiment 28 lors de la seconde moitié de juin. Le second pic d'automne, lui, est localisé de la mi-septembre à la mi-octobre avec un pic la première moitié du mois d'octobre de 8.

2. Inventaires écologiques

2.1. Les Macro-invertébrés benthiques

D'après les observations de 2021 de la ZTHA (Figure 18), la macrofaune benthique est essentiellement représentée par des Crustacés d'eau douce tels que les Gammarus (Genre *Gammarus*) et les Aselles (Genre *Asellus*), des Diptères de la famille des Chironomidae, des Coléoptères Dytiscidae (Genre *Hydaticus*) et des Mollusques Lymnaea et Planorbidae.

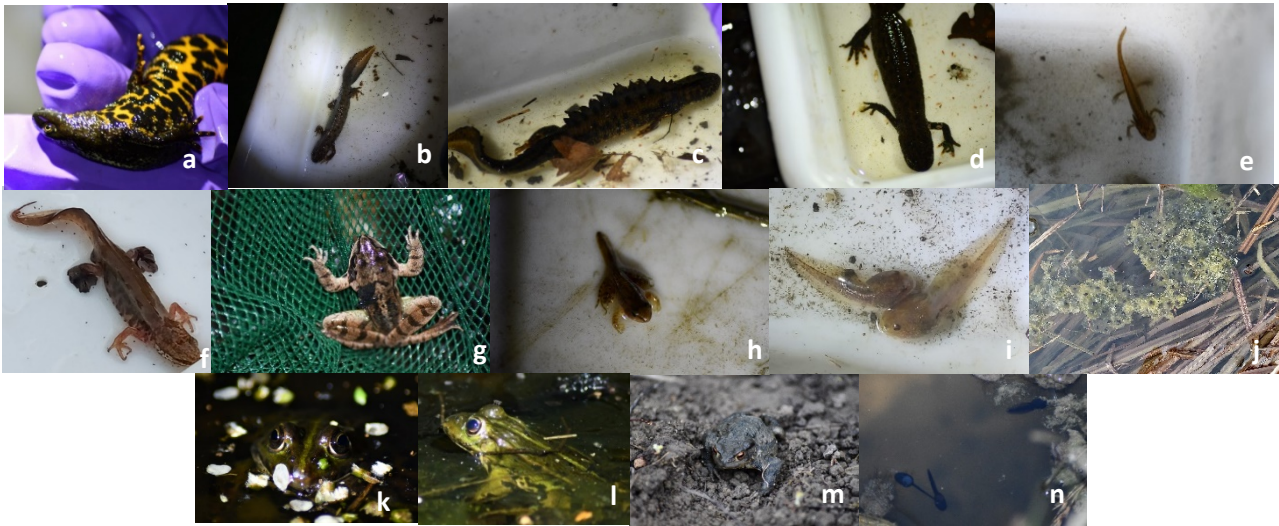


Figure 19 : Les espèces d'Amphibiens inventoriées durant les sorties nocturnes. (a, b, c) Triton crêté (*Triturus cristatus*). (d, e) Triton ponctué (*Lissotriton vulgaris*) (d) adulte, (e) larve. (f) Triton palmé (*Lissotriton helveticus*) (g, h, i, j) Grenouille agile (*Rana dalmatina*) (g) jeune adulte, (h) métamorphose, (i) têtards, (j) œufs. (k, l) Grenouille verte (*Pelophylax* sp.). (m, n) Crapaud commun (*Bufo bufo*), (m) adulte, (n) têtards. Photographies Alexandre MICHEL. (j) Photographie Cédric CHAUMONT.

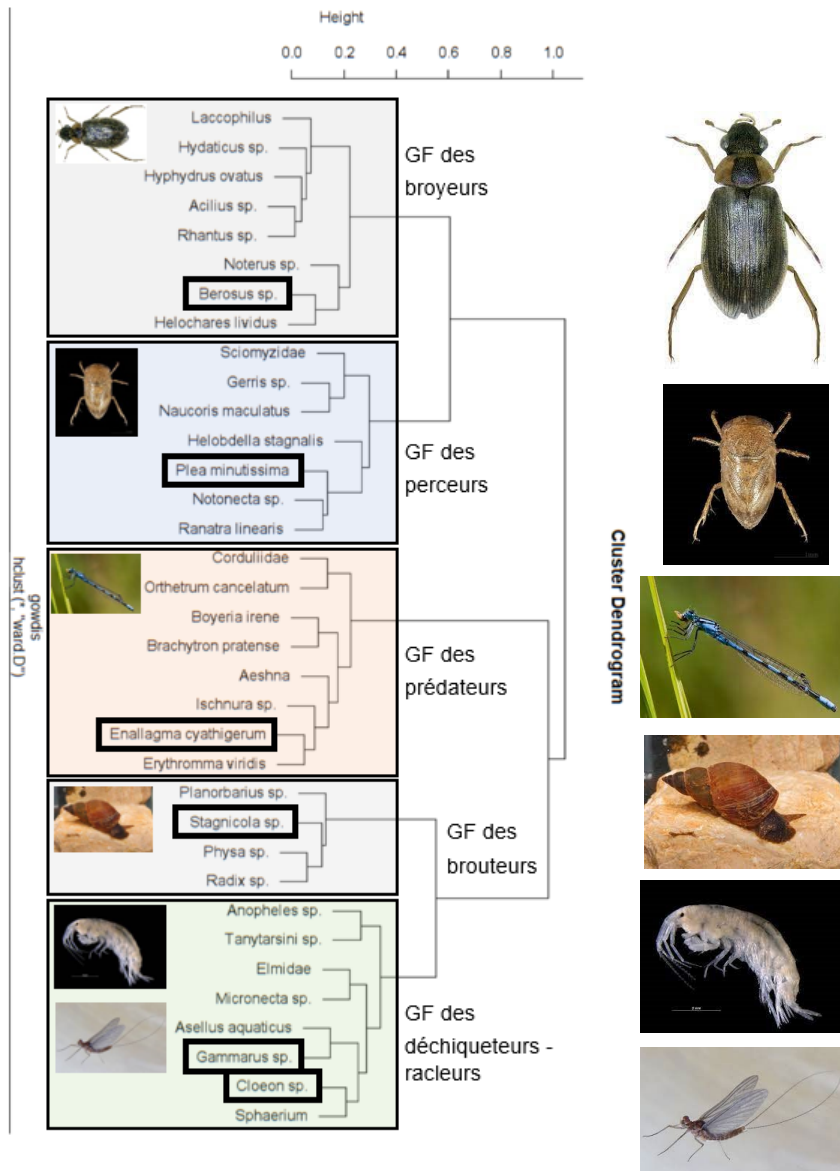


Figure 20 : Dendrogramme des groupes fonctionnels de Macro-invertébrés aquatiques. GF = Groupe fonctionnel. À droite, de haut en bas : *Berosus* sp., *Plea minutissima*, *Enallagma cyathigerum*, *Stagnicola* sp., *Gammarus* sp., *Cloeon* sp.

2.2. Les Amphibiens

Crapaud commun (*Bufo bufo*), Grenouille agile (*Rana dalmatina*), Grenouille rousse (*Rana temporaria*), Grenouille verte (*Pelophylax sp.*), Rainette arboricole (*Hyla arborea*), Triton palmé (*Lissotriton helveticus*), Triton ponctué (*Lissotriton vulgaris*) et Triton crêté (*Triturus cristatus*) sont observés ou détectés au cours des différentes sorties sur site en 2021 (Figure 19). Letournel faisait les mêmes observations en 2017 (Letournel, 2017).

3. Reconstruction des dynamiques écologiques et des périodes d'exposition

L'analyse de classification hiérarchique sur la base des traits fonctionnels de Macro-invertébrés a permis de mettre en évidence cinq groupes fonctionnels (GF) (Figure 20). Ces groupes fonctionnels représentent principalement des différences trophiques. Cinq taxons ont été retenus comme étant représentatifs de ces cinq groupes fonctionnels sur les plans biologique et écologique : *Enallagma cyathigerum*, *Stagnicola sp.*, *Cloeon sp.*, *Berosus sp.*, et *Plea minutissima*. Nous avons ajouté le gammare *Gammarus sp.* à cette sélection de façon à resituer notre modèle biologique expérimental dans l'approche générale d'écologie et les analyses des cycles de vie.

Les cycles de vie des organismes, reconstruits sur la base d'une quarantaine de références, et les phases de ces cycles pour les Amphibiens sont détaillés respectivement en Annexe I et en Annexe II.

Les six taxons de Macro-invertébrés sélectionnés pour l'étude, représentatifs des cinq groupes fonctionnels + le Gammare, étant présents dans l'eau toute l'année, leur phase d'exposition potentielle à la pression chimique de la mare s'étend sur toute l'année.

Pour les Amphibiens, sept périodes majeures ont été identifiées. De février à fin juillet, la reproduction, qui se déroule en milieu aquatique, est intense pour l'ensemble de la communauté (Figure 21 et Tableau 4). La période s'étendant du mois d'août jusqu'au mois de janvier est plus calme en termes de reproduction (quatre espèces au plus se reproduisent en même temps durant cette période). Du mois d'avril au mois de juillet, les pontes ont lieu. Les nombre d'espèces en phase de ponte et en phase d'embryon, têtard ou larve sont similaires, bien que la ponte soit un phénomène périodique quelle que soit l'espèce et que les phases de têtard soient observables plus longtemps dans l'année que les pontes. La phase d'exposition potentielle aux contaminants pour l'ensemble des Amphibiens s'étend ainsi du mois de février jusqu'au mois d'octobre (Figure 21 et Tableau 4). La phase d'hibernation aquatique s'étend du mois de septembre au mois de mai. La ponte se déroule à différents moments de l'année de janvier à décembre sauf au mois de novembre. Enfin, les stades larves / têtards et le phénomène de métamorphose s'observent tout au long de l'année. En effet, non seulement les larves de certaines espèces mettent

Tableau 4 : Phases d'exposition des Amphibiens et des Macro-invertébrés aux contaminants d'origine agricole dans la mare. Le nombre dans chaque case représente le nombre d'espèces réalisant cette phase pour une quinzaine donnée

Amphibiens	Hiver boréal		Printemps boréal			Été boréal			Automne boréal			Hiv. bo.											
	Janv.	Févr.	Mars	Avr.	Mai	Jun	Juil.	Août	Sept.	Octo.	Nov.	Déce.											
Hibernation aquatique	4	4	4	2	2	2	2	1															
Reproduction	2	7	8	10	10	10	10	9	9	8	8	4	4										
Ponte	1	1	3	3	3	8	9	10	9	8	8	7	7	3	3	3	2	2					
Larves / Têtards	3	3	3	4	4	5	8	8	8	8	9	9	8	7	7	7	4	4	3	3	3	3	
Métamorphose	1	1	1	1	1	2	3	5	6	7	9	9	8	8	9	9	7	7	6	4	4	1	1
Synthèse																							
Phase d'exposition amphibiens	5	6	9	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	8	8	8	8	7	7	7	5	5	
	Hiver boréal		Printemps boréal			Été boréal			Automne boréal			Hiv. bo.											
	Janv.	Févr.	Mars	Avr.	Mai	Jun	Juil.	Août	Sept.	Octo.	Nov.	Déce.											
	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15											
Phase d'exposition amphibiens	5	6	9	10	10	10	10	10	10	10	9	9	8	8	8	7	7	7	5	5			
Phase d'exposition invertébrés	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Phase d'exposition biodiversité	11	12	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	

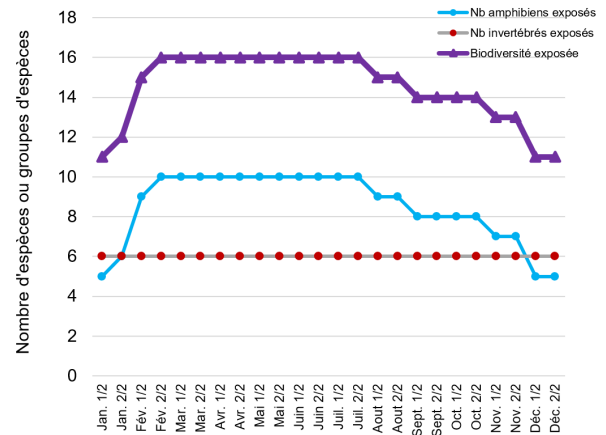


Figure 21 : Nombres d'espèces d'Amphibiens et groupes trophiques de Macro-invertébrés aquatiques exposées au cours d'une année

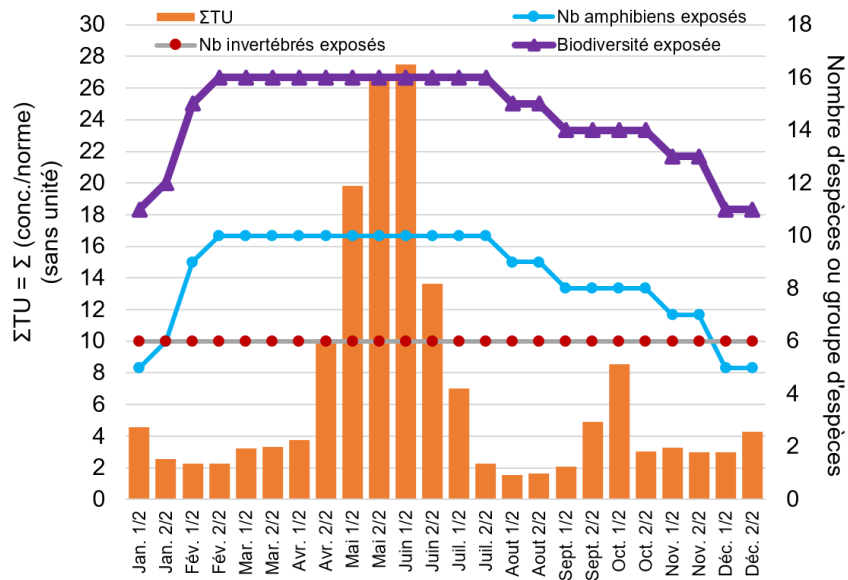


Figure 22 : Superposition du risque écologique (ΣTU) et du nombre d'espèces ou groupe d'espèces exposées aux contaminants dans la mare au cours d'une année

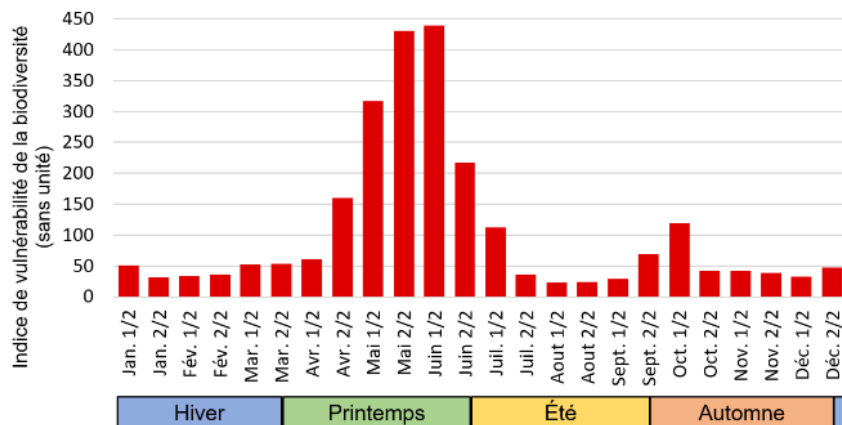


Figure 23 : Histogramme de la distribution de l'indice de vulnérabilité de la biodiversité de la mare terminale de la ZTHA de Rampillon face aux fluctuations temporelles de contaminants agricoles au cours d'une année.

plusieurs années à se métamorphoser mais aussi, certaines larves passent leur premier hiver dans la mare avant métamorphose. La phase d'exposition aux contaminants pour l'ensemble des Amphibiens s'étend donc du mois de février jusqu'au mois d'octobre. Par conséquent, de la seconde moitié du mois de février à la seconde moitié du mois de juillet, les dix espèces d'Amphibiens sont exposées (Figure 21).

En tout, en considérant l'ensemble des espèces d'Amphibiens et des taxons de Macro-invertébrés sélectionnés, le nombre de taxons potentiellement exposés diminue dès le mois d'août et atteint un minimum de cinq taxons exposés au mois de décembre. La distribution du nombre total de taxons exposés (Amphibiens et invertébrés) suit la dynamique de la distribution du nombre d'espèces d'Amphibiens exposées puisque cette dernière inclut un plus grand nombre de taxons et une plus forte variabilité que la sous-sélection de Macro-invertébrés. Cette dynamique observe un minimum de 11 taxons la première moitié de janvier, augmente et atteint son maximum (16) au cours de la mi-février jusqu'à fin juillet avant de diminuer (Tableau 4 et Figure 21).

4. Superposition du risque écologique et des périodes d'exposition

La superposition de la distribution du risque écologique au cours d'une année et de la distribution du nombre d'espèces potentiellement exposées aux contaminants d'origine agricole est représentée en Figure 22. Elle met en évidence deux pics simultanés, l'un étant un pic d'exposition de la biodiversité aux contaminants de la seconde moitié du mois d'avril jusqu'à la seconde moitié du mois de juin, l'autre étant un pic de risque écologique s'étendant aux mêmes périodes.

L'indice de vulnérabilité de la biodiversité face aux fluctuations temporelles de contaminants d'origine agricole dans la mare (voir équation page 11) (Figure 23) est variable au cours du temps. Il est inférieur, égal ou très sensiblement supérieur à 50 une grande partie de l'année, soit les deux tiers de l'année (tout l'hiver, au moins la seconde moitié de l'été et fin du début de l'automne à la fin de l'automne). Il augmente considérablement dès la seconde moitié du mois d'avril, pour atteindre un maximum la première moitié du mois de juin (pic à environ 445) avant de diminuer assez drastiquement (200) la seconde moitié de juin pour descendre en-dessous de 50 au cours de la seconde moitié du mois de juillet. Il augmente à nouveau (env. 60) et poursuit son augmentation la première moitié du mois d'octobre (env. 115) avant de redescendre en-dessous de 50 lors de la seconde moitié du même mois.

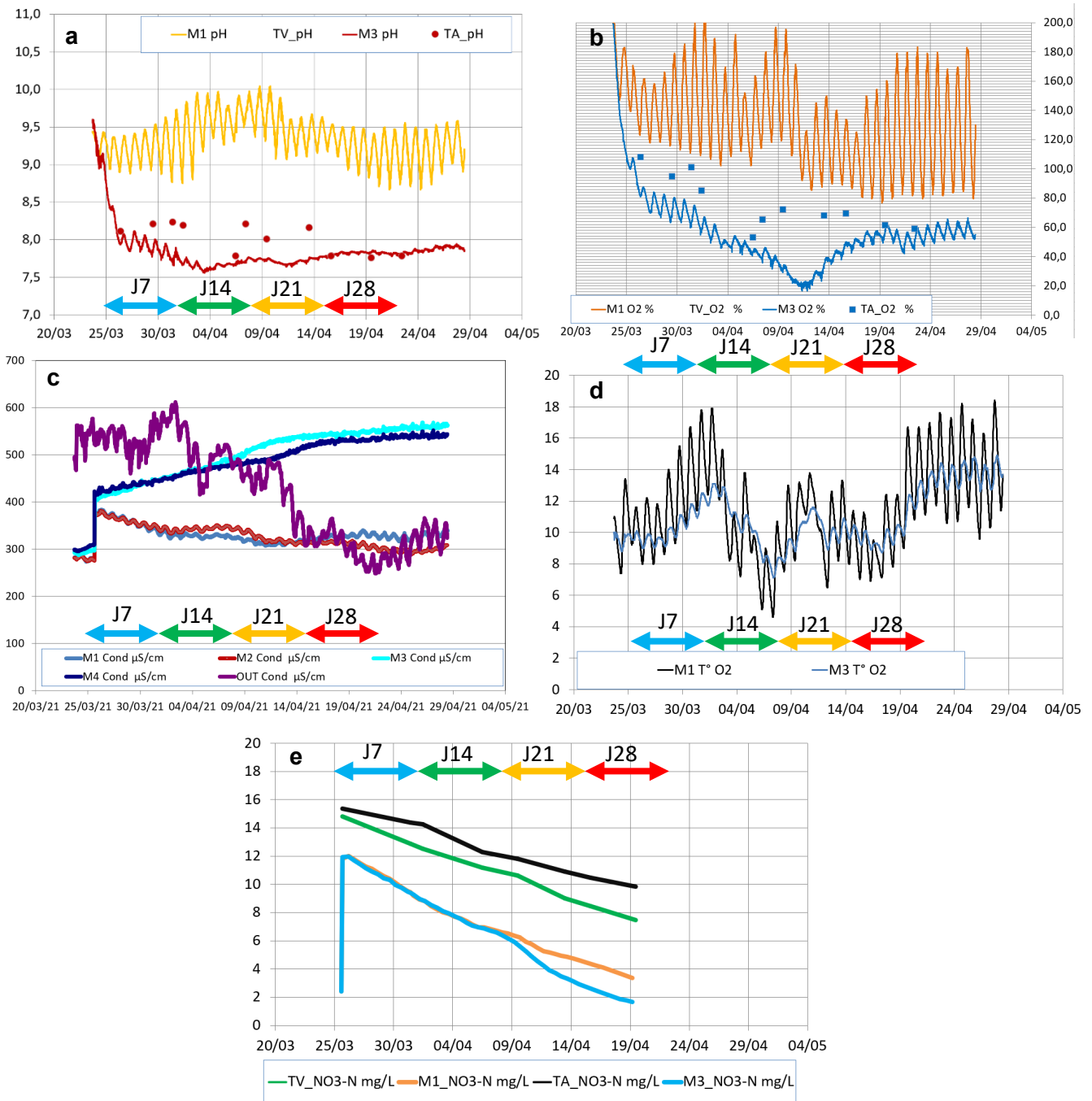


Figure 24 : Évolution des différentes conditions physico-chimiques au cours de l'expérience mésocosmes. J7 : 25 mars au 1^{er} avril ; J14 : 1^{er} avril au 8 avril ; J21 : 8 avril au 15 avril ; J28 : 15 avril au 22 avril. (a) Distribution du pH au cours du temps (sans unité). (b) Distribution du taux d'oxygène dissous au cours du temps (en %). (c) Distribution de la conductivité au cours du temps (en $\mu\text{S}/\text{cm}$). (d) Distribution de la température au cours du temps (en $^{\circ}\text{C}$). (e) Distribution de la concentration de $\text{NO}_3\text{-N}$ au cours du temps (en mg/L). TV : Témoin visible ; TA : Témoin aveugle ; M1 et M2 = MV : Mésocosmes visibles ; M3 et M4 = MA : Mésocosmes aveugles.

5. Sensibilité de *Gammarus fossarum* à un cocktail de contaminants

5.1. Conditions physico-chimiques

Le pH (Figure 24a), dans les mésocosmes visibles est relativement stable tout au long de l'expérience : il est compris entre 8,5 et environ 10. Dans les mésocosmes aveugles, il est de 8,7 au début de l'expérience (25 mars) et diminue progressivement jusqu'à la série J14. Entre les séries J7 et J28, sa valeur est comprise entre 7,5 et environ 8. Il varie ainsi moins que dans les mésocosmes visibles. Le taux d'oxygène dissous (%) (Figure 24b) dans les mésocosmes visibles est compris entre 80 et 200 % au cours de l'expérience. Il est compris entre 100 et 200 % de la série J7 jusqu'au début de la série J21 puis est compris entre 80 et 180 % au cours de la série J21 jusqu'à la fin de l'expérience. Dans les mésocosmes aveugles est compris entre 10 et 110 % au cours de l'expérience. Il est de 110 % au début de l'expérience puis diminue progressivement pour atteindre son minimum de 10 % en pleine série J21. Il augmente progressivement au cours du temps et atteint environ les 60 % au cours de la dernière série d'exposition J28. La conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (Figure 24c) dans les mésocosmes visibles augmente brutalement au tout début de l'expérience et passe de 290 à 390 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en un temps très limité (de l'ordre de quelques secondes probablement car provient du dopage des mésocosmes avec le cocktail). Elle diminue progressivement tout au long de l'expérience et est comprise entre 300 et 390 $\mu\text{S}/\text{cm}$ de J7 à J28. Dans les mésocosmes aveugles à J7, la conductivité passe de 300 à 410 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en un temps très limité (quelques secondes). Elle augmente de manière linéaire tout au long de l'expérience pour atteindre son maximum (550 $\mu\text{S}/\text{cm}$) à la fin de J28. La conductivité dans la mare, elle, est comprise entre 500 et 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$ entre J7 et J14, puis diminue pour atteindre environ 250 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à la fin de l'expérience. La température ($^{\circ}\text{C}$) (Figure 24d) évolue de manière bien spécifique au cours de chaque série d'exposition : elle augmente (dans les mésocosmes aveugles comme dans les visibles) au cours de J7, diminue au cours de J14, augmente dès J21 puis subit une chute radicale vers la fin de cette série puis est assez stable au cours de J28 et semble augmenter à nouveau au cours de cette série. La variation de température dans les mésocosmes visibles est plus importante que celle dans les mésocosmes aveugles. La concentration de $\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/L) (Figure 24e) évolue de manière continue au cours du temps. Dans les mésocosmes aveugles et visibles elle subit une augmentation brutale au début de J7 (passe de 2 à 12 mg/L en un temps limité). Puis elle diminue de manière continue dans les mésocosmes témoins et non témoins au cours du temps. Dans les témoins, elle diminue de 15 à 9 mg/L en moyenne du début de l'expérience à la fin. Dans les mésocosmes non-témoins, son niveau de concentration est moins élevé mais évolue de la même manière, elle diminue de 12 à 3 mg/L en moyenne de J7 à J28.

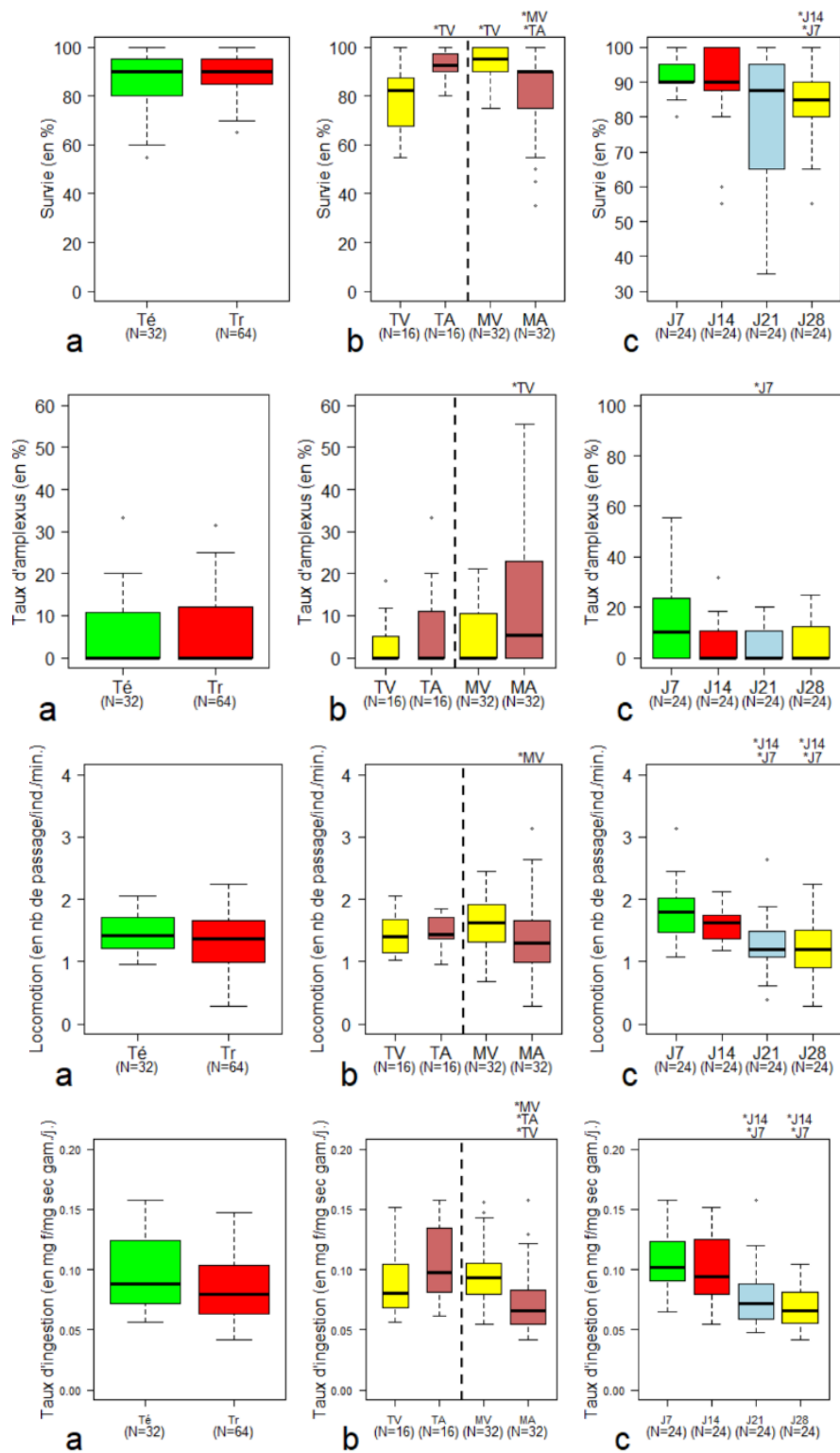


Figure 25 : Boxplots des réponses des gammarus selon les différentes conditions d'exposition en mésocosmes. Chaque boxplot présente, en ordonnées, la valeur du paramètre mesuré, en abscisses les différentes conditions d'exposition. 1^{ère} série de graphiques : survie (en %) ; 2^{ème} série de graphiques : taux d'amplexus (en %) ; 3^{ème} série de graphiques : niveau de locomotion (en nombre moyen de passage / individu / minute). 4^{ème} série de graphiques : taux d'ingestion (en milligramme de feuilles consommées / milligramme de biomasse sèche de gammarus / jour). La première colonne de boxplots (a) correspond à la comparaison entre le pool des témoins (Té) et le pool des traitements (Tr). La seconde colonne (b) correspond à la comparaison entre le témoin visible (TV), le témoin aveugle (TA), les mésocosmes visibles (MV), les mésocosmes aveugles (MA). La troisième colonne (c) correspond à la comparaison entre les différentes séries d'exposition (série J7, J14, J21 et J28). Le nombre de réplicats est indiqué sous chaque condition (N = x). * indique une différence significative entre deux résultats. Test U (Wilcoxon-Mann-Whitney). $p \leq 0,05$. R / R Studio.

5.2. Réponses biologiques

Concernant le taux de survie (Figure 25), aucune différence significative n'est observée entre les conditions témoins réunies (90 %) et les conditions traitement réunies (90 %). Cependant, la médiane du témoin aveugle (TA) et celle des mésocosmes visibles (MV) sont significativement plus élevées (env. 95 %) que celles du témoin visible (TV) (légèrement plus de 80 %) et des mésocosmes aveugles (MA) (90 %). Une tendance à la diminution du taux de survie au cours du temps est observée avec une différence significative entre J7 (médiane à 90 %) et J28 (env. 85 %) et entre J14 (env. 90 %) et J28.

Les médianes du taux d'amplexus (Figure 25) pour les conditions témoins (0 %) et les conditions traitements (0 %) ne sont pas significativement différentes. TV, TA et MV observent les mêmes tendances (médianes à 0 %) et MA (médiane à 5%) est significativement plus élevée que TV. Seul le temps J21 (0 %) observe une différence significative avec J7 (médiane à 10 %).

Aucune différence significative n'est observable entre les niveaux de locomotion (Figure 25) des témoins et des traitements (env. 1,5 p/i/m). Les médianes de TV, TA et MV sont sensiblement similaires (de l'ordre d'1,5 p/i/m); MV (env. 1,7 p/i/m) est significativement plus élevé que MA (env. 1,3 p/i/m). Une tendance à la diminution du niveau de locomotion est observée au cours du temps avec des médianes significativement plus basses pour J21 (env. 1,3 p/i/m) et J28 (1,2 p/i/m) comparées à celles de J7 (1,8 p/i/m) et J14 (1,6 p/i/m).

Pour le taux d'ingestion (Figure 25), aucune différence significative n'est à signaler entre la médianes des témoins (env. 0,08 mg f./mg gs/j.) et la médiane des traitements (env. 0,075 mg f./mg gs/j.). TV (env. 0,075 mg f./mg gs/j.), TA (légèrement en dessous de 0,10 mg f./mg gs/j.) et MV (env. 0,09 mg f./mg gs/j.) ne sont pas significativement différents. Cependant, la médiane du taux d'ingestion de MA est significativement plus basse (env. 0,06 mg f./mg gs/j.) que celles des trois autres conditions. Est observable une tendance à la diminution du taux d'ingestion au cours du temps. J7 et J14 ne sont pas significativement différents (médianes respectives de 0,10 et 0,09 mg f./mg gs/j.) et J21 (et 28, entre eux, ne sont pas non plus significativement différents (médianes d'environ 0,07 mg f./mg gs/j.). Mais J21 et J28 sont significativement plus bas que J7 et J14.

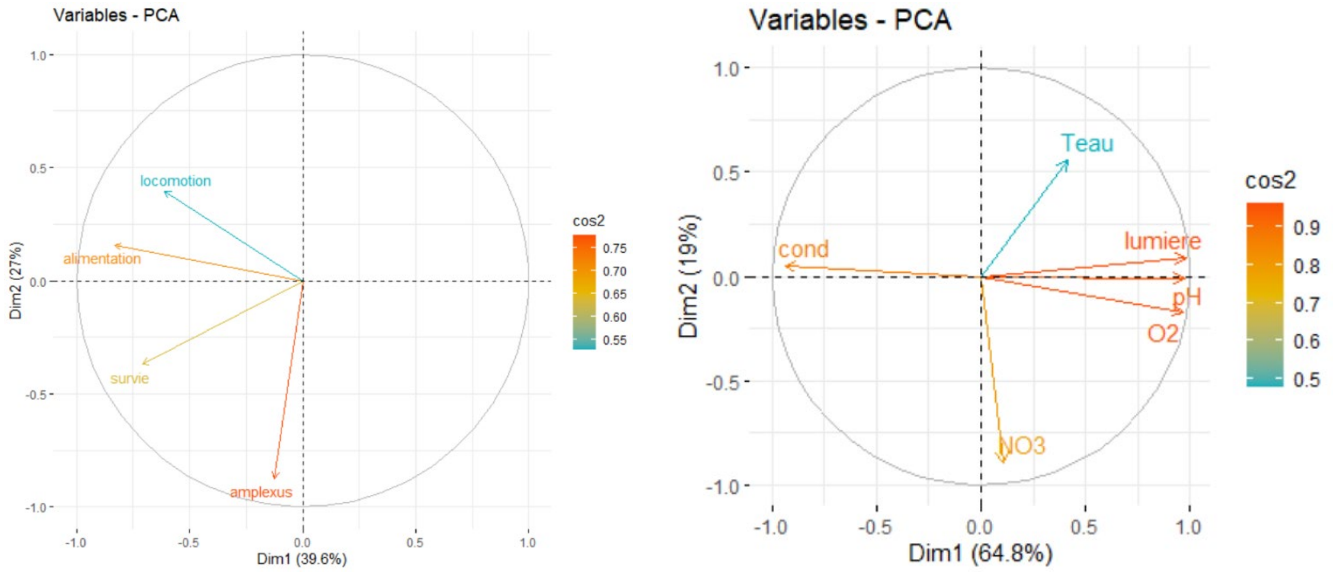


Figure 26 : Analyses en composantes principales (ACP) des résultats de l'expérience mésocosmes. La première ACP (à gauche) est effectuée sur les fonctions étudiées (survie, reproduction, locomotion, alimentation). La seconde ACP (à droite) est effectuée sur les variables explicatives (température de l'eau (Teau), lumière, pH, taux de dioxygène dans l'eau (O2), pourcentage de nitrates (NO3), conductivité (cond)). Cos2 = cosinus carré des variables : il représente la qualité de la représentation des variables sur le graphique de l'ACP. Il est calculé comme étant les coordonnées au carré.

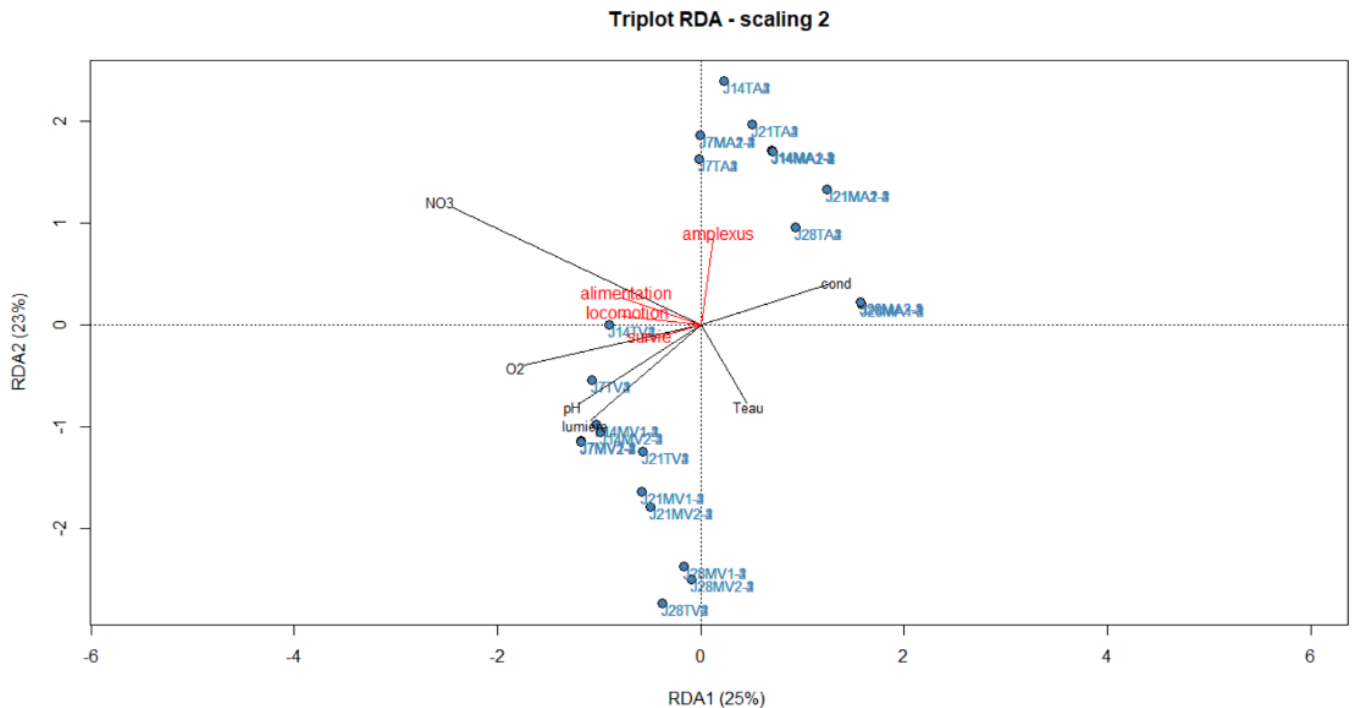


Figure 27 : Analyse discriminante des redondances (RDA) des résultats de l'expérience mésocosmes. Vecteurs rouges = fonctions étudiées (survie, reproduction, locomotion, alimentation). Vecteurs noirs = variables explicatives (température de l'eau (Teau), lumière, pH, taux de dioxygène dans l'eau (O2), pourcentage de nitrates (NO3), conductivité (cond)). Points bleus = conditions (témoins, mésocosmes aveugles, mésocosmes visibles).

5.3. Analyses multivariées

L'analyse en composantes principales sur les fonctions biologiques étudiées (Figure 26) montre que la dimension 1 explique 39,6 % de la variabilité des données et la dimension 2, 27 %, soit au total 67 % de la variabilité expliquée. La qualité de représentation des variables (\cos^2) « amplexus » et « alimentation » est relativement élevée (au moins 0,7). La locomotion et l'alimentation semblent positivement corrélées entre elles, cependant, le niveau de représentativité de la locomotion par l'analyse est relativement faible.

Les variables NO₃, lumière, conductivité, pH et O₂ sont très bien représentées par l'ACP ($\cos^2 > 0,7$) (Figure 26). La lumière, le pH et le taux d'oxygène sont des variables explicatives très corrélées entre elles et sont, par ailleurs, très bien représentées par la dimension 1 (qui explique 64,8 % de la variabilité des données), tout comme la conductivité. La conductivité est fortement anti-corrélée aux trois variables explicatives précédentes. Le pourcentage de NO₃, lui, est représenté en grande partie par la dimension 2 (dimension 2 qui explique 19 % de la variabilité des données). Mais, comme la température de l'eau, la variable NO₃ semblent indépendantes des autres variables.

Le premier axe de l'analyse de redondance (Figure 27) explique 25 % de la variabilité des données, et le second, 23 %. Cette analyse met en évidence qu'outre les effets avérés du traitement (section 4.2.2.), le taux d'alimentation potentiellement influencé par les nitrates et le taux d'amplexus est modérément expliqué par les paramètres lumière et température de l'eau.



Discussion

1. Dynamiques chimiques et risque écologique

Les concentrations moyennes en herbicides au cours de l'année sont prépondérantes par rapport aux autres familles chimiques (fongicides, insecticides, régulateurs et métabolites) avec un pic au printemps de 4,5 µg/L, contre des concentrations en fongicides, insecticides, régulateurs et métabolites qui ne dépassent pas les 0,5 µg/L. Selon le rapport de l'état des lieux du bassin de l'agence de l'eau Seine-Normandie de 2019 (Agence de l'eau Seine-Normandie, 2019) 61 % des stations étudiées (1.151 stations étudiées au total) présentent une somme de concentrations en pesticides (moyenne annuelle) comprise entre 0,2 et 1,9 µg/L et les 10 % des stations dont les moyennes annuelles des sommes de concentrations sont les plus fortes sont celles dépassant 3,45 µg/L. Bien qu'ils s'agissent ici de cours d'eau, ces chiffres mettent en lumière l'importante pression chimique régnant dans la ZTHA de Rampillon, notamment au printemps avec l'atteinte d'une concentration maximum (moyenne annuelle) de 4,5 µg/L, en prenant en compte seulement les herbicides. Quant à la contribution de chaque famille chimique dans la pression chimique de la zone, cela correspond plutôt bien aux données établies par ce même rapport. Ce sont effectivement les herbicides (ou métabolites d'herbicides) qui contribuent le plus aux sommes des concentrations en pesticides dans les cours d'eau. Par ailleurs, le métolachlore (herbicide) est une substance retrouvée dans la ZTHA, avec une moyenne, entre 2011 et 2019, de 0,53 µg/L alors qu'elle est interdite depuis 2003. L'AESN indique dans son état des lieux que le métolachlore et l'atrazine, par exemple, sont retrouvés dans 30 % des prélèvements malgré leur interdiction depuis plus de 10 ans et souligne donc que la persistance de certains composés peut continuer à contaminer les milieux aquatiques même après leur interdiction (AESN, 2019).

Concernant le risque écologique, calculé en effectuant la somme des TU de toutes les substances, nous avons mis en évidence l'importance de ce risque (> 1 toute l'année et > 10 au printemps). En comparaison, Hela et coll. (2004) ont évalué le risque écologique pesant sur un lac grec (lac Pamvotis) lié à une contamination en pesticides. Le risque écologique qu'ils déterminent entre mai 1998 et mars 1999 ne dépasse jamais le seuil de 1 (Hela et al., 2005). Cette comparaison montre que la ZTHA est bien une zone à haut risque, risque lié à sa fonction de stockage de contaminants d'origine agricole. Cependant, l'interprétation de la comparaison précédente est à moduler car ces deux sites (le lac et la ZTHA) sont des environnements très différents, en termes de surface (22 km² pour le lac, 0,0057 km² pour la ZTHA), en termes de voies de contamination etc.



Une première limite à la démarche entreprise pour la production des dynamiques synthétiques de pesticides vient du lissage des données s'appuyant sur l'hypothèse que la concentration moyenne en une substance ou famille de substances chimiques, mesurée pour une période donnée, est répartie de manière uniforme tous les jours délimités par cette période.

D'autre part, les valeurs seuils environnementales ne sont pas disponibles pour toutes les substances. Les substances ne disposant pas de telles données se sont vu attribuer une valeur seuil de 0,1 µg/L (soit la moitié des substances ciblées) (senat.fr, 2021). Cette attribution par défaut constitue un biais dans la démarche, la valeur seuil de 0,1 µg/L ne rend pas compte de la véritable valeur seuil de la substance. Ce seuil constitue une extrapolation conservatrice pour les substances dont la valeur seuil environnementale hypothétique et non déterminée par la recherche, est supérieure à 1 µg/L, mais l'effet conservatif est inversé lorsqu'il s'agit de substances dont la valeur seuil environnementale (hypothétique et non déterminée par la recherche) est inférieure à 1 µg/L.

L'évaluation du risque écologique relatif prévoit que si la somme des unités toxiques d'un ensemble de substances présentes dans un environnement est supérieure à 1, alors le risque écologique lié à la pression chimique est très élevé, en considérant que le cocktail complet de molécules est synergique (Sanchez-Bayo et *al.*, 2002). L'hypothèse d'un cocktail de substances ayant des effets synergiques permet d'augmenter le niveau de protection de l'analyse. Cependant, ceci ne correspond probablement pas à la réalité puisque des effets synergiques, neutres et antagonistes peuvent caractériser le cocktail.

2. Inventaires et dynamiques écologiques

Les inventaires de Letournel (2017) ont été particulièrement utiles pour identifier les taxons de Macro-invertébrés à étudier pour notre problématique. La limite principale de l'utilisation de ceux-ci vient du fait que ces inventaires ponctuels ne sont probablement pas exhaustifs. En effet, il est possible que des taxons n'aient pas été pris en compte au moment de l'état des lieux de la biodiversité. Ceci peut avoir eu un impact sur la pertinence des traitements de données relatifs au choix des invertébrés pour la construction des cycles de vie. Pour consolider ces recensements, il serait intéressant de poursuivre les inventaires faunistiques plusieurs fois par an et également de couvrir toutes les saisons pour gagner en exhaustivité.

Les dynamiques écologiques (cycles de vie) suivent des schémas complexes et dépendent d'un grand nombre de facteurs environnementaux, en plus de dépendre de la dynamique des populations. La phénologie se propose d'étudier l'influence des facteurs climatiques sur les rythmes biologiques des organismes. Par exemple, chez le crapaud



commun (*Bufo bufo*), lorsque la ponte est précoce, la durée du stade têtard est plus grande que lorsque la ponte est plus tardive due aux températures moins favorables avant et au début du printemps (Reading, 2010). Ainsi, l'établissement des cycles de vie a permis d'obtenir les grandes tendances des dynamiques temporelles des Amphibiens et des Macro-invertébrés ciblés mais ne retranscrit pas les dynamiques exactes des organismes vivant spécifiquement dans ou aux abords de la mare. Les phases d'exposition définies peuvent donc varier d'au moins une quinzaine de jours. Ce décalage constitue donc un biais potentiel pour l'étape de superposition des dynamiques écologiques et chimiques.

3. Superposition du risque écologique et des périodes d'exposition

Nous avons montré que le risque écologique et le nombre de taxons potentiellement exposés montraient des dynamiques relativement synchrones ; nous avons observé que le nombre d'espèce exposées est le plus grand justement à la période où le risque écologique est le plus important (maximum de 16 unités taxonomiques exposées et Σ TU maximum de 27,8 au cours de la première moitié de juin). Ce résultat central de notre étude montre à quelle période de l'année la biodiversité est potentiellement la plus vulnérable, à savoir de la seconde moitié du mois d'avril à la première moitié du mois de juillet. Ceci nous interroge quant au risque lié au stockage de contaminants par les ZTHA pour la biodiversité et leur rôle dans le maintien de la biodiversité (Letournel et al., 2021). Ce résultat est également un appel à approfondir les recherches sur les relations entre ces dynamiques et à tester ces relations de façon directe.

La littérature donne un bon aperçu des possibles effets d'une pression chimique sur les organismes vivants (voir introduction). Cependant, les organismes exposés à une pression chimique n'y sont pas forcément sensibles.

Concernant les Amphibiens, la période de l'année où le plus grand nombre d'espèces est exposé est le printemps. C'est, en effet, au cours de cette saison que les conditions environnementales (niveau d'eau, température, végétation) sont les plus favorables pour l'activité de reproduction des Amphibiens.

Ainsi, tous les stades de vie des organismes Amphibiens sont exposés d'une manière ou d'une autre aux contaminants d'origine agricole, mais ne sont pas égaux quant à la toxico-résistance face à ces contaminants. La sensibilité des œufs et des embryons est faible. Les œufs sont protégés des perturbations mécaniques et chimiques grâce leur enveloppe gélatineuse formée de plusieurs couches de mucoprotéines et mucopolysaccharides (Viarengo et Falcone, 1977 ; Ward et Sexton, 1981 ; Marquis et al., 2006). Celle des larves nouvellement écloses, possédant encore des branchies externes chez les Anoures, est forte, de même que celle des larves matures, des têtards et des



individus en pleine métamorphose. Ces trois stades sont particulièrement sensibles au niveau endocrinien et il a été montré que les pesticides pouvaient agir en tant que perturbateurs endocriniens (Hayes et *al.*, 2006). Enfin, la toxico-sensibilité des individus aux stades juvéniles et adultes est encore mal connue, mais les juvéniles seraient plus sensibles que les adultes. Les impacts des contaminants sur les stades terrestres sont réels.

Par ailleurs, les Macro-invertébrés benthiques ne présentent pas la même sensibilité aux contaminants. On peut se demander si les Macro-invertébrés qui présentent des formes de résistance (par exemple, *Plea minutissima*) sont moins sensibles que ceux n'en présentant pas. Enfin, les variables spatiales des communautés jouent un rôle important sur l'impact des pressions chimiques sur les Macro-invertébrés benthiques et dépend de leurs traits d'histoire de vie (Trekels et *al.*, 2011).

L'interprétation de la superposition des dynamiques chimiques et écologiques est donc à moduler par ces considérations, sachant que la sensibilité des organismes ciblés n'est pas précisée dans le travail. Puis, les résultats obtenus au cours de ces travaux ne prennent pas en compte toutes les autres modalités de contamination des Amphibiens ou des Macro-invertébrés (contamination dans le milieu terrestre, bioaccumulation).

Pour aller plus loin dans la réflexion, il serait intéressant aussi d'intégrer et d'exploiter l'indice SPEAR (Species at risk) qui permet de mieux comprendre et mieux déterminer le niveau de vulnérabilité des Macro-invertébrés aquatiques face aux pesticides en prenant en considération leur sensibilité écotoxicologique (Liess et *al.*, 2021 ; Hunt et *al.*, 2017).

Selon l'EFSA, le Triton crêté (*Triturus cristatus*) et la Rainette verte (*Hyla arborea*) seraient deux espèces sentinelles étudiées pour l'évaluation du risque des Amphibiens face aux pesticides (EFSA, 2017). Il pourrait être envisagé de recourir à l'utilisation de biomarqueurs enzymatiques d'effet et d'exposition chez ces espèces, ce qui nécessiterait la récupération de salive par écouvillonnage buccal par exemple, comme ont pu le faire Mingo et *al.* sur le Lézard des murailles (*Podarcis muralis*) (Mingo et *al.*, 2017).

Pour être plus réaliste et plus exhaustif dans ces travaux de recherche, il faudrait intégrer ces paramètres de sensibilité dans l'évaluation du risque et cibler les périodes critiques de la biodiversité, c'est-à-dire le printemps.

4. Sensibilité de *Gammarus fossarum* à un cocktail de contaminants

Dans les mésocosmes aveugles traités (mésocosmes aveugle 1 et 2), la membrane protectrice de géotextile, initialement prévue pour l'expérience de chimie environnementale, bloque une grande partie de la lumière fournie par le soleil. D'où, d'une part, un taux de dioxygène dissous moins important que dans les mésocosmes visibles, et d'autre part, des



variations du taux d'O₂ bien moins importantes que dans les mésocosmes visibles. Le taux d'O₂ dissous diminue au cours du temps (diminution d'environ 50 % pour chaque semaine avant une chute remarquable à J+21) dans les mésocosmes aveugles due à la consommation de cette molécule par la microbiocénose et à cause de la faible luminosité empêchant le renouvellement d'oxygène dissous par l'intermédiaire des espèces photosynthétiques. Cependant, la structure des mésocosmes permet la pénétration d'un minimum de lumière dans les mésocosmes, permettant le renouvellement non négligeable d'O₂. En effet, le taux d'O₂ dissous dans l'eau des mésocosmes à modalité aveugle a fortement chuté durant l'exposition de la troisième série de gammares (J21) à cause de conditions météorologiques non favorables à la production de photosynthèse, source d'O₂. Cette chute en dioxygène est, d'ailleurs, probablement responsable du taux de survie des gammares relativement bas à J21, d'une part, et de l'influence sur les résultats sur les autres paramètres comportementaux pour les modalités aveugle d'autre part. Mais, dès le retour des beaux jours, la concentration en O₂ dissous a augmentée de nouveau dans les modalités aveugles, expliquant probablement le taux de survie supérieur observé à J28 comparé au taux observé à J21. *G. fossarum* a besoin d'un taux d'oxygène dissous supérieur à 50 % (5,3 mg/L d'oxygène à 15°C) pour sa survie et pour son activité rhéotaxique (maintien dans le courant) (Gerhardt et al., 2020). Ce taux est effectivement inférieur dans les mésocosmes aveugles lors des séries J14 et J21 (le taux d'O₂ reste supérieur à cette limite dans le témoin aveugle).

Les résultats de l'ACP et de la RDA montrent, d'ailleurs que, les variables explicatives sont fortement liées entre elles, notamment la lumière, la teneur en O₂ dissous, le pH et la conductivité. Cependant, ces mêmes analyses ne montrent pas de liens forts entre les fonctions étudiées. Selon les analyses, le taux d'O₂ serait un facteur décisif sur la survie des organismes, et la lumière pourrait éventuellement avoir un impact négatif sur leur taux d'amplexus et expliquerait les taux d'amplexus plus bas dans les modalités visibles. Dans les mésocosmes visibles (témoin visible, mésocosmes visibles 1 et 2), la température de l'eau subit de plus grandes amplitudes thermiques que les mésocosmes aveugles. La membrane de géotextile qui recouvre les mésocosmes à modalité aveugle agit comme un filtre isolant empêchant de trop grandes augmentations de température le jour et de trop grandes déperditions de chaleur la nuit, tandis que, les mésocosmes à modalité visible, eux, ne sont pas isolés par ce dispositif et sont soumis directement aux échanges de chaleur entre l'eau et l'air ambiant. Étant moins isolé, la température de l'eau des mésocosmes à modalité visible est plus importante la journée.



Le plus faible taux d'ingestion que nous observons dans les mésocosmes aveugles par rapport au témoin aveugle, et dans l'hypothèse où il y a effet du cocktail de contaminants, sont en accord avec les résultats de Bundschuh et *al.* (2013). Une exposition de 120 minutes au cocktail (à des concentrations environnementalement pertinentes) entraîne une diminution significative du taux d'ingestion des gammares. Cependant, la comparaison entre les conditions expérimentales de l'étude (cocktail de composition différente, durée d'exposition non comparable) et celles de l'expérience réalisée au cours de ce stage n'est pas aisée et les résultats obtenus pour chacune des expériences ne sont peut-être pas liés au même phénomène. Maltby et *al.* (2002) obtiennent des résultats similaires chez *Gammarus pulex*. Lorsque cet organisme, encagé, est exposé, sur le terrain, à divers contaminants, comme des métaux, des pesticides ou de l'ammoniac notamment, son taux d'ingestion diminue. Lebrun a montré que le taux d'ingestion de gammares encagés en amont de la ZTHA de Rampillon (donc milieu chargé en contaminants) était significativement plus faible (entre 0,2 et 0,3 mg/mg/j) comparé à celui de gammares encagés en aval de la zone (milieu moins chargé car eau épurée par la zone) (entre 0,4 et 0,6 mg/mg/j) et ce en plein printemps, période décrite comme étant critique pour la biodiversité (période de vulnérabilité) (Lebrun *in* Letournel et *al.*, 2021).

Malgré tout, la température de l'eau a pu jouer un rôle déterminant dans l'influence du taux d'ingestion. En effet, Maltby et *al.* (2002) ont montré que la température expliquait 76 % de l'hétérogénéité dans ce taux d'ingestion, dans des stations de référence. De même, Coulaud et *al.* (2011) décrivent une influence linéaire significative de la température sur le taux d'ingestion avec une réduction du taux de 50 % à 7°C par rapport à 16°C chez *Gammarus fossarum*. Cette influence négative de la température sur le comportement alimentaire de *G. fossarum* a été observé par Coulaud et ses collaborateurs dans différentes rivières, au cours de différentes saisons et dans des contextes physico-chimiques variés. D'où l'importance de prendre en compte les facteurs environnementaux et leur influence sur les résultats obtenus.

La différence dans les concentrations en nitrates dans les mésocosmes traités par rapport aux concentrations dans les témoins provient d'une erreur de manipulation. Le volume des mésocosmes témoins et le niveau de nitrate initiale (avant dopage) dans les mésocosmes traités ont été surestimés ce qui produit ce « surdopage » des témoins par rapport au mésocosmes traités. Lors de tests de toxicité aigus, Gerhardt a montré qu'une exposition à 100 mg/L de nitrate pendant 24h entraînait une augmentation du niveau de locomotion et du niveau de ventilation de *Gammarus fossarum* (Gerhardt, 2020). Par ailleurs, une exposition sur le terrain à une concentration de 67,5 mg/L de nitrates (NO₃-N)



conduit à une diminution de la fitness de *G. fossarum* en 24h (diminution de l'activité de locomotion) (Gerhardt et al., 2020). Des concentrations élevées en nitrates peuvent être responsables du développement, du maintien et de la prolifération d'algues toxiques notamment (Camargo et Alonso, 2006). Les concentrations en nitrate sont plus élevées dans les témoins que dans les mésocosmes traités. Ainsi, la surmortalité des gammares dans le témoin visible pourrait éventuellement être due à une augmentation du nombre d'algues toxiques, due à une concentration importante en nitrate. Le témoin aveugle étant moins exposé à la lumière du soleil, aurait défavorisé le développement de ces algues et empêcher la survenue de phénomènes de toxicité chez les organismes étudiés, d'où une mortalité bien moindre que celle obtenue dans le témoin visible.

Les gammares exposés proviennent d'un milieu aquatique lotique (ru de Saint-Blandin). Ces mêmes organismes sont exposés dans un milieu lentique (ZTHA de Rampillon), ce changement de conditions environnementales pourrait avoir un impact sur leur écophysiologie et leur comportement.

Enfin, un potentiel effet du brome n'est pas à écarter (mésocosmes dopés avec 15 mg/L de brome). En effet, nous avons testé les effets d'une exposition de *Gammarus fossarum* à différentes concentrations de brome (0 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L et 15 mg/L) après 24h, 48h, 96h et 168h d'exposition. Les résultats n'indiquent pas d'effet de cet élément sur le taux de survie ni sur le taux d'amplexus des gammares. Le paramètre locomotion semble impacté ce qui peut s'expliquer par une augmentation du niveau de stress des organismes. Cependant, la sortie des béciers, de l'enceinte thermostatée sur la paillasse, et le changement relatif du niveau d'exposition lumineuse, malgré un dispositif en carton mis en place afin de limiter les variations d'intensité lumineuse entre l'armoire thermostatée (lumière non directe) et la paillasse, pourrait avoir eu un impact non négligeable sur le niveau d'agitation des animaux. Dans notre expérimentation, le taux d'ingestion n'est pas significativement lié à la concentration en brome. Or, il a été démontré qu'une exposition à certains métaux (cuivre, plomb, cadmium) pouvait diminuer le taux d'ingestion des gammares (Lebrun et Gismondi, 2020).

Les Amphipodes, comme *Gammarus pulex*, notamment, évitent activement les flux d'eau contaminés en pesticides en milieu lotique (Schulz et Liess, 1999). Cependant, les milieux aquatiques lotiques ne sont pas comparables aux milieux aquatiques lenticques, mais il est intéressant de se demander si ces comportements d'évitement sont observables dans les mares, par exemple ; si ce type de milieu permet tout de même aux organismes qui adoptent cette stratégie, de l'appliquer, et enfin, si elle fonctionne dans ces milieux lenticques.



Buchwalter et coll. ont montré que les taux d'absorption du chlorpyrifos étaient plus importants chez les insectes de petite taille et possédant des surfaces cellulaires externes relativement grandes, comme les branchies notamment (Buchwalter et al., 2002).

Selon Pereira et al. (2014) et Hasenbein et al. (2016), les mésocosmes et les tests de toxicité chroniques sont des approches plus pertinentes et plus réalistes pour l'évaluation du risque écotoxicologique des écosystèmes aquatiques. Ainsi, l'expérience en mésocosmes s'inscrit bien dans cette logique d'évaluation pertinente et réaliste du risque écotoxicologique de la pression chimique de la mare sur un taxon clé dans les processus de décomposition de la matière organique, *Gammarus sp.*

Bien sûr, la plus grande limite de notre expérience vient de la non-acquisition des données relatives aux données chimiques (analyses en cours). Sans ces données, il est impossible de déterminer l'influence de ces données sur les résultats obtenus au cours de l'expérience. Il est d'ailleurs important de souligner l'importance de ces données simplement pour quantifier l'importance et l'influence des affinités des substances pour les différentes matrices (eau et sédiment). En effet, ces affinités peuvent avoir un impact non direct sur la dangerosité des substances pour les gammares : les molécules ayant une forte affinité avec le sédiment ne présentent pas de danger pour les gammares encagés (les cages ne sont pas en contact avec le sédiment) et au contraire celles avec une forte affinité pour l'eau, étant distribuées dans la colonne d'eau, elles participent activement au risque chimique auquel font face les gammares.

L'analyse des paramètres biochimiques sur les gammares congelés après l'exposition en mésocosmes est envisageable et pourrait permettre d'apporter d'autres éléments de réponses quant à l'impact de l'exposition de *G. fossarum* au cocktail de contaminants, comme l'a fait Lebrun et coll. en 2017 pour évaluer l'impact d'un cocktail de métaux (Lebrun et al., 2017) ou, en 2020, l'impact de deux insecticides (imidacloprid et chlorpyrifos) (Lebrun et al., 2020).

Schäfer et al. (2007) ont montré qu'un stress, engendré par les pesticides dans les cours d'eau, était responsable d'une diminution significative de la décomposition de la litière due à des modifications structurelles dans les communautés de Macro-invertébrés et notamment due à l'atteinte des détritivores. Un impact de la pression chimique de la mare sur les gammares pourrait induire des effets négatifs sur cette fonction écosystémique. C'est pour cette raison qu'une étude sur l'impact des contaminants d'origine agricole sur les acteurs de la dégradation de la litière serait intéressante pour évaluer l'importance des effets de la pression chimique sur cette fonction. Enfin, ces travaux montrent l'importance de la caractérisation des facteurs environnementaux en écotoxicologie.



Conclusion et perspectives

La zone tampon humide artificielle de Rampillon constitue un réservoir important de biodiversité, ce qui a pu être confirmé lors des nombreuses sorties sur le terrain au cours de ce stage. Cette zone humide constitue, cependant, bel et bien un réservoir de contaminants d'origine agricole (pesticides, nitrates). Les chroniques de flux de contaminants montrent en effet que la mare est plus ou moins chargée en pesticides en fonction des saisons, avec un pic chimique notable au printemps. La biodiversité se retrouve ainsi, potentiellement soumise à cette pression. Selon l'indice de vulnérabilité que nous avons proposé prenant en compte les dynamiques chimiques et écologiques, la biodiversité pourrait être particulièrement vulnérable du printemps au début de l'été. Des tests d'écotoxicité *in situ* et le suivi de l'évolution des profils taxonomiques de la mare, via des inventaires faunistiques, pourraient être envisagés pour évaluer la criticité réelle de ces périodes. L'influence importante des facteurs environnementaux confondants et l'absence des données de chimie limitent, à l'heure actuelle, l'interprétation des résultats et il est donc impossible de conclure sur l'impact de la pression chimique de la mare sur *G. fossarum* et donc de conclure quant à un impact sur la dégradation de la litière. Il est, cependant, intéressant de se demander ce qu'il advient des gammares indigènes certaines années quand on considère les déclinés drastiques de populations observés certaines années. Notre travail montre que vulnérabilité de la biodiversité face aux flux de contaminants agrochimiques est très probable étant donné les niveaux de concentrations des flux chimiques mesurés, d'autant plus que les seuils de risques environnementaux sont dépassés (> 1) pour toutes les quinze semaines de l'année. Les Amphibiens sont, par ailleurs, des organismes relativement fragiles vis-à-vis des contaminations chimiques, fragilité expliquée par leur caractéristiques anatomo-physiologiques (respiration cutanée) et par leur position relativement haute dans le réseau trophique (bioamplification). L'utilisation de biomarqueurs d'exposition et d'effets (enzymologie) des pesticides dans le sang ou la salive (Mingo et *al.*, 2017) pourrait être envisagée pour mieux rendre compte de la vulnérabilité réelle de la biodiversité de la mare. L'étude des biomarqueurs d'exposition comportementaux, ou encore de l'impact de traitements sur les fonctions écosystémiques comme la dégradation de la litière (gammares et aselles) permettraient de vérifier et quantifier cette vulnérabilité. Ces recherches pourront contribuer à comprendre comment concilier abatement des pesticides et support de biodiversité et préserver les fonctions écosystémiques en milieu agricole pour assurer une gestion durable des agro-paysages. Ces travaux ont été valorisés et présentés au colloque français de la société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée (SEFA) au mois de juin 2021.

Bibliographie

- Agence Eau Seine Normandie, 2019. Contamination des cours d'eau et des eaux souterraines du bassin Seine-Normandie par les pesticides et leurs produits de dégradation.
- Beaune, D., 2018. Plan opérationnel de sauvegarde des crapauds communs (*Bufo bufo*) et autres Amphibiens du Val-Suzon.
- Beketov, M.A., Kefford, B.J., Schafer, R.B., Liess, M., 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 11039–11043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305618110>
- Belden, J., McMurry, S., Smith, L., Reilley P., 2010. Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2477–2480. <https://doi.org/10.1002/etc.297>
- Berenzen, N., Kumke, T., Schulz, H.K., Schulz, R., 2005. Macroinvertebrate community structure in agricultural streams: impact of runoff-related pesticide contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.10.010>
- Buchwalter, D.B., Jenkins, J.J., Curtis, L.R., 2002. Respiratory strategy is a major determinant of [3H]water and [14C]chlorpyrifos uptake in aquatic insects 59, 8.
- Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Klemm, P., Elsaesser, D., Stang, C., Schulz, R., 2013. Effects of peak exposure scenarios on *Gammarus fossarum* using field relevant pesticide mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 95, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.025>
- Camargo, J.A., Alonso, Á., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 32, 831–849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- Cayrou, J., Céréghino, R., 2003. Life History, Growth and Secondary Production of *Caenis luctuosa* and *Cloeon simile* (Ephemeroptera) in a Small Pond, S.W. France. *Aquatic Insects* 25, 191–201. <https://doi.org/10.1076/aqin.25.3.191.15263>
- Cianciara, S., 1980. Stages and Physiological Periods in the Development of *Cloeon* Dipterum (L.) (Baetidae), in: Flannagan, J.F., Marshall, K.E. (Eds.), *Advances in Ephemeroptera Biology*. Springer US, Boston, MA, pp. 265–276. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3066-0_21
- Chandesris, A., Wasson, J.G., Pella, H., Sauquet, E., Mengin, N., n.d. Appui scientifique à la mise en oeuvre de la Directive cadre européenne sur l'eau. Typologie des cours d'eau de France métropolitaine 63.
- Chaumont, C., Letournel, G., Le Boulout M., 2017. Planches illustratives dans la ZTHA de Rampillon.
- Cheek, O., Ide, C.F., Bollinger, J.E., Rider, C.V., McLachlan, J.A., 1999. Alteration of Leopard Frog (*Rana pipiens*) Metamorphosis by the Herbicide Acetochlor. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 70–77. <https://doi.org/10.1007/s002449900491>
- Clifford, H.F., 1982. LIFE CYCLE OF MAYFLIES (EPHEMEROPTERA), WITH SPECIAL REFERENCE TO VOLTINISM. *Quaestiones Entomologicae* 18, 15-90.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., Chaumot, A., 2011. In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res.* 45, 6417–6429
- Davies, N.B., Halliday, T.R., 1977. Optimal mate selection in the toad *Bufo bufo*. *Nature* 269, 56-58.
- Doerksen, G.P., 1980. NOTES ON THE REPRODUCTIVE BEHAVIOUR OF ENALLAGMA CYATHIGERUM (CHARPENTIER) (ZYGOPTERA: COENAGRIONIDAE). *Odonatologica* 9, 293-296.
- Dufresnes, C., 2015. Sex-chromosome evolution of Palearctic tree frogs in space and time. [Thèse de doctorat, Université de Lausanne].
- Duguet R., Melki, F., 2003. Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. ACEMAV. Parthénope Collection. p. 155.
- Edgar, P., Bird, D.R., 2006. Action Plan for the Conservation of the Crested Newt *Triturus cristatus* Species Complex in Europe. CONVENTION ON THE CONSERVATION OF EUROPEAN WILDLIFE AND NATURAL HABITATS – Standing Committee – 26th meeting.

- EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), Ockleford, C., Adriaanse, P., Berny, P., Brock, T., Duquesne, S., Grilli, S., Hernandez-Jerez, A.F., Bennekou, S.H., Klein, M., Kuhl, T., Laskowski, R., Machera, K., Pelkonen, O., Pieper, S., Stemmer, M., Sundh, I., Teodorovic, I., Tiktak, A., Topping, C.J., Wolterink, G., Aldrich, A., Berg, C., Ortiz-Santaliestra, M., Weir, S., Streissl, F., Smith, R.H., 2018. Scientific Opinion on the state of the science on pesticide risk assessment for amphibians and reptiles. EFS2 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5125>
- Évaluation française des écosystèmes et des services écosystémiques (EFESE). Rapport de première phase de l'évaluation française des écosystèmes et des services écosystémiques. Octobre 2020. Source : <https://www.ecologie.gouv.fr/evaluation-francaise-des-ecosystemes-et-des-services-ecosystemiques> (consulté le 09/02/2021).
- Gerhardt, A., 2020. Sensitivity towards Nitrate: Comparison of Groundwater versus Surface Water Crustaceans. J Soil Water Sci 4. <https://doi.org/10.36959/624/436>
- Gerhardt, A., Badouin, N., Weiler, M., n.d. In situ online biomonitoring of groundwater quality using freshwater amphipods exposed to organic fertilizer and rainfall events 12.
- Ginebreda, A., Kuzmanovic, M., Guasch, H., de Alda, M.L., López-Doval, J.C., Muñoz, I., Ricart, M., Romaní, A.M., Sabater, S., Barceló, D., 2014. Assessment of multi-chemical pollution in aquatic ecosystems using toxic units: Compound prioritization, mixture characterization and relationships with biological descriptors. Science of The Total Environment 468–469, 715–723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.086>
- Gittins, S.P., 2010. The breeding migration of the Common toad (*Bufo bufo*) to a pond in mid- Wales. Journal of Zoology 199, 555–562. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1983.tb05106.x>
- Hartel, T., n.d. Weather conditions, breeding date and population fluctuation in *Rana dalmatina* from central Romania 5.
- Hasenbein, S., Lawler, S.P., Geist, J., Connon, R.E., 2016. A long-term assessment of pesticide mixture effects on aquatic invertebrate communities: A long-term assessment of pesticide mixture effects. Environ Toxicol Chem 35, 218–232. <https://doi.org/10.1002/etc.3187>
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjua, Y., Parker, J., Tsui, M., 2006. Pesticide Mixtures, Endocrine Disruption, and Amphibian Declines: Are We Underestimating the Impact? Environmental Health Perspectives 114, 40–50. <https://doi.org/10.1289/ehp.8051>
- Hecnar, S.J., 1995. Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern ontario. Environ Toxicol Chem 14, 2131-2137. <https://doi.org/10.1002/etc.5620141217>
- Hela, D.G., Lambropoulou, D.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2005b. ENVIRONMENTAL MONITORING AND ECOLOGICAL RISK ASSESSMENT FOR PESTICIDE CONTAMINATION AND EFFECTS IN LAKE PAMVOTIS, NORTHWESTERN GREECE. Environ Toxicol Chem 24, 1548. <https://doi.org/10.1897/04-455R.1>
- Hemelaar, A., 1988b. Age, Growth and Other Population Characteristics of *Bufo bufo* from Different Latitudes and Altitudes. Journal of Herpetology 22, 369. <https://doi.org/10.2307/1564332>
- Hilsenhoff, W.L., 1995b. Aquatic Hydrophilidae and Hydraenidae of Wisconsin (Coleoptera). I. Introduction, Key to Genera of Adults, and Distribution, Habitat, Life Cycle, and Identification of Species of *Helophorus* Fabricius, *Hydrochus* Leach, and *Berosus* Leach (Hydrophilidae), an 30.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K., Veldhoen, N., 2004. TOXICITY OF GLYPHOSATE-BASED PESTICIDES TO FOUR NORTH AMERICAN FROG SPECIES. Environ Toxicol Chem 23, 1928. <https://doi.org/10.1897/03-71>
- Hume, K.D., Elwood, R.W., Dick, J.T.A., Morrison, J., 2005. Sexual dimorphism in amphipods: the role of male posterior gnathopods revealed in *Gammarus pulex*. Behav. Ecol. Sociobiol 58, 264-269.
- Hunt, L., Bonetto, C., Marrochi N., Scalise, A., Fanelli, S., Liess, M., Lydy, M.J., Chiu, M.-C., Resh, V.H., 2017. Species at Risk (SPEAR) index indicates effects of insecticides on stream invertebrate communities in soy production regions of the Argentine Pampas. Science of the Total Environment, 580, 699-709.
- Iosob, G.A., Prisecaru, M., n.d. OBSERVATIONS ON THE LIFE CYCLE AND REPRODUCTIVE BEHAVIOR IN RANA DALMATINA F. 10.
- Isselin-Nondedeu, F., Trochet, A., Joubin, T., Picard, D., Etienne, R., Chevalier, H.L., Legrand, D., Ribéron, A., 2017. Spatial genetic structure of *Lissotriton helveticus* L. following the restoration of a forest ponds network. Conserv Genet 18, 853–866. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-0932-z>
- Iversen, T.M., Jessen, J., 1977. Life-cycle, drift and production of *Gammarus pulex* L. (Amphipoda) in a Danish spring. Freshwater Biol 7, 287–296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1977.tb01676.x>

- Jacob, J.-P., 2007. Amphibiens et reptiles de Wallonie. D'Aves-Rainne, Gembloux.
- Jarvis, L.E., n.d. Factors affecting body condition in a great crested newt *Triturus cristatus* population. 6.
- Jeliazkov, A., 2013. Effets d'échelles dans les relations agriculture-environnement-biodiversité. [Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie – Paris].
- Jeliazkov, A., Chiron, F., Garnier, J., Besnard, A., Silvestre, M., Jiguet, F., 2014. Level-dependence of the relationships between amphibian biodiversity and environment in pond systems within an intensive agricultural landscape. *Hydrobiologia* 723, 7–23. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1503-z>
- Jeliazkov, A., Mimet, A., Chargé, R., Jiguet, F., Devictor, V., Chiron, F., 2016. Impacts of agricultural intensification on bird communities: New insights from a multi-level and multi-facet approach of biodiversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 216, 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.017>
- Kjellberg, G., 1973. Growth of *Leptophlebia vespertina* L., *CloPon dipterum* L. and *Ephemera vulgata* L. (Ephemeroptera) in a Small Woodland Lake 7. Kohler HR, Triebkorn R, 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341, 759-765.
- Kolding, S., Fenchel, T.M., 1979. Coexistence and Life Cycle Characteristics of Five Species of the Amphipod Genus *Gammarus*. *Oikos* 33, 323. <https://doi.org/10.2307/3544009>
- Kruger, K.M., Hero, J.-M., 2006. Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *J Zoology* 0, 060905012106004-??? <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00220.x>
- Kristoff, G., Guerrero, N.R.V., Cochon, A.C., 2010. Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*, by the carbamate pesticide carbaryl. *Aquatic Toxicology* 96, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.001>
- Lebrun, J. D., Uher E., Fechner, L. C., 2017. Behavioural and biochemical responses to metals tested alone or in mixture (Cd-Cu-Ni-Pb-Zn) in *Gammarus fossarum*: From a multi-biomarker approach to modelling metal mixture toxicity. *Aquatic Toxicology* 193, 160-167.
- Lebrun, J.D., & Gismondi, E., 2020. Behavioural and biochemical alterations in gammarids as induced by chronic metallic exposures (Cd, Cu and Pb): Implications for freshwater biomonitoring. *Chemosphere*, 127253. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127253
- Lebrun, J.D., De Jesus, K., Rouillac, L., Ravelli, M., Guenne, A., Tournebize, J., 2020. Single and combined effects of insecticides on multi-level biomarkers in the non-target amphipod *Gammarus fossarum* exposed to environmentally realistic levels. *Aquatic Toxicology* 218, 105357. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105357>
- Letournel, G., 2017. Peut-on concilier les enjeux Eau et Biodiversité dans les Zones Tampons Humides Artificielles de Rampillon (77) – Quelles perspectives pour leur déploiement à l'échelle régionale ?
- Letournel, G., Chaumont, C., Lebrun, J.D., Tournebize, J., 2021. Qualité de l'eau et écotoxicologie des zones tampons humides artificielles de Rampillon (Seine-et-Marne). *Sciences Eaux & Territoires*, cahier spécial n°5.
- Letournel, G., Pages, C., Chaumont, C., Seguin, L., Tournebize, J., 2021. Biodiversité et services écosystémiques des zones tampons humides artificielles de Rampillon (Seine-et-Marne). *Sciences Eaux & Territoires*, 72.
- Liess, M., Liebmann, L., Vormeier, P., Weisner, O., Altenburger, R., Borchardt, D., Brack, W., Chatzinotas, A., Escher, B., Foit, K., Gunold, R., Henz, S., Hitzfeld, K.L., Schmitt-Jansen, M., Kamjunke, N., Kaske, O., Knillmann, S., Krauss, M., Küster, E., Link, M., Lück, M., Möder, M., Müller, A., Paschke, A., Schäfer, R.B., Schneeweiss, A., Schreiner, V.C., Schulze, T., Schüürmann, G., von Tümpling, W., Weitere, M., Wogram, J., Reemtsma, T., 2021. Pesticides are the dominant stressors for vulnerable insects in lowland streams. *Water Research* 201, 117262. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117262>
- Le Roux, X., Barbault R., Baudry, J., Burel, F., Doussan, I., Garnier, E., Herzog, F., Lavorel, S., Lifran, R., Roger-Estrade, J., Sarthou, J.-P., Trommetter, M., 2012. Agriculture et biodiversité – Valoriser les synergies. Éditions Quæ.
- Macagnan, N., Rutkoski, C.F., Kolcenti, C., Vanzetto, G.V., Macagnan, L.P., Sturza, P.F., Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., 2017. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environ Sci Pollut Res* 24, 20699–20704. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9727-5>
- Maillet, 2013. Protocole commun de suivi des Amphibiens des mares à l'aide d'Amphicapt. Réserves Naturelles de France – Groupe RNF « Amphibiens et Reptiles ».

- Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M., McLoughlin, N., 2002. Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance. *Environ Toxicol Chem* 21, 361–368. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210219>
- Marquis, O., Millery, A., Guittonneau, S., Miaud, C., 2006. Toxicity of PAHs and jelly protection of eggs in the common frog *Rana temporaria*. *Amphibia-Reptilia*, 27, 472–475.
- McNeil, C.W., 1963. Winter Survival of *Stagnicola palustris nuttalliana* and *Physa propinqua*. *Ecology* 44, 187–191. <https://doi.org/10.2307/1933202>
- Meehan, S.T., 2013. IWT National Smooth Newt Survey 2013 report 18.
- Miaud, C., J., Muratet, 2018. *Les Amphibiens de France – Guide d'identification des œufs et des larves* (2^e édition). Éditions Quae.
- Mingo, V., Lötters, S., & Wagner, N. (2017). The use of buccal swabs as a minimal-invasive method for detecting effects of pesticide exposure on enzymatic activity in common wall lizards. *Environmental Pollution*, 220, 53–62. doi:10.1016/j.envpol.2016.09.022
- National Museum of Natural History, National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv, Ukraine), Martynov, A., 2016. The life cycles of mayflies (Insecta: Ephemeroptera) of the Eastern Ukraine. Second report. *Proc. Natl. Mus. Nat. Hist.* 2016, 86–94. <https://doi.org/10.15407/vnm.2016.14.086>
- Parr, M.J., 1976. SOME ASPECTS OF THE POPULATION ECOLOGY OF THE DAMSELFLY *ENALLAGMA CYATHIGERUM* (CHARPENTIER) (ZYGOPTERA: COENAGRIONIDAE). *Odonatologica* 5, 45-57.
- Pereira, S. P. P., Oliveira, R., Coelho, S., Musso, C., Soares, A. M. V. M., Domingues, I., & Nogueira, A. J. A. (2014). From sub cellular to community level: Toxicity of glutaraldehyde to several aquatic organisms. *Science of The Total Environment*, 470-471, 147–158. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.054
- Prisecaru, M., Voicu, R., Iosob, A., n.d. OBSERVATIONS ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF TRITURUS / 13.
- Reading, C., 2010. The impact of environmental temperature on larval development and metamorph body condition in the common toad, *Bufo bufo*. *Amphib Reptilia* 31, 483–488. <https://doi.org/10.1163/017353710X521537>
- Reading, C.J., 2009. Interspecific spawning between Common frogs (*Rana temporaria*) and Common toads (*Bufo bufo*). *Journal of Zoology* 203, 95–101. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1984.tb06046.x>
- Reading, C.J., 1998. The effect of winter temperatures on the timing of breeding activity in the common toad *Bufo bufo*. *Oecologia* 117, 469–475. <https://doi.org/10.1007/s004420050682>
- Roux, A.L., 1970. Le cycle de reproduction de deux espèces étroitement parentes de crustacés amphipodes : *Gammarus pulex* et *G. fossarum*. *Annls Limnol.* 6, 27–49. <https://doi.org/10.1051/limn/1970011>
- Sánchez-Bayo, F., Baskaran, S., Kennedy, I.R., 2002. Ecological relative risk (EcoRR): another approach for risk assessment of pesticides in agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 91, 37–57. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00258-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00258-4)
- Saulich, A.Kh., 2010. Long life cycles in insects. *Entmol. Rev.* 90, 1127–1152. <https://doi.org/10.1134/S0013873810090010>
- Schäfer, R.B., Caquet, T., Siimes, K., Mueller, R., Lagadic, L., Liess, M., 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of The Total Environment* 382, 272–285. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.04.040>
- Schäfer, R.B., von der Ohe PC, Rasmussen J, Kefford BJ, Beketov MA, Schulz R, Liess M, 2012. Thresholds for the Effects of Pesticides on Invertebrate Communities and Leaf Breakdown in Stream Ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5134-5142.
- Schatz, J., Petzold, A., Grosse, W-R., 2012. Phänologie, Bestandsentwicklung und Populationsstruktur eines isolierten Vorkommens des Teichmolchs *Lissotriton vulgaris* (L.) in der Stadt Halle (Saale). *Hercynia* 45, 209-226.
- Schulz, R., Liess, M., 1999. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquat. Toxicol.* 46, 155–176.
- Service des données et études statistiques (SDES) et office français de la biodiversité (OFB). *DATALAB – Eau et milieux aquatiques, les chiffres clés*. Edition Décembre 2020. Source : <https://ofb.gouv.fr/documentation/eau-et-milieux-aquatiques-les-chiffres-cles-edition-2020> (consulté le 09/02/2021).
- Shinn, C., Marco, A., Serrano, L., 2008. Inter- and intra-specific variation on sensitivity of larval amphibians to nitrite. *Chemosphere* 71, 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.054>

- Simčič, T., Brancelj, A., 2007. The effect of light on oxygen consumption in two amphipod crustaceans—the hypogean *Niphargus stygius* and the epigean *Gammarus fossarum*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 40, 141–150. <https://doi.org/10.1080/10236240701452465>
- Sinsch, U., 1988. Seasonal Changes in the Migratory Behaviour of the Toad *Bufo bufo*: Direction and Magnitude of Movements. *Oecologia* 76, 390–398.
- Steel, E.A., 2009. SOME OBSERVATIONS ON THE LIFE HISTORY OF ASELLUS AQUATICUS (L.) AND ASELLUS MERIDIANUS RACOVITZA (CRUSTACEA: ISOPODA). *Proceedings of the Zoological Society of London* 137, 71–87. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1961.tb06162.x>
- Stoks, R., Córdoba-Aguilar, A., 2012. Evolutionary Ecology of Odonata: A Complex Life Cycle Perspective. *Annu. Rev. Entomol.* 57, 249–265. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100557>
- Sowa, R., 1980. Taxonomy and ecology of European species of the Cloeon simile Eaton group (Ephemeroptera: Baetidae). *Ent. Scand.* 11, 249–258.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2010. *Invertébrés d'eau douce – systématique, biologie, écologie*. CNRS Editions.
- Tóth, Z., Hoi, H., Hettyey, A., 2011. Intraspecific variation in the egg-wrapping behaviour of female smooth newts, *Lissotriton vulgaris*. *Amphib Reptilia* 32, 77–82. <https://doi.org/10.1163/017353710X543001>
- Tournebize, J., 2016. Convention AESN-Irstea N°1030129-3 – Évaluation d'actions pour protéger la ressource en eau : conversion partielle d'un versant à l'agriculture biologique – Aménagements de type zone tampon humide artificielle – Mission de support scientifique et technique aux délégations de l'agence.
- Tournebize, J., Chaumont, C., Mander, Ü., 2017. Implications for constructed wetlands to mitigate nitrate and pesticide pollution in agricultural drained watersheds. *Ecol. Eng.* 103, 415–425.
- Trekels, H., de Meutter, F.V., Stoks, R., 2011. Habitat isolation shapes the recovery of aquatic insect communities from a pesticide pulse. *Journal of Applied Ecology* 10.
- Udvardy M., 1975. A Classification of the Biogeographical Provinces of the World. IUCN occasional paper no. 18. International union for conservation of nature and natural resources Morges, Switzerland. Source : <http://fnad.org/Documentos/A%20Classification%20of%20the%20Biogeographical%20Provinces%20of%20the%20World%20Miklos%20D.F.%20Udvardy.pdf> (consulté le 02/03/2021)
- Urszán, T.J., Török, J., Hettyey, A., Garamszegi, L.Z., Herczeg, G., 2015. Behavioural consistency and life history of *Rana dalmatina* tadpoles. *Oecologia* 178, 129–140. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3207-0>
- Viarengo, A., Falcone, R., 1977. Chemical analysis of *Rana esculenta* egg jelly envelope. *Acta Embryologiae Experimentalis*, 3, 357–362.
- Wagner, N., Reichenbecher, W., Teichmann, H., Tappeser, B., Lötters, S., 2013. Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians: Impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. *Environ Toxicol Chem* 32, 1688–1700. <https://doi.org/10.1002/etc.2268>
- Ward, D., Sexton, O.J., 1981. Anti-predator role of salamander eggs membranes. *Copeia*, 1981, 724–726.
- Wogram, J., Liess, M. Rank Ordering of Macroinvertebrate Species Sensitivity to Toxic Compounds by Comparison with That of *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 0360–0367 (2001). <https://doi.org/10.1007/s001280133>

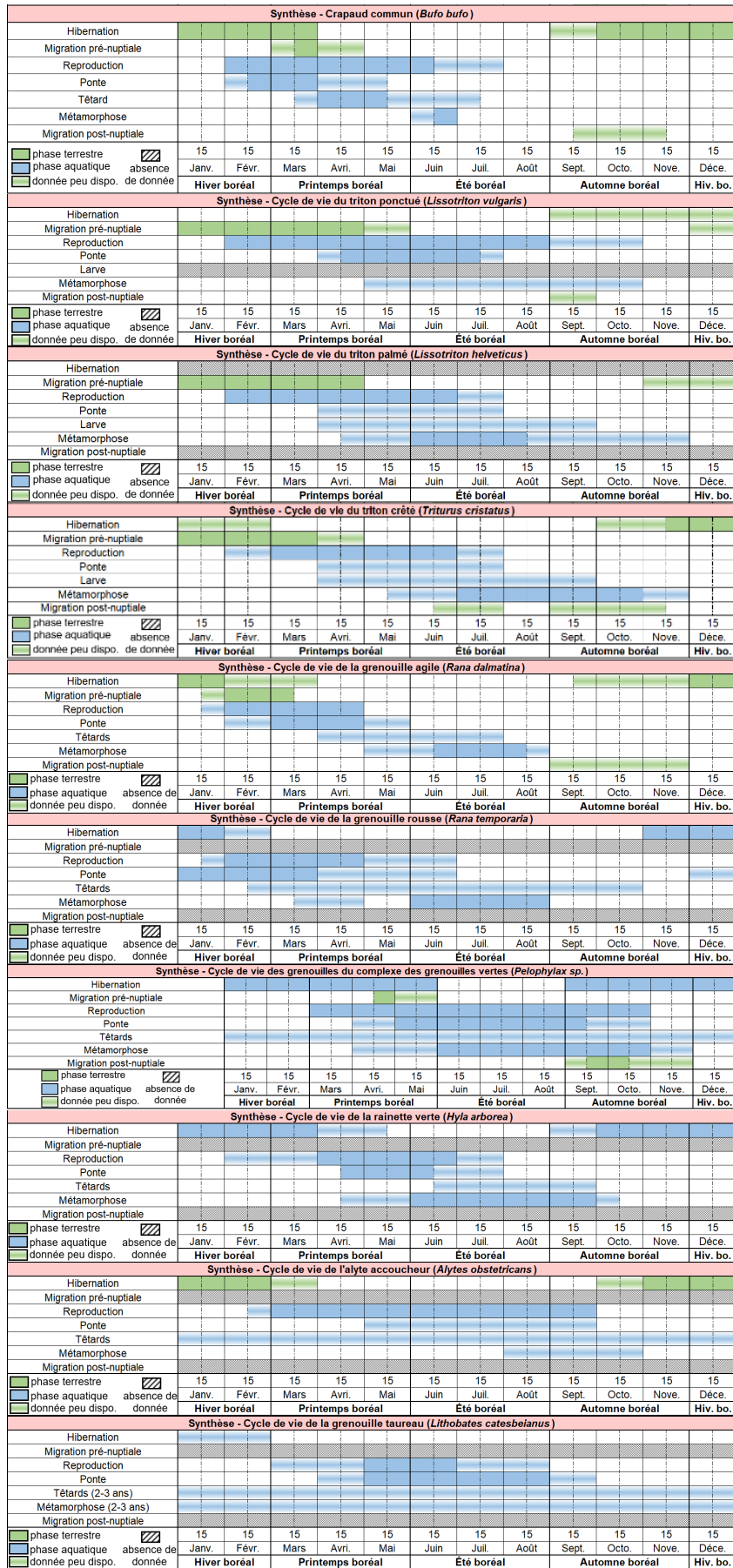
Sitographie

- 1 : <https://www.data-pesticides.fr/> (consulté le 09/02/2021)
- 2 : <http://jbigdata.fr/webapps/07-pesticide/> (consulté le 09/02/2021)
- 3 : <http://www.driee.ile-de-france.developpement-durable.gouv.fr/designation-des-zones-vulnerables-2020-2021-r1847.html> (consulté le 09/02/2021)
- 4 : <https://www.inrae.fr/> (consulté le 04/06/2021)
- 5 : <https://www6.jouy.inrae.fr/hycar> (consulté le 09/02/2021)
- 6 : <https://artemhys.inrae.fr/experimentations-niv1/rampillon> (consulté le 09/02/2021)
- 7 : <http://infoterre.brgm.fr/viewer/MainTileForward.do#> (consulté le 05/04/2021)
- 8 : <https://www.geoportail.gouv.fr/> (consulté le 05/04/2021)
- 9 : <https://meteofrance.com/comprendre-climat/france/le-climat-en-france-metropolitaine>
(consulté le 05/04/2021)
- 10 : <https://substances.ineris.fr/fr/>
- 11 : <https://amphibiaweb.org/>
- 12 : <https://doris.ffesm.fr/>
- 13 : <https://inpn.mnhn.fr/>
- 14 : <https://www.senat.fr/rap/I02-215-1/I02-215-136.html> (consulté le 20/02/2021). La qualité de l'eau et l'assainissement en France (rapport).
- 15 : <https://alsacenature.org/>

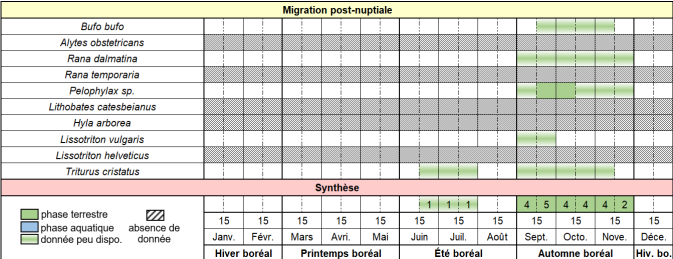
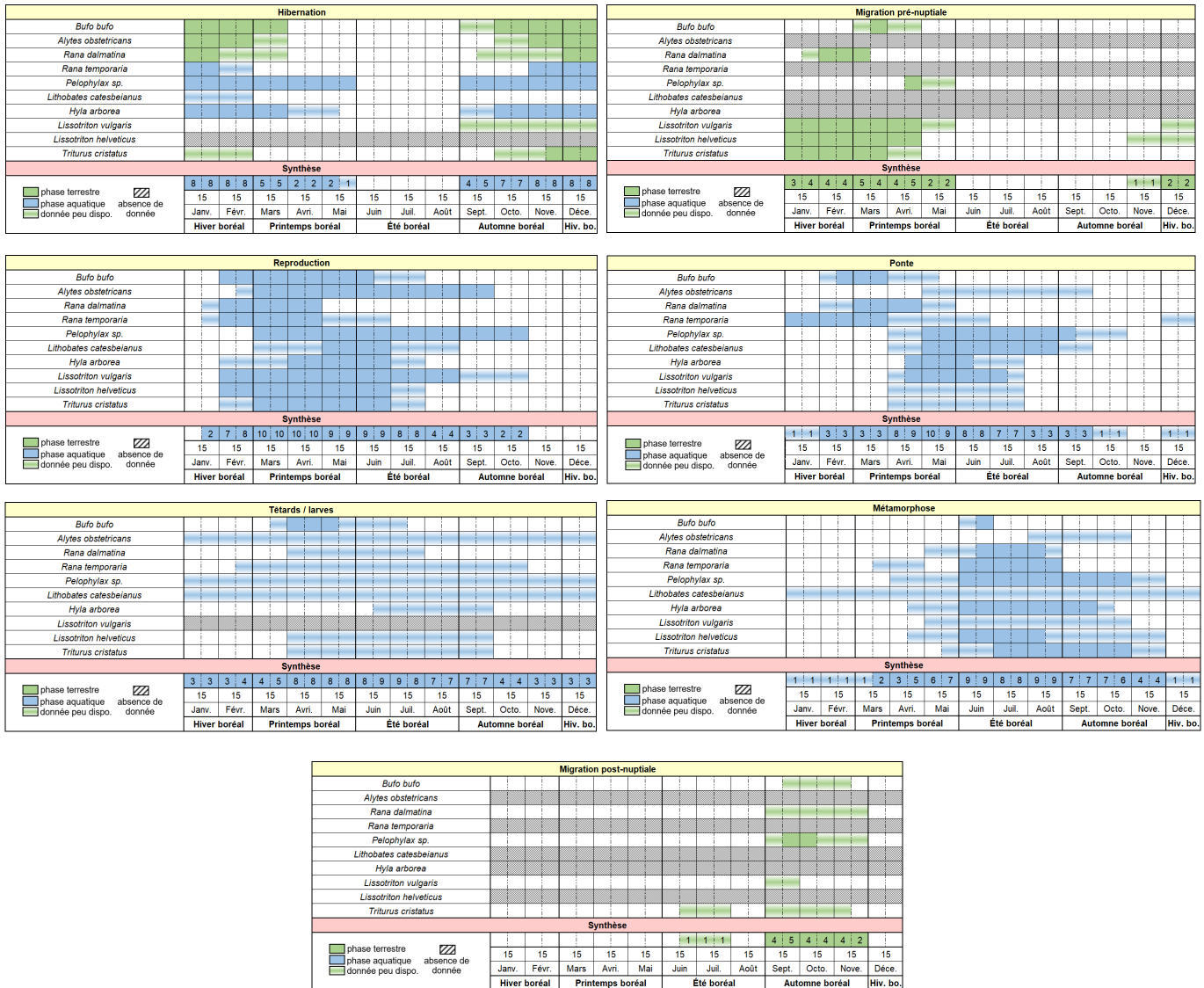
Annexes

Annexe I – Cycles de vie des Macro-invertébrés et cycles de vie des Amphibiens

Macro-invertébrés	Hiver boréal		Printemps boréal			Été boréal			Automne boréal			Hiv. bo.
	Janv.	Févr.	Mars	Avri.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Octo.	Nove.	Déce.
	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Stagnicola sp.												
obs45.fr												
obs41.fr												
obsindre.fr												
nas.er.usgs.gov												
Cloeon sp.												
Martynov, 2016												
Clifford, 1982												
Kjellberg, 1973												
Enallagma cyathigerum												
Parr, 1976												
Tyrell, 2012												
nature22.com												
atlasbiodiversite.arb-idf.fr												
SHNAO.eu												
INPN-MNHN												
libellulesmaizieres.fr												
Plea minutissima												
natureocentre.org												
clicnat.fr												
obsindre.fr												
observations.be												
biodivpaysdelaloire.fr												
aquaticbugs.com												
Berosus sp.												
Hilsenhoff, 1995												
Shields, 2017												
INPN-MNHN												
Gammarus sp.												
Kolding et Fenchel, 1979												
Iversen et Jessen, 1977												
Roux, 1970												
doris.ffessm.fr												
Synthèse												
Phase d'exposition	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	Janv.	Févr.	Mars	Avri.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Octo.	Nove.	Déce.
	Hiver boréal		Printemps boréal			Été boréal			Automne boréal			Hiv. bo.



Annexe II – Phases des cycles de vie des Amphibiens



Résumé

Les zones tampons humides artificielles (ZTHA) sont conçues pour abattre les nitrates et certains pesticides. Néanmoins, elles constituent un réservoir potentiel de contaminants susceptibles d'impacter les espèces sauvages qu'elles abritent. Dans la ZTHA de Rampillon (Seine-et-Marne), les contaminants d'origine agricole sont prépondérants au printemps et sont à l'origine d'un risque écologique important, pesant sur la biodiversité de la zone, durant cette même saison. Les pics d'activité biologique de la biodiversité, en lien avec un pic d'exposition de cette dernière face aux contaminants, ont lieu au cours de la période de l'année où l'indice de vulnérabilité de la biodiversité (rapport du risque écologique / nombre d'espèces exposées) est le plus important, c'est-à-dire du printemps au début de l'été. L'exposition de *Gammarus fossarum* à un cocktail de contaminants, en mésocosmes implantés dans la mare nous a permis de montrer un impact sur la survie et le taux d'ingestion des gammares, mais l'influence importante des facteurs environnementaux et expérimentaux confondants au cours de l'expérience et l'absence, à l'heure actuelle, de données relatives à la chimie compliquent l'interprétation des résultats. Ces recherches contribuent à comprendre comment concilier abatement des pesticides et support de biodiversité et préserver les fonctions écosystémiques en milieu agricole pour assurer une gestion durable des agro-paysages.

Constructed wetlands are conceived to reduce nitrate and pesticides concentrations. However, they constitute a potential contaminants reservoir likely to impact wild species they shelter. In the Rampillon (Seine-et-Marne) constructed wetland, agricultural contaminants dominate at spring and result in a high ecological risk for the pond biodiversity during this season. Biological activity peaks linked to agricultural contaminants peaks occurs in spring and in the beginning of summer, when the biodiversity vulnerability index (ratio between the combined ecological risk and the number of exposed species) is the most important. The exposure of *Gammarus fossarum* to a pesticide cocktail in mesocosms set up in the pond showed in some cases a negative effect of the treatment on the individuals' survival and ingestion rate. However, we could not prove the vulnerability of this organism to this cocktail for all its functions and conditions due to the influence of confounding environmental and experimental factors. Those findings contribute to understand how to reconcile pesticides reduction and biodiversity support, to preserve ecosystem functions in agricultural environments and promote a sustainable management of agricultural landscapes.