



Responsables

LIEC:

FELTEN Vincent

Maître de Conférences, Chaire d'Excellence Université de Lorraine/CNRS

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, LIEC - UMR CNRS 7360

Rue du Général Delestraint, 57070 Metz

☎ 03-87-37-86-56; ✉ vincent.felten@univ-lorraine.fr

Agence de l'eau:

Pierre-Olivier LAUSECKER

Chargé d'études "Milieux humides et plans d'eau"

Agence de l'eau Rhin-Meuse

Rozérieulles - B.P. 30019, 57161 Moulins-Lès-Metz

☎ 03-87-34-46-67; ✉ pierre-olivier.lausecker@eau-rhin-meuse.fr

Evaluation de l'impact des pollutions diffuses routières sur le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant¹:

Effets sur la physiologie et le comportement d'invertébrés benthiques, et sur le fonctionnement des écosystèmes

Décembre 2015



Crédit photo : LIEC2015

¹ s'inscrit dans le cadre de la Zone Atelier Moselle (ZAM)

SOMMAIRE

Afin de faciliter la lecture du document et le rendre plus opérationnel, la synthèse de nos résultats apparaîtra en page 4, après avoir défini le contexte, les objectifs généraux ainsi que la constitution du comité de pilotage. De la même manière, une partie nommée « take home message » prendra place en page 34, juste avant la partie décrivant les perspectives du projet.

I – Contexte.....	2
II – Rappel des objectifs généraux.....	3
III – Comité de pilotage.....	3
IV – Synthèse opérationnelle des résultats.....	4
V – ACTION 1 - Etude bibliographique, analyse de données existantes.....	8
V.1 – Caractérisation des pressions polluantes.....	8
V.2 – Impacts sur les systèmes dulçaquicoles.....	10
V.3 – Impacts sur les sols.....	14
V.4 – Limites des études réalisées.....	15
V.5 – Références bibliographiques.....	15
VI - ACTION 2 - Effet physio-comportementaux et fonctionnels.....	16
VI.1 – Généralités.....	16
VI.2 – Matériel biologique.....	17
VI.3 – Design expérimental général.....	17
VI.4 – Réponses individuelles et fonctionnelles étudiées.....	18
VI.5 – Protocoles, résultats & discussion.....	20
VII – « Take home message »	34
VIII – Perspectives	35

I. CONTEXTE

En hiver, les nombreuses précipitations de neige combinées aux importantes chutes de température nécessitent un entretien rigoureux du réseau routier. Dans ce contexte et afin de maintenir la sécurité des usagers de la route ainsi que la mobilité individuelle et industrielle (transports), l'épandage de fondants routiers sur les axes de circulation est une pratique à répétition très largement utilisée depuis des décennies. En baissant le point de congélation de l'eau, ils vont ainsi permettre de faire fondre la pellicule de glace ou la neige compactée et durcie accumulée sur

le revêtement des chaussées, et par voie de conséquence accroître l'adhérence des routes en période hivernale. Ainsi, chaque hiver, de grandes quantités de fondants routiers sont répandues en traitement préventif et curatif. En France, l'épandage annuel a été estimé entre 200 000 et 2 Million de tonnes sur les 20 dernières années (CETE de L'Est / Asselvia). Ainsi, de 10 à 80 tonnes par an et par km² peuvent être répandues. Compte tenu de l'accroissement de la surface du réseau routier, la tendance actuelle est à la croissance².

Les fondants routiers sont constitués d'un composé actif (NaCl, CaCl₂, MgCl₂, urée, ...), d'anti-mottant évitant l'agrégation du fondant (hexacyanoferrate de Na, Ca ou K), ainsi que d'insolubles (Carbonates, sulfates, silicates, sables, argiles) et d'éléments traces (As, Pd, Cd, Cr, Cu, Ni, Hg, Zn, Fe, Al, ...) en fonction de la nature/provenance du fondant employé. En France, le NaCl est le fondant le plus couramment employé et représente 99% du tonnage épandu. Il présente l'avantage du coût et de l'efficacité aux gammes de températures rencontrées². Cette pollution saline diffuse³ est potentiellement accompagnée de nombreuses autres émissions de substances liées, notamment, au trafic et infrastructures routières⁴.

Toutefois, se pose actuellement la question de l'innocuité de ces épandages pour l'environnement, d'autant qu'une augmentation des teneurs en chlorures liée à l'emploi de sels de voirie semble démontrée dans **plusieurs ruisseaux de tête de bassin français**, notamment au niveau du bassin Rhin-Meuse. Les pays soumis à de fortes contraintes hivernales (Canada, Suède, Finlande, Norvège, ...) ont rapidement affiché une forte préoccupation vis à vis du danger potentiel représenté par ces fondants routiers pour l'environnement. Ainsi, au Canada, ils ont été inscrits sur la liste des substances d'intérêt prioritaire, puis sur le tableau des produits toxiques de la loi canadienne pour la protection de l'environnement. Par ailleurs des mesures ont été mises en place pour encadrer l'usage des fondants routiers en optimisant leur gestion et leur utilisation. En parallèle, des guides et recommandations destinés aux gestionnaires des voiries ont été générées. En France, à ce jour, aucune réglementation ne traite spécifiquement et explicitement du cas des fondants routiers. Cette situation qui concerne pourtant de vastes territoires souligne la nécessité d'acquérir des connaissances relatives aux effets de ces fondants sur le milieu naturel, et cela à des concentrations réalistes. Ceci est d'autant plus important que la préoccupation est grandissante tant au niveau du grand public (médiatisation: articles) qu'au sein des gestionnaires de l'environnement (CETE Est, Agence de l'eau, OMEMA).

Dans ce contexte, et afin de se trouver dans les conditions les plus défavorables, nous avons choisi de nous focaliser sur des zones qui sont, à priori, le plus vulnérables aux fondants routiers à savoir **les ruisseaux de tête de bassin**. Bien que représentant plus de **70% du linéaire national** et jouant un rôle **stratégique** pour l'approvisionnement en **eau potable** et **déterminants** pour le **bon fonctionnement des écosystèmes avals**, ces écosystèmes sont étonnamment **sous étudiés**, car souvent considéré (à tort) comme préservés en particulier lorsqu'ils drainent des BV forestiers et/ou au relief accusé. Quand les ruisseaux drainant des têtes de bassins versants sont situés en **amont** de toute **perturbation anthropique directe**, ils présentent alors des caractéristiques naturelles physico-chimiques (oligotrophes) et biologiques (communautés adaptées, espèces devenant rares) qui les rendent particulièrement **sensibles aux pressions anthropiques**. Ainsi les **modifications de minéralisation** ainsi que l'apport de certains éléments (**ferrocyanures**) résultant de l'épandage de fondants routiers, pourraient potentiellement engendrer d'importantes **altérations** dans la **physiologie** et le **comportement** de **macroinvertébrés** benthique, **modifier la composition et la structure des communauté** d'invertébrés benthique et par voie de conséquence **altérer** les

² Sétra 2011; *L'impact des fondants routiers sur l'environnement. Note d'information du Sétra - Série Economie Environnement Conception n°94, 25p*

³ *Composition moyenne des sels de voirie les plus utilisés dans le grand Est de la France (en %/1 kg sels secs) : Na⁺ (37%), Cl⁻ (56%), Ca²⁺ (0.4%), SO₄²⁻ (0.8%), Mg²⁺ (<0.1%), K⁺ (<0.1%) et insolubles caractérisés par des silicates (4.5), carbonates (0.25), et sulfates (0.25) (LRPC Nancy-CETE Est).*

⁴ *Substances caractéristiques émises par le domaine routier : polluants gazeux, éléments traces métalliques (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn); hydrocarbures aromatiques polycycliques (d'après Pagotto, 1999).*

capacités des organismes (macroinvertébrés, hyphomycètes) à assurer un **processus fonctionnel** (décomposition/dégradation de litières de feuille) essentiel au bon fonctionnement écologique de ces écosystèmes qui de fait ne répondraient plus au critère de bon état écologique imposé par la DCE.

II. RAPPEL DES OBJECTIFS GENERAUX

L'objectif de cette étude préliminaire était d'évaluer et comprendre les impacts liés à l'épandage des fondants routier. Pour cela et en nous focalisant sur les cours d'eau de tête de bassin versant, nous avons articulé notre proposition de recherche en deux actions:

- Réaliser une étude bibliographique et une analyse des données existantes pour caractériser la pression issue des pratiques d'épandage de fondants routiers sur le bassin Rhin-Meuse mais également réaliser un état de l'art sur les effets de cette contamination
- Caractériser l'impact écotoxicologique et écologique des fondants routier (NaCl et/ou ferrocyanures) sur la physiologie et le comportement de macroinvertébrés benthiques de tête de bassin versant ainsi que sur le fonctionnement des écosystèmes de tête de bassin versant.

Ces actions permettront de préciser les effets écotoxiques et fonctionnels des fondants routier sur les ruisseaux de tête de bassin versant, ce qui constitue une première étape indispensable.

Note: L'ensemble des travaux s'est inscrit dans le cadre du stage de Master (6 mois) de Sokhna Dieng Ndiaye encadré au sein du laboratoire par V. Felten et F. Guérol.

III. MISE EN PLACE D'UN COMITE DE PILOTAGE

Afin de répondre au mieux aux attentes et questionnements de chaque acteur, ce projet a été suivi par un comité de pilotage réunissant différents utilisateurs, gestionnaires et chercheurs concernées par la problématique des fondants routiers. Il est composé des personnes suivantes :

- **DURICKOVIC Ivana**, chargé de recherche, équipe Infrastructure Climat Environnement du laboratoire régional des ponts et chaussées de Nancy, CETE de l'Est
- **JACQUOT Ethel**, Chargée d'études viabilité hivernale, équipe Infrastructure Climat Environnement du laboratoire régional des ponts et chaussées de Nancy, CETE de l'Est
- **SUAIRE Rémi**, Doctorant, équipe Infrastructure Climat Environnement du laboratoire régional des ponts et chaussées de Nancy, CETE de l'Est
- **MOUTTON Mathieu**, Chargé d'étude, Infrastructure Climat Environnement du laboratoire régional des ponts et chaussées de Nancy, CETE de l'Est
- **POISSONNIER Stéphanie**, Chargée d'étude Viabilité Hivernale, CEREMA
- **GUILLIN Stéphane**, Responsable de l'équipe Viabilité Hivernale, CEREMA
- **MONTARGES-PELLETIER Emmanuelle**, membre du comité de direction de la Zone Atelier Moselle, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), Université de Lorraine
- **LAUSECKER Pierre-Olivier**, chargé d'études, Direction des Politiques d'Interventions (DPI) Agence de l'eau Rhin-Meuse
- **JACQUIN Thierry**, Direction Territoriale Meuse-Moselle Amont, Direction des Aides et de l'Action Territoriale (D2AT), Agence de l'eau Rhin- Meuse
- **GOETGHEBEUR Philippe**, Direction des Politiques d'Interventions (DPI), Agence de l'eau Rhin- Meuse
- **POSZWA Anne**, Maître de Conférences, Université de Lorraine, LIEC - UMR CNRS 7360

- **GUEROLD François**, Professeur, Université de Lorraine, LIEC UMR CNRS 7360
- **FELTEN Vincent**, Maître de Conférences, Université de Lorraine, LIEC - UMR CNRS 7360

IV. SYNTHESE OPERATIONNELLE

Cette partie a pour objectif de synthétiser l'ensemble des résultats obtenus, par question dans un premier temps, puis plus globalement afin de fournir les réponses attendues par les gestionnaires routiers et environnementaux. Cette synthèse s'accompagne enfin d'un paragraphe décrivant les perspectives envisagées entre le LIEC et l'agence de l'eau Rhin-Meuse sur la problématique élargie des impacts des pressions anthropiques s'appliquant sur les milieux aquatiques et humides de tête de bassin versant.

IV.1. Question 1 : Impacts des fondants routiers sur la physiologie et le comportement de *G. fossarum*

L'essentiel: Aux teneurs testées sur *G. fossarum*, les effets à court terme sont modérés : les organismes rencontrent un stress mais ils parviennent à s'acclimater.

L'étude des effets des fondants à routier à court terme en nous basant sur des accroissement de salinité environnementalement réalistes dans le bassin Rhin-Meuse, sur l'espèce modèle *G. fossarum*, sur l'écosystème modèle tête de bassin versant forestier déminéralisé a permis de produire les résultats synthétisés dans le tableau I.

Tableau I : Synthèse des résultats de la question 1 portant sur les effets physio-comportementaux des fondant routiers. Les flèches vers le haut et vers le bas indiquent respectivement des accroissements et des diminutions significatives avec la variable mentionnée.

	Accroissement de salinité	Temps d'exposition croissant
Taux de survie	pas d'effet	↓
Osmolalité	↑	↓
Ventilation	↓	↓
Locomotion	pas d'effet	↑
Taux d'alimentation	pas d'effet	↑

Durant les 168h d'exposition, aucun effet des fondants routiers n'a pu être mis en évidence sur *G. fossarum*, même dans une eau fortement déminéralisée assurant la plus forte augmentation relative de salinité.

Toutefois, les fondants routiers, en accroissant les $[Cl^-]$ et $[Na^+]$ dans l'eau, provoquent à court terme des perturbations de l'ionorégulation et de l'osmorégulation en accroissant, après 24h d'exposition, les $[Na^+]$, $[Cl^-]$ et de l'osmolalité hémolympatique de *G. fossarum*. Toutefois après 96 et 168h d'exposition les $[Na^+]$, $[Cl^-]$ et l'osmolalité de l'hémolymphe ont retrouvé les niveaux de base (« normaux »). Ces accroissements après 24h sont liés au fait que le milieu de vie de l'organisme a changé (accroissement de la salinité : Na^+ et Cl^-). Cependant, les gammars maintiennent constant leur milieu interne (hémolymphe) pour conserver les gradients nécessaires à la vie ($[Na^+]$, $[Cl^-]$ et osmolalité) : des mécanismes d'homéostasie existent pour ces variables. Si ces variables ne sont pas régulées, au bout d'un certain temps, les organismes meurent. Ainsi, le retour aux niveaux de base après 96h & 168h montrent que l'organisme s'est acclimaté aux nouvelles conditions du milieu : l'homéostasie est maintenue car des mécanismes physiologiques et

comportementaux se sont mis en place. *G. fossarum* présente cette capacité, ce qui n'est pas forcément le cas de toutes les espèces vivant en eau douce déminéralisée.

Des modifications comportementales ont également été observées avec une réduction de la ventilation après 96 et 168h d'exposition pour les organismes exposés en milieu supplémenté en fondants routiers. Toutefois aucun effet marqué n'a pu être observé sur la locomotion dans cette expérimentation.

➤ Hypothèse :

Cette réduction de ventilation est certainement associée au besoin de limiter le flux d'eau au niveau des branchies et donc de limiter la capture d'ion Na^+ et Cl^- *via* les branchies : une acclimatation comportementale qui s'accompagne très certainement de modification physiologiques plus coûteuses (réduction du nombre de transporteur d'ion au niveau des branchies, ...).

➤ Perspectives :

Quand est-il d'autres espèces qui seraient plus sensibles à la salinité ? Que se passe-t-il lorsque les stress salins sont répétés dans le temps (modifications physiologiques coûteuses en énergie pour maintenir l'homéostasie, environnement trop variable, ...) ?

IV.2. Question 2: Impacts des fondants routiers sur la croissance et l'alimentation de *G. fossarum*

Le tableau II résume les résultats produits lors de l'étude des effets des fondants routiers à moyen terme. Comme préalablement, nous nous étions basés sur des accroissements de salinité environnementalement réaliste dans le bassin Rhin-Meuse, sur l'espèce modèle *G. fossarum*, sur l'écosystème modèle tête de bassin versant forestier déminéralisé.

Tableau II : Synthèse des résultats de la question 2 portant sur les effets des fondant routiers sur la survie, la croissance et le taux d'alimentation de *G. fossarum*. Les flèches vers le haut et vers le bas indiquent respectivement des accroissements et des diminutions significatives avec la variable mentionnée.

	Accroissement de salinité	Corrélation avec la salinité
Taux de survie	↑	positive
Croissance en taille	pas d'effet	négative
Croissance en masse	pas d'effet	pas de relation
Taux d'alimentation	pas d'effet	positive

Les réponses à moyen terme sont plus marquées et ont permis de mettre en évidence que plus la salinité liée aux fondants routiers est forte, plus le taux de survie est fort, plus la croissance en taille est faible et plus le taux d'alimentation tend à être élevé.

- Hypothèse : L'effet « favorisant » de l'accroissement de salinité dans ces milieux déminéralisés semble mettre en exergue l'existence de fortes limitations qui conditionne la vie et le développement de *G. fossarum* (Ca^{2+} , P, acide gras essentiels). Cependant la levée de cette limitation peut avantager l'espèce étudiée au détriment des autres.
- Perspectives : Nous pouvons nous demander ce qu'il en est pour d'autres espèces, quels sont les effets sur les communautés (si la survie de *G. fossarum* est augmentée, il deviendra plus compétitif et pourra occasionner une déstructuration des communautés) ? et *in fine* quels en sont les conséquences pour le fonctionnement des écosystèmes (dégradation des litières de feuille, productivité, ...) ?

IV.3. Question 3: Impacts des fondants routiers sur le fonctionnement des écosystèmes de tête de bassin et plus particulièrement sur l'activité microbienne

Le tableau III résume les résultats produits lors de l'étude des effets des fondants sur des processus fonctionnels liés aux microorganismes impliqués dans les processus de décompositions des litières de feuilles (décomposition : perte de masse ; production de FPOM), processus majeurs des écosystèmes lotiques de tête de bassin versant forestier. Comme préalablement, nous nous étions basés sur des accroissements de salinité environnementalement réalistes dans le bassin Rhin-Meuse et sur un écosystème modèle type tête de bassin versant forestier déminéralisé.

Tableau III : Synthèse des résultats de la question 3 portant sur les effets des fondant routiers sur l'activité microbienne associée aux litières de feuilles.

	Accroissement de salinité	Corrélation avec la salinité
Perte de masse	pas d'effet	pas de relation
Production de FPOM	pas d'effet	négative

Ces réponses fonctionnelles à moyen terme sont plus marquées et permettent de mettre en évidence que plus la salinité liée aux fondants routiers est forte, plus la production de FPOM par les bactéries et les champignons diminue.

- Hypothèse : Ces résultats suggèrent une modification des réponses écosystémiques, et plus particulièrement dans les flux de matière et d'énergie. Ainsi moins de FPOM (Fine particule de matière organique) seront disponibles pour l'alimentation des macroinvertébrés collecteurs.
- Perspectives : Compte tenu des résultats, nous pouvons nous interroger sur les effets que peuvent avoir les fondants routiers sur le développement des champignons et des bactéries, notamment sur la composition la structure et la dynamique de ces communautés. Par ailleurs, dans le cadre de nos interrogations sur les flux de matière et d'énergie, nous pouvons également nous interroger quant aux effets en retour sur les organismes consommateurs de feuilles (déchiqueteurs) ou de FPOM.

IV.4. Question 4: Effets modulateurs des fondants routiers sur l'impact de l'acidification des eaux de surface

Le tableau IV résume les résultats produits suite à notre interrogation sur les effets modulateurs potentiels que pouvaient avoir les fondants routiers sur les effets d'une perturbation régionale appliquée à de nombreux écosystèmes de tête de bassin versant du massif vosgien: l'acidification des eaux de surface. Dans le cadre de cette question, nous nous sommes focalisés sur des eaux naturellement acidifiées provenant de tête de bassin versant forestier déminéralisé et nous nous sommes, une fois encore, basé sur des accroissements de salinité environnementalement réalistes dans le bassin Rhin-Meuse, sur l'espèce modèle *G. fossarum*.

Au cours de cette expérimentation, nous avons dans un premier temps confirmé que l'acidification des eaux de surface engendrait une perturbation de l'iono-/osmorégulation (réduction de l'osmolalité, des $[Na^+]$ & $[Cl^-]$ hémolymphatique), une réduction de la ventilation et de l'activité locomotrice de *G. fossarum* dans les eaux non supplémentées en fondants routiers (en cohérence

avec de précédents travaux). Par ailleurs, nous avons également pu confirmer les résultats obtenus pour la question 1 sur les effets physio-comportementaux à court terme des fondants routiers (accroissement de l'osmolalité et réduction de la ventilation avec l'accroissement de salinité). Par contre, lors de cette expérimentation, nous avons clairement mis en évidence une augmentation de l'activité locomotrice avec de l'accroissement de la salinité liée aux fondants routiers, ce qui n'avait pas été mis en évidence lors de la première expérimentation. Ces effets sont liés au fait que l'accroissement de la salinité module les effets de l'acidification modérée appliquée pendant le test (96h). Les effets de l'acidification des eaux de surface et des fondants routiers sont opposés, alors que les valeurs de pH ne sont pas modifiées par la supplémentation en fondants.

Tableau IV : Synthèse des résultats de la question 4 portant sur les effets modulateurs des fondants routiers sur les effets de l'acidification des eaux de surface.

	Acidification	Accroissement de salinité
Taux de survie	pas d'effet	pas d'effet
Osmolalité	↓	↑
Ventilation	↑	↓
Locomotion	↓	↑
Taux d'alimentation	pas d'effet	pas d'effet

IV.5. Intégration de la totalité des résultats obtenus

Il est à noter avant toute chose que « **les résultats obtenus consistent en une première approche se basant sur un écosystème et une espèce modèle définie dans des conditions de laboratoire** ».

Nos **résultats nous permettent de dire que**, dans nos conditions expérimentales, les **fondants routiers engendrent un certain nombre d'effets** (court & moyen terme, fonctionnel, modulateur), qui, bien que parfois modérés voire semblant être bénéfique, doivent être considérés car ils **ne sont pas anodins** :

- En effet, **à court terme**, nous avons rapporté des effets physiologiques (sur l'iono-osmorégulation), comportementaux (ventilation, locomotion), mais il s'avère que le gammare est en mesure de s'acclimater rapidement. Cette acclimatation a néanmoins un coût énergétique qu'il sera nécessaire de considérer sur des approches de plus long terme et/ou de stress répétés.
- **A moyen terme**, des effets des fondants routiers ont été rapportés sur la survie (accroissement), la croissance (réduction) et le taux d'alimentation (augmentation) de *G. fossarum*. Au niveau fonctionnel, les fondants routiers modifient la production de FPOM (réduction) et donc les flux de matière et d'énergie. Et enfin ils modulent les effets de l'acidification des eaux de surface.

Par contre, nous ne pouvons pas dire que les fondants routiers n'ont pas d'effet ou ont des effets bénéfiques.

Ils **ont des effets** mais nous ne disposons pas de suffisamment d'informations pour pouvoir statuer sur d'éventuels effets à long terme et à des niveaux d'intégration biologique élevés. En effet, les résultats obtenus ne sont pas valables pour toutes les espèces, pour tous les écosystèmes et pour tous les niveaux d'organisation biologique (individu -> écosystème). Par ailleurs, il faut savoir qu'au stress lié aux fondants routiers se surajoute à d'autres pressions (limitations, pollutions, ...) et que les interactions interspécifiques n'ont au jour d'aujourd'hui pas été considérées. Ainsi, à titre d'exemple, la favorisation d'une espèce (accroissement du taux de survie,..) peut modifier la

structure de la communauté, modifier la compétition interspécifique et *in fine*, modifier le fonctionnement des écosystèmes.

La suite du document correspond au rapport détaillé qui comprend analyse bibliographique, démarche scientifique, matériel et méthode ainsi que résultats détaillés

V. ACTION 1 - Etude bibliographique, analyse de données existantes

V.1. Caractérisation des pressions polluantes

V.1.1. Composition chimique des fondants routiers

Les fondants routiers sont composés de quatre constituants (Tableau V):

- i. Le composé chimique "principal" ou "actif" qui permet de faire fondre la pellicule de neige résiduelle sur les revêtements de la chaussée. Il en existe plusieurs types, les plus employés étant notamment le chlorure de calcium (CaCl_2), le chlorure de magnésium (MgCl_2), le chlorure de sodium (NaCl). En Europe et en France, le chlorure de sodium est le principe actif le plus utilisé; il est obtenu soit par extraction de sel gemme (par abattage de minerai) soit par cristallisation de saumure (par concentration d'eau de mer). En France, l'essentiel du sel de déneigement est extrait de la mine de Varangéville située en Lorraine; ce sel est essentiellement composé de Na^+ et Cl^- dont les fractions correspondent à 36.6 % et 56.4 % respectivement (tableau I), soit une fraction de 94 % pour le NaCl .
- ii. L'anti-mottant est constitué d'hexacyanoferrate de Na, Ca ou K qui empêche l'agglomération du fondant.
- iii. & iv. Les insolubles et les éléments traces dont la quantité et la nature varient en fonction de l'origine (extraction minière, évaporation). Les insolubles peuvent être des silicates, des carbonates, des sables ou des argiles. Les éléments traces sont quant à eux constitués d'éléments métalliques tels que notamment l'arsenic (As), le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le fer (Fe).

Constituants	Fraction
1. Solubles dans l'eau	
	%
Cl^-	56.40
SO_4^{2-}	0.86
Br^-	0.01
Na^+	36.60
Ca^{2+}	0.36
Mg^{2+}	0.02
K^+	0.009
H_2O 110 °C	0.47
$[\text{Fe}(\text{CN}_6)]\text{Na}_4, 10 \text{ H}_2\text{O}$	114 mg kg^{-1}
2. Insolubles	
	5.27 % dont
Silicates	90
Carbonates	5
Sulfates	5
3. Eléments traces	
	mg kg^{-1}
As	<0.05
Pb	<1.50
Cd	<0.20
Cr	<0.50
Cu	<1
Ni	<0.50

Tableau V : Composition chimique du sel de Varangéville (CETE de l'Est, 2014).

V.1.2. Quantités épandues à l'échelle internationale et nationale

L'Amérique du Nord, caractérisée par son vaste réseau routier estimé à 8 millions de kilomètres, est une région où les fondants routiers sont utilisés pour la maintenance hivernale des routes depuis 1950. Dans cette région des quantités importantes sont utilisées annuellement, elles sont évaluées à 14 millions de tonnes dont 4.9 millions de tonnes sont épandues uniquement au Canada (Environnement Canada, 2001).

En Europe, l'épandage de fondants routiers est devenu une pratique récurrente depuis les années 1960. En France, la quantité annuelle de fondant utilisée a augmenté au cours des 40 dernières années avec la surface du réseau routier à traiter et elle reste très marquée par le caractère aléatoire de la rigueur des différents hivers (Sétra, 2011). Sur la période de 1990 à 2010, la quantité annuelle utilisée est comprise entre 200 000 et 2 millions de tonnes, les ventes ne cessent

d'augmenter (figure 1). Mentionnons que la quantité épanchée en France est inférieure de 2 à 24 fois à celle utilisée au Canada.

Lorsqu'on considère d'une part le linéaire total du réseau routier français qui est estimé à 1 million de kilomètre et d'autre part la quantité moyenne de fondant épanchée par hiver évaluée à 750 000 tonnes, on obtient le rapport de 0.75 tonne de fondants par kilomètre de réseau routier et par hiver, tous types de réseaux et toutes zones climatiques confondues. Toutefois, dans les zones les plus exposées, il est possible d'épancher entre 10 et 80 tonnes par kilomètre carré et par hiver (SETRA, 2011).

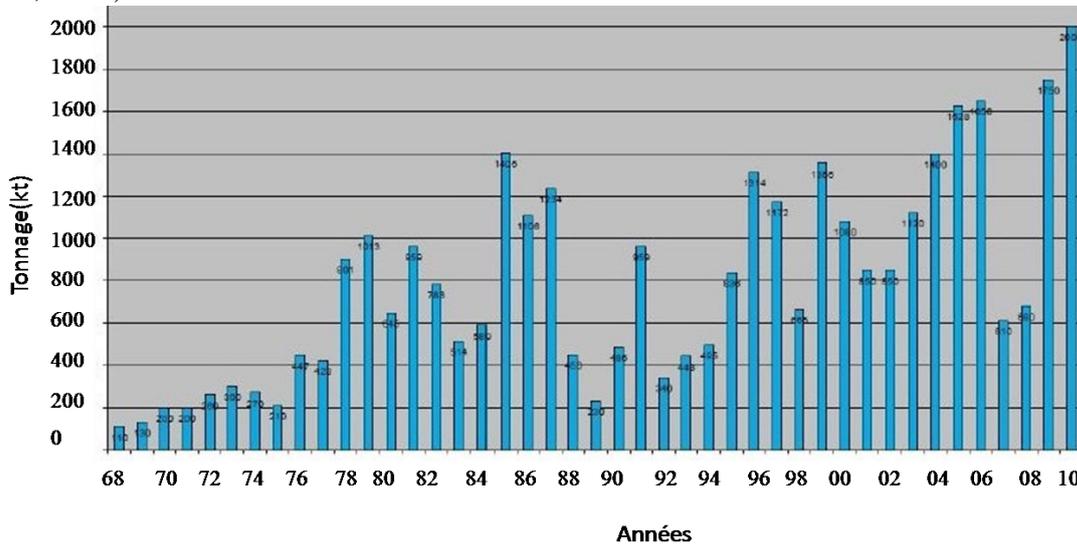


Figure 1: Estimation des ventes de fondants routiers réalisées en France de 1968 à 2010 (d'après Sétra, 2011).

V.1.3. Cycle de vie des fondants routiers et transfert dans l'environnement

Les transferts de fondants routiers dans le milieu naturel sont observés aux différentes étapes de la chaîne d'utilisation du sel notamment pendant le stockage, la reprise et l'épandage (figure 2).

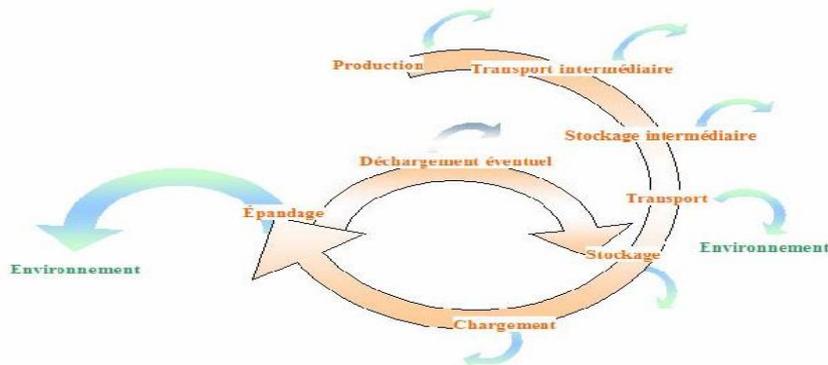


Figure 2: Cycle de vie du fondant routier (SETRA, 2011).

Ces transferts constituent des pressions polluantes sur l'environnement.

- Le stockage intermédiaire ou final des fondants se fait à même le sol. Pendant ces étapes les fondants sont dispersés dans le milieu par dissolution, infiltration ou ruissellement sans oublier l'érosion éolienne. Ainsi les pertes sur stocks sont estimées entre 5 % et 8 %.
- Pendant la reprise (le chargement et le déchargement des épanduses), les sels tombés sont lessivés.
- Pendant et après l'épandage sur les axes routiers, 20 % à 40 % des fondants peuvent atteindre le bas-côté de la chaussée par projection depuis l'épanduse ou par projection directe due au trafic. Puis ces fondants percolent dans les sols et/ou s'adsorbent sur la biomasse végétale.

Toutefois le transport sur de longues distances est une voie majoritaire de contamination et elle est principalement assurée par le ruissellement (Figure 3). En effet, lors de la fonte de la neige le fondant ruisselle gravitairement hors de la route, les ions Na^+ se lient aux colloïdes (humus) du sol tandis que les ions Cl^- ne sont pas retenus (Crowther et Hynes, 1977). Ce processus induit une pollution diffuse routière des eaux superficielles.

La contamination par les sels de voirie est caractérisée par une élévation des $[\text{Na}^+]$ et $[\text{Cl}^-]$ et elle concerne tous les compartiments environnementaux. Des travaux ont révélé que cette contamination induit une écotoxicité sur les organismes dulçaquicoles, une altération de la qualité de l'eau superficielle et de l'eau souterraine. A ceux-là s'ajoutent les impacts, rapportés, sur le sol et les écosystèmes terrestres.

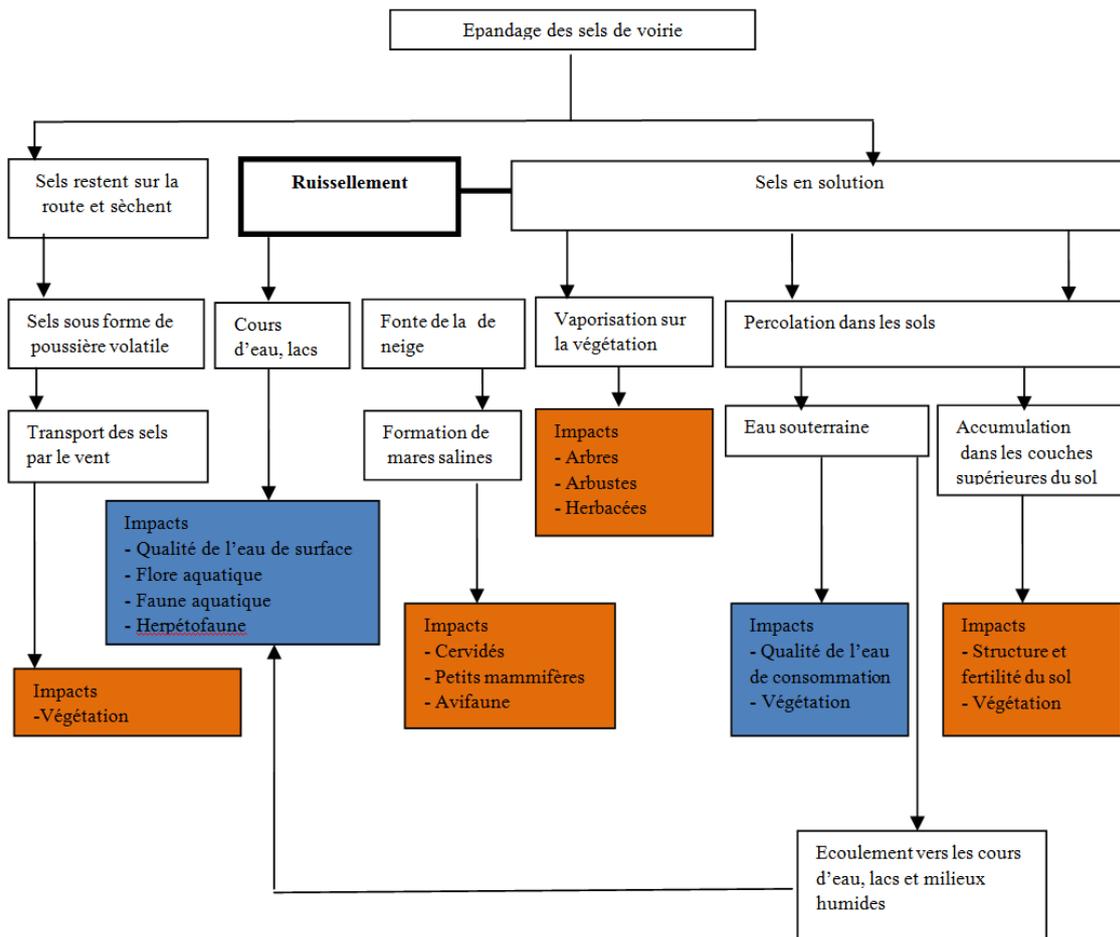


Figure 3: Flux des sels de voirie dans l'environnement et impacts associés.

V.2. Impacts sur les systèmes dulçaquicoles

V.2.1. Qualité de l'eau superficielle

V.2.1.1. A l'échelle internationale

L'essentiel des études sur l'impact du NaCl , dans les cours d'eau, quantifie la concentration de l'ion chlorure (Cl^-) et teste les effets d'une hausse de sa concentration. Ce choix est justifié par le fait qu'une directive européenne a fixé pour l'eau potable une limite de concentration égale à $250 \text{ mg Cl}^- \text{ L}^{-1}$.

Dans toutes les régions où le sel est utilisé pour la maintenance hivernale des routes, il est signalé que la concentration en Cl^- , des eaux superficielles, ne cesse d'augmenter depuis des

décennies (Kaushal et al., 2005). Dans la rivière de Mohawk (Etats-Unis), il est mis en évidence des augmentations de $[Na^+]$ et $[Cl^-]$ depuis 1990 égales à 130 et 243 % respectivement (Kaushal et al., 2005). En outre, il est mis en évidence une corrélation significative et négative entre la distance séparant la route de chaque bassin et la teneur en Cl^- de ces bassins (Lituanie) (Oskinis et Kasperovicus, 2005).

L'utilisation des fondants routiers est rapportée comme étant la principale source d'augmentation de la $[Cl^-]$ dans les cours d'eau. La première étude qui appuie cette hypothèse a montré que, en Lituanie, les cycles saisonniers de la teneur en chlorure des cours d'eau sont corrélés à ceux de l'application des sels de voirie (Oskinis et Kasperovicus, 2005). Les concentrations présentent un pic au printemps avec la fonte de la neige et un minimum en été (Kaushal et al., 2005).

D'autres travaux, qui vont dans le même sens, ont révélé que la teneur maximale en Cl^- dans certains cours d'eau en zone rurale (Etats-Unis) est égale à 100 mg L^{-1} tandis que dans les zones urbaines les concentrations sont comprises entre 250 et $5\,000 \text{ mg Cl}^- \text{ L}^{-1}$ (Kaushal et al., 2005). De plus, des augmentations de 9 % à 55 % de la salinité ont également été mises en évidence dans 30 lacs urbains du Minnesota: ces lacs sont 10 à 25 fois plus salés que des lacs équivalents en zone rurale (Kaushal et al., 2005).

V.2.1.2. A l'échelle du bassin Rhin-Meuse

Un suivi périodique de la qualité de l'eau superficielle, réalisé sur la période de 1987 à 2012 par l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse au niveau de différents points de surveillance, révèle une croissance continue et significative des teneurs en chlorure au niveau de certains affluents de la Moselle et de la Meurthe (figure 4). En effet, elles ont doublé au cours des 25 dernières années. Les concentrations en chlorure atteignent les maxima de 40.8 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} et 42 mg L^{-1} pour les affluents Cleurie, Vologne et Azerailles respectivement (Agence de l'eau, 2012), soit des accroissements des teneurs en chlorure maximales d'environ 37 mg L^{-1} . Ces pics de chlorure sont observés en hiver ce qui correspond à la période d'application des fondants routiers.

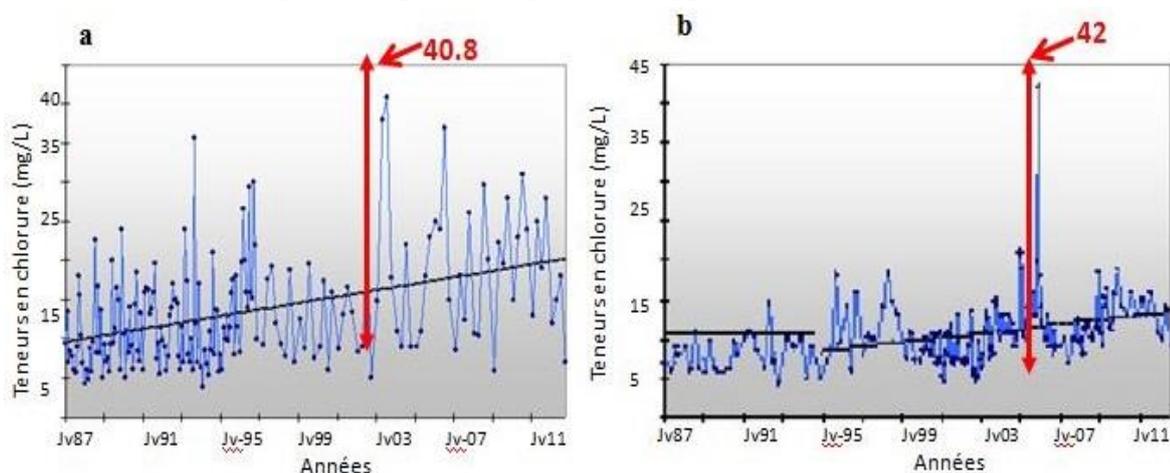


Figure 4: Evolution des teneurs en chlorure des affluents des ruisseaux de la Cleurie (a) et d'Azerailles (b) de 1987 à 2012 (modifié d'après Agence de l'eau, 2012).

IV.2.2. Qualité de l'eau souterraine

Une partie des sels épandus percole dans le sol longeant les routes et pénètre dans les nappes phréatiques *via* les précipitations et la recharge de la nappe au printemps. La quantité de sels qui atteint la nappe est fonction des caractéristiques du site, notamment la perméabilité du sol et le couvert végétal. Lorsqu'une nappe d'eau souterraine est contaminée par les sels, la gravité de la situation dépend des facteurs suivants: l'usage, le temps de séjours de l'eau dans la nappe, la superficie et le volume de l'aquifère, la profondeur de la nappe, le taux et la quantité de sel

appliqués, et le profil vertical de la distribution des ions. Mentionnons que les concentrations naturelles de chlorure de sodium dans les eaux souterraines sont relativement faibles, de l'ordre de 10 mg L^{-1} pour le chlorure et de 6 à 130 mg L^{-1} pour le sodium (Cherry, 1987).

Dans les régions de Toronto et des Trois-Rivières (Canada), des cas de contamination en chlorure ont été relevés dans les aquifères, ainsi que dans celles des Etats du Michigan (Cherry, 1987). Les conclusions de ces études attribuent cette contamination, en partie ou en totalité, à l'épandage des sels de voirie. Cependant en France, nous ne pouvons pas statuer sur le niveau de contamination des nappes phréatiques dans la mesure où nous ne disposons pas de données relatives aux teneurs en chlorure dans ces eaux souterraines.

Au niveau des sols en bord de route affectés par les sels de voiries, le NaCl est impliqué dans le transport facilité du Pb vers les eaux souterraines *via* les colloïdes. Ainsi, à une profondeur de 2.5 m, les concentrations de Pb dans les phases aqueuse et particulaire sont respectivement égales à 27 et $77 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Ces teneurs estimées dans les eaux souterraines suédoises sont supérieures, de 3 fois voire 8 fois, à la limite suédoise pour la qualité de l'eau (Norrström, 2005).

V.2.3. Impacts sur la biocénose

L'écotoxicité sur les êtres vivants dulçaquicoles peut être évaluée à différents niveaux d'organisation (individuel, communautaire et écosystémique).

V.2.3.1. A l'échelle individuelle

La salinisation peut induire des effets létaux et sublétaux chez les organismes à savoir une mortalité, une perturbation des fonctions vitales (activité métabolique, croissance, reproduction) et des déformations morphologiques.

- **Chez les micro-organismes:** dans le fleuve de Murray en Australie une augmentation de la concentration en NaCl a induit une libération des ions NH_4^+ et F^{2+} des sédiments vers l'eau due à la compétition cationique, il en résulte une augmentation du potentiel d'oxydo-réduction de l'eau. Par voie de fait il est signalé une diminution significative de la production de méthane par les archées méthanogènes qui sont des micro-organismes chimiautotrophes, anaérobies strictes et dont le métabolisme nécessite des potentiels d'oxydo-réduction très bas (Baldwin et al., 2006).

- **Chez les amphibiens:** des études réalisées dans les marécages à New York sur la survie des embryons et des larves d'*Ambystoma maculatum*, soumis au stress salin, révèlent des effets létaux. La survie des embryons et des larves exposés pendant 13 à 18 semaines durant la période de développement embryonnaire et larvaire à $145 \text{ mg Cl}^{-1} \text{ L}^{-1}$ diminuent de 3 % et 11 % respectivement (Karraker, 2007). La CL_{50} des larves de *Rana sylvatica* exposées pendant 96 h est comprise entre 2 636 et 5 109 $\text{mg Cl}^{-1} \text{ L}^{-1}$ (Sanzo et Hecnar, 2006). La même étude rapporte que la survie des embryons et des larves de *Rana sylvatica* est diminuée de 41 % et de 20 % respectivement après une exposition de 58 jours à $945 \text{ mg Cl}^{-1} \text{ L}^{-1}$; 15 % des larves présentent des malformations (œdèmes abdominaux, malformations de l'axe dorsale et axiale de la queue) (Karraker, 2007). Les larves présentant des anomalies morphologiques majeures sont vivantes mais non viables d'où une mortalité sur le long terme. Ainsi à la mortalité stricte s'ajoute le nombre de larves présentant ces anomalies pour donner la mortalité accrue (Karraker, 2007), ce qui va influencer la survie de l'espèce localement.

Le genre *Bufo* dont 2 espèces sont présentes dans les cours d'eau de Consenza (Italie) est aussi affecté. L'exposition aigue de *Bufo balearicus* à des conditions hypertoniques de salinité (20 %, 25 % et 30 %) est à l'origine de 100 % de mortalité, pour *Bufo bufo*, une mortalité totale est obtenue à 15 %. L'exposition chronique des œufs de *Bufo balearicus* et *Bufo bufo* à une salinité égale à 20 % et 5 % respectivement induit une diminution de la taille des larves (têtards) ainsi qu'un ralentissement de la métamorphose (Bernabo et al., 2013).

- Chez les autres êtres vivants

Le moustique *Aedes aegypti* est connu pour diminuer sa croissance à forte salinité, et cela pourrait être dû à une diminution du taux d'alimentation pour éviter l'ingestion d'ions à des taux plus élevés que ce qui peut être éliminé par leur système excréteur (Clark et al., 2004). La conductivité élevée peut également affecter les principaux aspects des populations d'insectes tels que la ponte, la nymphose et l'émergence (Hassell et al., 2006).

Les niveaux de base de la corticostérone de la salamandre de Jefferson (*Ambystoma jeffersonianum*) ont sensiblement augmenté en raison de l'augmentation de la conductivité, indiquant une réponse au stress qui pourrait affecter la croissance. La même étude a révélé que chez les poissons l'augmentation de la salinité induisait une réduction de l'apport alimentaire, de la croissance et du taux de respiration (Chambers, 2011).

V.2.3.2. A l'échelle des communautés

- **Chez les micro-organismes:** en Lituanie, Oskinis et Kasperovicus (2005) se sont intéressés aux effets des sels de voirie sur la diversité et l'abondance des diatomées des lacs. Leur étude portant sur 5 bassins a révélé, dans les bassins impactés par les chlorures, une faible diversité de diatomées associée à une abondance des diatomées halophiles appartenant aux genres *Achnanthes* et *Amphora*. Cette succession des communautés de diatomées induite par le Cl⁻ a également été signalée aux Etats-Unis dans 55 lacs du Minnesota qui subissent un stress chlorure depuis 1800 (Ramstack et al., 2004). Ces études suggèrent que la composition et la structure des communautés de diatomées peut être utilisée comme un marqueur de la contamination par les fondants routiers en plus de son utilisation comme outils pour la reconstitution du paléoenvironnement des lacs.

- **Chez les macroinvertébrés:** la toxicité de chlorure sur les communautés de macroinvertébrés benthiques a été à l'origine d'un indice biotique qui est corrélé significativement à la concentration en chlorure dans les rivières. Cet indice de contamination au chlorure ou CCI a été développé par des américains à la suite de l'inventaire des macroinvertébrés benthiques présents dans 23 rivières de Toronto (Canada) contaminées épisodiquement par des sels de voirie (Williams et al., 1999). Ces auteurs ont révélé un passage progressif des taxons dulçaquicoles vers des taxons euryhalins représentés dans certains cas par des espèces marines (Crowther et Hynes, 1977). Une deuxième étude toujours réalisée en Amérique du Nord, a rapporté des faits similaires dans la rivière de Genesee où la teneur en sel est comprise entre 1.14 ‰ et 3.84 ‰ (Claassen, 1926).

La rivière de la Meurthe (France) soumise au rejet de saumure est caractérisée par une modification de la structure des communautés de macroinvertébrés le long d'un gradient de salinité (Piscart et al., 2005). Le stress salin conditionne les traits bio-écologiques des communautés de macroinvertébrés. En effet, une augmentation anormalement élevée du chlorure de sodium est associée à une perte de taxons brouteurs et déchetteurs (Piscart et al., 2005). En outre, il y a une réduction des espèces ayant des capacités de dispersion limitées, une augmentation des espèces à respiration aérienne et une modification du mode de reproduction chez certaines espèces (Piscart et al., 2005).

- A l'image des micro-organismes et des macroinvertébrés, les **autres êtres vivants** sont aussi affectés par le stress salin. En effet, selon Albrecht (1954) la faune aquatique des rivières de Werra et Wippe (Allemagne) s'est appauvrie en biomasse et diversité quand la concentration de chlorure a augmenté; les teneurs sont comprises entre 7 000 mg L⁻¹ et 15 000 mg L⁻¹.

V.2.3.3. A l'échelle écosystémique

Concernant les impacts sur le fonctionnement des écosystèmes, peu d'information sont actuellement présentes dans la littérature. Des études menées sur le turnover printanier du lac Michigan, après la fonte glacière, rapportent que la teneur en Cl^- augmente avec la profondeur. En effet, elle atteint des valeurs supérieures à 400 mg L^{-1} à 15 m de profondeur (Judd et al., 2005). Cette augmentation de 90 % de la concentration a mené à une méromicité en lieu et place du mélange printanier. La méromicité se traduit par un brassage incomplet des couches d'eau, le brassage concerne uniquement les 6 premiers mètres. Par conséquent l'épilimnion s'appauvrit en nutriments tandis que l'hypolimnion devient anoxique. La même perturbation est signalée dans les lacs de Minnesota (Novotny et al., 2008).

Cette perturbation limite la production primaire. En effet, la production bactérienne est 3 fois plus importante à 9 m ($8,1 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ jour}^{-1}$) ($6,7$ à $10,4 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ jour}^{-1}$) comparée à 2 m ($3,1 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ jour}^{-1}$) ($2,1$ à $5,3 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ jour}^{-1}$) en plus la production phytoplanctonique totale est réduite d'un facteur de 3. Cette perturbation induit également une modification dans la structure des communautés phytoplanctoniques, zooplanctoniques et benthiques. En effet, la biomasse phytoplanctonique est dominée par le genre *Asterionella* souvent associé à une augmentation de Cl^- anthropique tandis qu'une réduction notable des diatomées et des cyanobactéries du genre *Oscillatoria* est observée. Parallèlement, le zooplancton et notamment les daphnies sont affectées en retour par l'anoxie ce qui empêche leur migration verticale et les expose à la prédation par les poissons. D'autres espèces de zooplancton à l'image de la Daphnie, sont également moins représentées au profit du genre *Bosmina* favorisé par sa petite taille. Quant à la communauté benthique, elle est aussi déstructurée avec une réduction de la diversité et de l'abondance des invertébrés benthiques (Judd et al., 2005). L'équilibre trophique de cet écosystème lacustre est ainsi perturbé par les fondants routiers.

V.3. Impacts sur les sols

Les concentrations de sel sont généralement plus élevées à la surface du sol et diminuent avec la profondeur. Les ions chlorure et sodium migrent à des vitesses différentielles. Le sodium, chargé positivement, a tendance à rester dans le sol tandis que les chlorures chargés négativement, tout comme les colloïdes, voyagent librement avec l'eau de percolation (Cherry, 1987).

V.3.1. Effets sur les caractéristiques physico-chimiques du sol

Les sels de déneigement peuvent augmenter la mobilité des colloïdes organiques il en résulte un appauvrissement du sol en matière organique et une altération de la structure du sol (Bäckström et al., 2004). Les mêmes études ont fait état d'une perturbation du cycle de l'azote des sols contaminés par ces sels. En effet, le complexe argilo-humique qui constitue le site de fixation de l'ammonium (NH_4^+) (azote minérale) est saturé par les ions Na^+ d'où une mobilisation de l'ammonium. Ainsi dans des sols contaminés par les sels de déneigement, la fraction d'ammonium est significativement inférieure à celle des sols témoins. Ces auteurs ont suggéré que l'application épisodique des sels de voirie pourrait, par voie de fait, contrôler l'abondance des microorganismes impliqués dans le cycle de l'azote.

V.3.2. Effets sur la remobilisation de métaux lourds et autres polluants

La concentration maximale en Cl^- dans les sols de la Lituanie, est retrouvée à proximité des routes ($3\ 120 \text{ mg L}^{-1}$ entre 0 et 1 m de la route) (Oskinis et Kasperovicus, 2005). Au niveau des sols de bord de route, il est également rapporté une augmentation hivernale de la teneur en Cd, Zn, Cu et Pb (Bäckström et al., 2004; Norrström, 2005). Ces résultats sont appuyés par des travaux sur les bassins d'infiltration au Pays-Bas et en Suède qui signalent que les concentrations hivernales en Zn, Cu, Ni et Cd en sortie de bassin d'assainissement sont supérieures à celles mesurées en entrée (Tromp et al., 2012). De tels faits sont attribués à des processus d'échange ionique. En effet, les ions Na^+ saturer les sites d'adsorption du Cd qui est ainsi remobilisé. Quant au Zn, il est libéré au travers d'un mécanisme d'échange ionique avec les cations Ca^{2+} et les protons (Bäckström et al.,

2004). Par opposition aux autres ions, le Pb est moins mobilisé, ce qui est confirmée par l'analyse du lixivat des colonnes de sol, leur mobilisation concerne entre 0.15 % et 0.66 % de leur quantité initiale (Norrström, 2005). Ces résultats suggèrent que le degré de mobilité des métaux est variable d'un métal à l'autre. Cependant même si certains métaux sont faiblement mobilisés en situation "saline", il est important de noter que la plupart des métaux sont toxiques à des concentrations faibles de l'ordre du microgramme par litre.

En ce qui concerne les polluants organiques notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), ils semblent être moins mobilisés que les métaux lourds. En effet, 90 à 95 % de la quantité de HAP présente dans les bassins d'infiltration n'est pas mobilisé à la suite de l'arrivée des eaux de ruissellement hivernales (Tromp et al., 2012).

V.4. Limites des études réalisées

Même si ces travaux ont mis en évidence des effets néfastes associés à l'utilisation des fondants, ils ne permettent pas de conclure clairement car certains d'entre eux ont été réalisés selon des protocoles expérimentaux présentant des faiblesses. En effet, dans la plupart de ces études réalisées au laboratoire, les milieux d'exposition sont obtenus par dissolution de sels de voirie dans des eaux synthétiques de composition chimique différente de celle de l'eau de site non contaminée. C'est le cas des travaux de Sanzo et Hecnar (2006) et Karraker (2007).

Outre les milieux expérimentaux irréalistes, une autre faiblesse réside dans le fait que des processus physiologiques sont passés sous silence. En effet, certaines études ont mis en exergue une altération de l'osmorégulation induite par le stress salin (Karraker et Gibbs, 2011) mais aucune d'elle n'a véritablement expliqué le mécanisme qui est à la base. Notre approche permettra de combler cette lacune à travers l'étude de l'iono-osmorégulation.

Même si des études ont révélé des effets délétères des fondants sur la biocénose la majorité d'entre elles a porté sur les amphibiens d'eau douce qui sont en déclin, ces études n'ont pas évalué la capacité des organismes à assurer leur rôle fonctionnel. Hors il s'agit d'un critère essentiel pour le bon fonctionnement écologique de l'écosystème. C'est ainsi que nous avons jugé nécessaire d'intégrer une approche fonctionnelle afin d'aiguiller la communauté scientifique sur les impacts possibles du stress salin sur le fonctionnement de l'écosystème. Afin d'atteindre nos objectifs d'étude, nous avons réalisé des expériences au laboratoire sur *Gammarus fossarum*.

V.5. Références bibliographiques

- Agence de l'eau (2012) Evolution des teneurs en chlorure dans les bassins amont de cour d'eau. Metz, France
- Albrecht M (1954) Die Wirkung der Kaliabwasser auf die Fauna der Werra und Wipper. Z Nat Forsch C Biosci 3: 401-426
- Bäckström M, Karlsson S, Bäckman L, Folkesson L, Lind B (2004) Mobilisation of heavy metals by deicing salts in a roadside environment. Wat Res 38:720-732
- Baldwin D, Rees G, Mitchell A, Watson G, Williams J (2006) The short-term effects of salinization on anaerobic nutrient cycling and microbial community structure in sediment from a freshwater wetland. Wetlands 26 (2): 455- 464
- Bernabo I, Bonacci A, Coscarelli F, Tripepi M, Brunelli E (2013) Effects of salinity stress on *Bufo balearicus* and *Bufo bufo* tadpoles: Tolerance, morphological gill alterations and Na⁺/K⁺-ATPase localization. Aquat Toxicol 132-133: 119-133
- Chambers DL (2011) Increased conductivity affects corticosterone levels and prey consumption in larval amphibians. J Herpetol 45 (2): 219-223
- Cherry JA (1987) Groundwater occurrence and contamination in Canada. In: Healey MC, Wallace RR (éds) Canadian Aquatic Resources. Department of Fisheries and Oceans, Ottawa, p 387-426
- Claassen PW (1926) Biological studies of polluted areas in the Genessee River system. Sci Publ Freshw Biol Assoc 16:63-74

- Clark TM, Flis BJ, Remold SK (2004) Differences in the effects of salinity on larval growth and developmental programs of a freshwater and a euryhaline mosquito species (Insecta: Diptera, Culicidae). *J Exp Biol* 207: 2289-2295
- Crowther RA, Hynes HBN (1977) The effect of road deicing salt on the Drift of stream benthos. *Environ Pollut* 14: 113-126
- Environnement Canada (2001) Liste des substances d'intérêt prioritaire – rapport d'évaluation : sels de voirie. Environnement Canada-Santé Canada, Canada
- Hassell KL, Kefford BJ, Nugegoda D (2006) Sub-lethal and chronic salinity tolerances of three freshwater insects: *Cloeon sp.* and *Centroptilum sp.* (Ephemeroptera: Baetidae) and *Chironomus sp.* (Diptera: Chironomidae). *J Exp Biol* 209:4024-4032
- Judd K, Adams H, Bosch N, Kostrzewski J, Scott C, Schultz B, Wang D, Kling G (2005) A case history : Effects of mixing regime on nutrient dynamics and community structure in third sister lake, Michigan during late winter and early spring 2003. *Lake Reserv Manage* 21:316-329
- Karraker NE (2007) Are embryonic and larval green frogs (*Rana clamitans*) insensitive to road deicing salt?. *Herpetol Conserv Biol* 2 (1): 35-41
- Karraker NE, Gibbs JP (2011) Road deicing salt irreversibly disrupts osmoregulation of salamander egg clutches. *Environ Pollut* 159 :833-835
- Kaushal SS, Groffman PM, Likens GE, Belt KT, Stack WP, Kelly VR, Band LE, Fisher GT (2005) Increased salinisation of freshwater in the northeastern United States. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13517-13520
- Norrström AC (2005) Metal mobility by deicing salt from an infiltration trench for highway runoff. *Appl Geochem* 20:1907-191
- Novotny EV, Murphy D, Stefan HG (2008) Increase of urban lake salinity by road deicing salt. *Sci Total Environ* 406:131-144
- Oskinis V, Kasperovicus T (2005) Impact of road maintenance salts on water ecosystems according to diatom flora investigation. *J Environ Eng Landsc* 13 (1):51-55
- Piscart C, Moreteau JC, Beisel JN (2005) Biodiversity and structure of macroinvertebrate communities along a small permanent salinity gradient (Meurthe river, France). *Hydrobiologia* 551 (1):227-236
- Ramstack JM, Fritz S C, Engstrom DR (2004) Twentieth century water quality trends in minnesota lakes compared with presettlement variability. *Can J Fish Aquat Sci* 61 : 561-576
- Sanzo D, Hecnar SJ (2006) Effects of road de-icing salt (NaCl) on larval wood frogs (*Rana sylvatica*). *Environ Pollut* 140: 247-256
- Sétra (2011) L'impact des fondants routiers sur l'environnement : état des connaissances et pistes d'action. Paris, France, 25 p
- Tromp K, Lima AT, Barendregt A, Verhoeven JT (2012) Retention of heavy metals and poly-aromatic hydrocarbons from road water in a constructed wetland and the effect of deicing. *J Hazard Mater* 203-204: 290-298
- Williams DD, Williams NE, Cao Y (1999) Road salt contamination of groundwater in a major metropolitan area and development of a biological index to monitor its impact. *Wat Res* 34 (1):127-138

VI. ACTION 2 - Effet physio-comportementaux et fonctionnels

VI.1. Généralités

Afin d'obtenir rapidement des réponses pertinentes pour répondre aux préoccupations de l'agence de l'eau relatifs aux effets des fondants routiers, nous avons fait le choix de nous concentrer sur une double approche, l'une physio-comportementale et l'autre fonctionnelle (cf. ci-dessous). Ainsi les effets potentiels de fondants routiers ont été appréhendés *via* des expositions en laboratoire effectuées en microcosmes. Compte tenu du large champ d'inconnues relatif aux fondants routiers et leurs effets, ainsi que du nombre élevé de conditions qu'il serait possible de traiter, nous avons choisi, dans cette étude préliminaire, de répondre à plusieurs questions simples et emboîtées:

- Question 1. Les fondants routiers tels qu'ils sont épandus ont-ils un impact sur la physiologie/le comportement d'invertébrés benthiques et sur le fonctionnement des écosystèmes ? le cas échéant, quelles sont les réponses les plus sensibles ?

- Question 2. Les effets des fondants routiers sont-ils principalement liés aux [NaCl], aux [ferrocyanures] ou à la combinaison des deux ?
- Question 3. La minéralisation de l'eau à l'origine peut-elle moduler l'impact des fondants routiers ?
- Question 4. Dans le contexte de l'acidification des eaux de surface, caractéristique de nombreux ruisseaux de tête de bassin dans les Vosges, l'utilisation de fondants routiers peut-elle moduler les réponses des organismes et des écosystèmes ?

Toutefois, les résultats obtenus lors de l'expérimentation visant à répondre à la question 1 ont montré les faibles effets des fondants routiers liés aux fortes capacités d'acclimatation de l'espèce considérée aux teneurs testées. Ainsi, en accord avec Pierre Olivier Lausecker, nous avons modifié nos questionnements et de fait les expérimentations associées (modifications en gras):

- Question 1. Les fondants routiers tels qu'ils sont épandus ont-ils un impact sur la physiologie et/ou le comportement d'invertébrés benthiques ? – **Approche à court terme**
- **Question 2. Les fondants routiers tels qu'ils sont épandus ont-ils un impact sur la croissance et l'alimentation de l'amphipode *Gammarus fossarum* ? – Approche à moyen-long terme**
- **Question 3. Les fondants routiers tels qu'ils sont épandus ont-ils un impact sur le fonctionnement des écosystèmes de tête de bassin versant, et plus précisément sur l'activité microbienne ? – Approche fonctionnelle**
- Question 4. Dans le contexte de l'acidification des eaux de surface, caractéristique de nombreux ruisseaux de tête de bassin dans les Vosges, l'utilisation de fondants routiers peut-elle moduler les réponses des organismes et des écosystèmes ? – **Approche multi-stress**

Plus précisément, ces expériences ont permis d'étudier :

- les effets potentiels sur la physiologie (iono/osmoregulation), le comportement (locomotion, ventilation) et les performances des organismes à fragmenter des litières dans le cas d'espèces déchiqueteuses (taux d'alimentation, production de FPOM)
- les effets sur la décomposition microbienne, processus fonctionnel majeur dans les cours d'eau de tête de bassin versant (perte de masse de feuille: décomposition; production de FPOM).

VI.2. Matériel biologique

Compte tenu de la durée du stage demandé dans le cadre de cette étude préliminaire (6 mois), nous nous sommes principalement focalisé sur les réponses physiologiques et comportementales d'un macroinvertébré benthique, *Gammarus fossarum* (Crustacé amphipode, Figure 5). La sélection de cet amphipode s'est appuyée sur la concomitance de plusieurs critères pertinents :

- il s'agit d'un organisme ubiquiste présentant une large répartition géographique, donc la portée de nos travaux sera importante
- son abondance est généralement élevée toute l'année dans les ruisseaux de tête de bassin (contrairement à de nombreux arthropodes aquatiques ayant une vie adulte aérienne) et son échantillonnage est aisé: nous ne serons donc pas limités par la quantité d'organisme
- il est facile à identifier, à sexer, à élever et à manipuler
- les gammaridae, étant sensibles à une large gamme de polluants, sont souvent utilisés en ecotoxicologie et en écologie: les réponses étudiées sont optimisées, validées et publiées pour cet organisme
- il joue un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques de par son action sur la dégradation et la redistribution de la matière organique (alimentation sur des litières de feuilles). Il est également la proie de nombreux organismes (poissons, oiseaux, amphibiens, autres macroinvertébrés): cet organisme est un acteur clé d'un processus fonctionnel important en tête de bassin et il a une place importante dans les réseaux trophiques.



Figure 5: photographie représentant *Gammarus fossarum* en précopulat. Le mâle se trouve sur la partie supérieure agrippant la femelle à l'aide de ses gnatopodes.

VI.3. Design expérimental général

Quel que soit la question traitée, les protocoles utilisés sont relativement similaires. Considérant que les réponses les plus fortes vis à vis des fondants routiers devraient être rencontrées dans des eaux oligotrophes et faiblement minéralisées (conditions les plus défavorables car les écarts de salinité sont proportionnellement les plus forts), nous nous avons utilisé ce type d'eau, issu de ruisseau de tête de bassin versant vosgien, pour réaliser les expérimentations.

Les eaux et le matériel biologique (*G. fossarum*) nécessaire pour la conduite des expérimentations ont été collectés *in situ* dans des ruisseaux de référence représentatifs de cours d'eau de tête de bassin non contaminés (Ruisseau de la Maix ou de la Meurthe). De retour au laboratoire, les eaux sont stockées à l'obscurité à 4°C et les gammarus sont acclimatés aux conditions de laboratoire. Des litières de feuille d'aulne (*Aulus glutinosa*), collectées au moment de l'abscission ont été employé comme ressource alimentaire pour *G. fossarum*. La sélection de cette essence a été effectuée en raison de sa rapidité de dégradation dans les milieux aquatiques (temps de manipulation réduit) mais également du fait qu'elle est inféodée aux milieux aquatiques.

L'analyse des données de l'agence de l'eau Rhin-Meuse sur un maillage représentatif de la diversité des têtes de bassin versant nous a permis de constater que l'accroissement maximal des teneurs en chlorures lié aux fondants routiers était d'environ 37 mg L⁻¹. Nous avons ainsi défini une gamme d'accroissement des concentrations en chlorure réaliste à laquelle nous avons réalisé les expositions aux fondants routiers (1 témoin et 4 concentrations: +0, +12.5, +25, +50 et +100 mg.L⁻¹ d'augmentation). Les milieux d'exposition ont été obtenus en ajoutant à une eau de référence (non contaminée, lieu de collecte des organismes et des litières) une quantité définie de fondant routier de sorte à obtenir les accroissements de chlorures souhaités. Les expérimentations ont été conduites au laboratoire en exposition statique (sans renouvellement). Les différents types de réponses étudiées, fonction des questionnements, sont justifiées dans le paragraphe V.4.

VI.4. Réponses individuelles et fonctionnelles étudiées

V.4.1. Réponses individuelles: physiologiques et comportementales

Pour chaque condition, nous évaluerons, chez les organismes testés, le taux de mortalité, les perturbations physiologiques (altération de l'iono/osmoregulation) et comportementales (activité locomotrice et ventilatoire, taux d'alimentation). Ces mesures ont été effectuées en suivant les méthodes employées par Felten *et al.*, 2008⁵ et Arce Funck *et al.*, 2013⁶. Ces mesures concernent la question 1 et la question 4.

⁵ **Felten V.**, Charmantier G., Mons R., Geffard A., Rouselle P., Coquery M., Garric J. & Geffard O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 83, 413-425.

⁶ Arce Funck J., Clivot H., **Felten V.**, Rouselle P., Guerold F. & Danger M., 2013. Phosphorus availability modulates the toxic effect of silver on aquatic fungi and leaf litter decomposition. *Aquatic Toxicology* 144-145, 199-207.

- **Taux de mortalité / survie**

Pour cette mesure les organismes mort ou vivant sont comptés dans chaque réplicat de chaque condition et cela aux différents temps d'exposition considérés

- **Biomarqueurs physiologiques : osmolalité, [Cl⁻] et [Na⁺] de l'hémolymphe**

Ces réponses ont été employées pour vérifier ou rejeter l'hypothèse selon laquelle les modifications des teneurs en Na⁺ et Cl⁻ dans les cours d'eau engendraient d'importantes perturbations de l'iono/osmorégulation des macroinvertébrés, et plus particulièrement des gammarés. En effet les organismes aquatiques d'eau douce présentent des concentrations internes dans leur « sang » (nommé hémolymphe) en Na⁺ et Cl⁻ (ions majeurs) hypotoniques par rapport au milieu dans lequel ils vivent. Chez les organismes dulçaquicoles, ces concentrations internes (ou hémolympatiques) sont finement et homéostatiquement régulées et correspondent à une pression osmotique ou osmolalité de l'ordre de 290-300 mOsm.kg⁻¹. Toute modification importante de la salinité des eaux peut perturber l'iono/osmorégulation de ces organismes hyper-osmorégulateur et de fait modifier d'autres aspects de leur physiologie ainsi que leur comportement dans la limite acceptable de leur capacité de régulation (Sornom *et al.*, 2012⁷), au-delà, les organismes meurent. Ainsi cette variable physiologique permet de déterminer l'état de santé d'organismes soumis à un stress résultant de la contamination par des fondants routiers. Après prise de « sang » et récupération de l'hémolymphe dans un microcapillaire, l'osmolalité est mesurée à l'aide d'un nano-osmomètre (Otago), puis après dilution dans de l'eau ultrapure les [Cl⁻] et en [Na⁺] sont mesurées par chromatographie ionique (Dionex 4500i équipé avec une colonne Ion PacAS4A) et spectrométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer Analyst 100), respectivement.

- **Biomarqueurs comportementaux: activité ventilatoire, locomotrice et taux d'alimentation**

Les réponses comportementales sont très sensibles, donnent une information sur l'état de santé des organismes tout en présentant une forte pertinence écologique. Ainsi, l'activité locomotrice traduit la capacité qu'ont les organismes à échapper à leurs prédateurs, à rechercher de la nourriture et un partenaire pour la reproduction. Ainsi tout paramètre perturbant ce paramètre pourra modifier le fitness des organismes et ainsi engendrer des effets au niveau populationnel. Cette mesure s'effectue en transférant 10 gammarés dans un cristalliseur de 80 mL contenant de un carré de maille puis, après acclimatation, le nombre d'organisme en déplacement pour chaque condition est compté toutes les 2 secondes (40 fois). L'activité ventilatoire, quant à elle, donne des indications sur l'aptitude qu'a l'organisme à ajuster et réguler certaines fonctions physiologiques (iono-osmorégulation) tandis que le taux d'alimentation apporte des informations quant à la capacité de dégradation des litières (feuille) et l'efficacité déchettrice des organismes, ce qui est un premier pas vers la réponse fonctionnelle. La ventilation est estimée comptant 3 fois de suite, sur 10 individus par condition, le nombre de battement de pléopodes (appendice ventral de l'organisme) pour 10 secondes. Le nombre de battement est ensuite rapporté à la minute. Le taux d'alimentation est estimé *via* une quantification de la perte de masse des feuilles entre le début et la fin de l'expérimentation en intégrant la perte de masse liée à l'érosion et les microorganismes (la perte de masse de feuille mises dans de l'eau uniquement, sans gammaré, est estimé).

VI.4.2. Réponses individuelles à sortie populationnelle : croissance

L'estimation de cette réponse concerne la question 2. La méthode employée est décrite dans Danger *et al.* 2013⁸). La croissance est une réponse à moyen – long terme qui présente l'avantage d'avoir

⁷ Sornom P., Felten V., Medoc V., Sroda S., Rouselle P. & Beisel J.N., 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environmental pollution* 158, 1288-1295.

⁸ Danger M., Arce Funck J., Devin S., Heberle J. & Felten V., 2013. Phosphorus content in detritus controls life-history traits of a detritivore. *Functional Ecology* 27, 807–815.

une idée des effets de certaines conditions ou substances sur le développement de l'organisme et *in fine* de définir des effets potentiels au niveau des population de l'organisme considéré. Brièvement les organismes sont triés pour avoir une taille initiale homogène puis plusieurs lots d'organismes sont isolés pour estimer leur masse sèche tandis que tous les organismes incluant l'expérimentation sont photographiés unitairement pour estimer leur taille (de la base de l'antennule au telson) à l'aide d'un logiciel d'image (Sigmascan 5). A la fin de l'expérimentation, les organismes sont tous photographiés unitairement pour estimer leur taille et donc leur croissance et taille. Ensuite les organismes sont séchés puis leur masse unitaire est évalué ce qui permet d'avoir une estimation de leur croissance en masse.

VI.4.3. Réponses écosystémiques: réponse fonctionnelle

A la fin de l'expérience relative à la question 3 (96h), des mesures de décomposition de litière de feuille (masse restante) et de production de FPOM (Fine Particulate Organic Matter) assurés uniquement par **les communautés microbiennes** (bactéries et champignon) ont été mesurées en suivant les protocoles de Cornut *et al.* 2012⁹. La mesure de perte de masse des litières et de production de FPOM par les microorganismes renseigne sur les capacités des communautés fongique et bactérienne à assurer la décomposition de la matière organique. Il s'agit là d'une étape importante du processus de dégradation de la matière organique, processus déterminant dans le fonctionnement écologique des ruisseaux de tête de bassin versant. Brièvement, après avoir été conditionnées *in situ* par des bactéries et des champignons, des lots de disque de feuilles sont isolés, sèche sur papier absorbant et pesé pour identifier la masse fraîche initiale. Les mêmes lots ont ensuite été séchés en étuve pour estimer leur masse sèche initiale et réalisé une relation allométrique entre masse fraîche et masse sèche. Les autres feuilles, celles employées pour l'expérimentation, ont été pesées après séchage rapide sur papier absorbant puis elles ont été récupérées en fin de manipulation séchées puis pesées pour estimer la perte de masse liée aux microorganismes via l'utilisation de la relation allométrique établie. Les FPOM produits sont récupérés en fin d'expérimentation par filtration. Les filtres préalablement pesés sont pesés après expérimentation ce qui permet d'obtenir des informations quant à la production de FPOM par les bactéries et champignons.

VII.5. Protocoles, Résultats & Discussion

VII.5.1. Question 1: Impacts des fondants routiers sur la physiologie et le comportement de G. fossarum

Le design expérimental employé pour évaluer les effets à court terme des fondants routiers sur des réponses physio-comportementales de *G. fossarum* est synthétisé dans la figure 6.

⁹ Cornut J., Clivot H., Chauvet E., Elger A., Pagnout C. & **Guerold F.**, 2012. Effect of acidification on leaf litter decomposition in benthic and hyporheic zones of woodland streams. *Water Research* 46, 6430-6444.

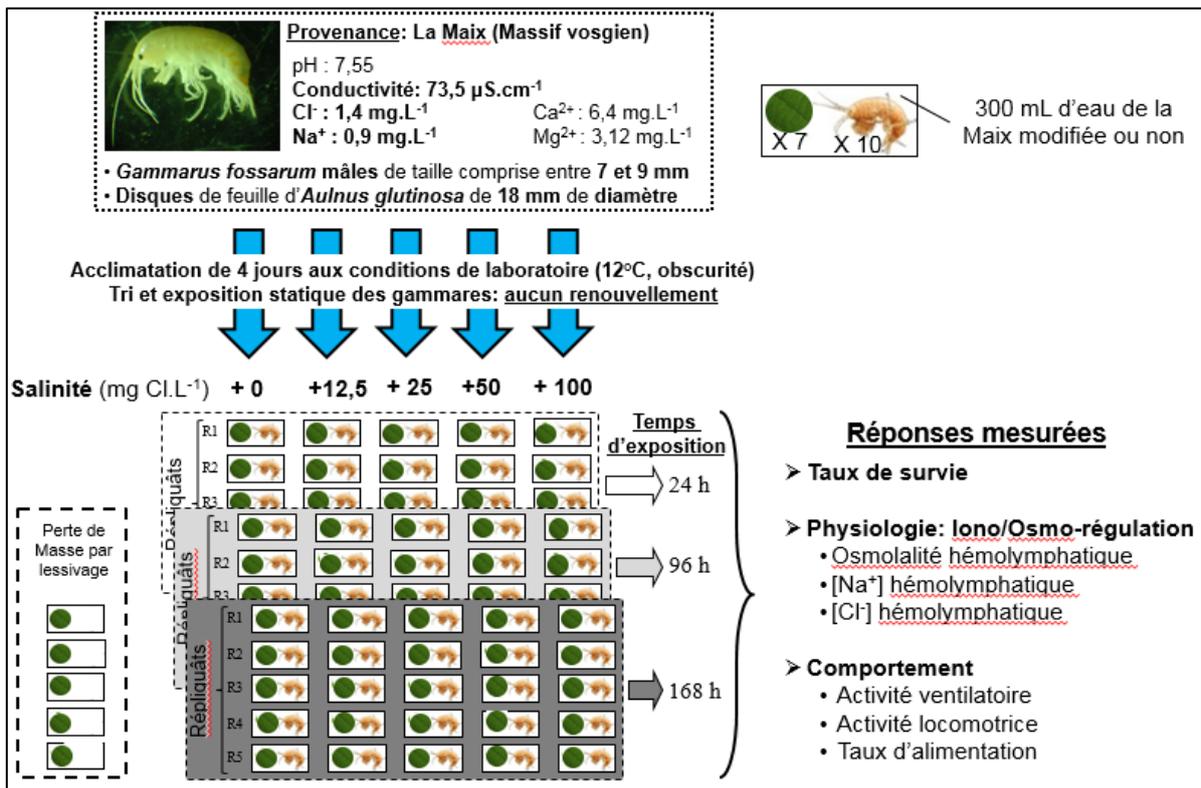


Figure 6 : Design expérimental employé pour identifier les effets physio-comportementaux des fondants routiers (question 1)

Brièvement, l'eau et les gammarus ont été récoltés dans un ruisseau de tête de bassin forestier vosgien, non acide et non contaminé, le ruisseau de La Maix, situé en amont de Vexaincourt (Longitude E: 7°04'15.8"; Latitude N: 48°28'58.3"; Altitude: 456 m). Les feuilles d'Aulnes employées pour l'expérimentation ont été collectées en automne à l'aide d'un filet sur la ripisylve du ruisseau de La Maix. Comme mentionné préalablement (cf. V.3.), les 5 accroissements de concentration sélectionnés (+0, +12.5, +25, +50 et +100 mg Cl.L⁻¹) ont été obtenus en mélangeant l'eau du ruisseau de La Maix à une quantité adéquate de fondants routiers. L'analyse physico-chimique des [Cl⁻] et [Na⁺] dans les eaux d'expositions, respectivement par chromatographie ionique et par spectrophotométrie d'absorption atomique, a révélé que les gammarus ont bien été exposés aux teneurs attendues compte tenu du peu d'écart entre les [Cl⁻] attendues et mesurées (Tableau VI). Par ailleurs, conformément à ce que nous souhaitions, le gradient d'augmentation de salinité dans les milieux d'exposition a été respecté (Figure 8).

Tableau VI : [Cl⁻] et [Na⁺] attendues et mesurées dans les eaux d'exposition.

Accroissement nominal de salinité (mg Cl.L ⁻¹)		+ 0	+ 12,5	+ 25	+ 50	+ 100
[Cl ⁻]	Attendues dans les dispositifs (mg Cl.L ⁻¹)	1,4	13,9	26,4	51,4	101,4
	Mesurées dans les dispositifs (mg.L ⁻¹)	1,4	9,2	26,9	53,3	103,9
[Na ⁺]	dispositifs (mg.L ⁻¹)	0,91	6,03	16,66	32,76	61,5

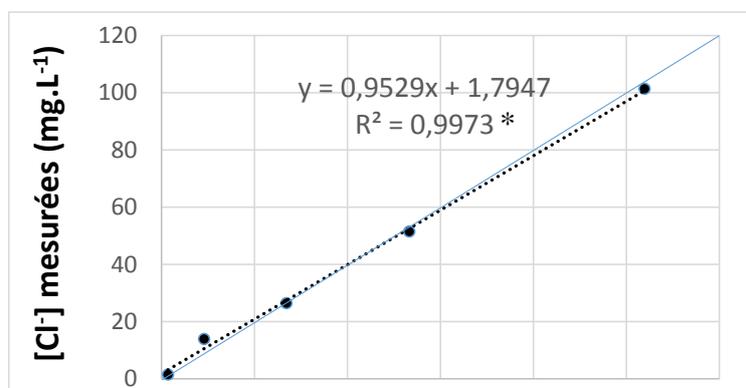


Figure 8 : Gradient de salinité des eaux d'exposition. Différence entre [Cl⁻] attendues et mesurées (Test de Pearson ; *, p<0.05)

Les mesures physio-comportementales et de survie ont été effectuées en nous basant sur un design expérimental comprenant 5 réplicas pour chacune des 5 concentrations testées, chaque unité expérimentale comprenant 10 gammares mâles (taille 7-9 mm) et 7 disques de feuilles d'aulne. Les organismes ont été exposés en enceinte thermostatée à une température de $12 \pm 1^\circ\text{C}$. Hormis pour l'estimation des taux d'alimentation, les mesures ont été effectuées après 24, 96 et 168h d'exposition.

La survie s'avère très élevée et cela même après 168h d'exposition (>95% ; figure 9). Les écarts types sont faibles montrant la répétabilité de l'étude et nous confortant ainsi sur le déroulement de l'expérimentation. La survie n'est pas impactée par les fondants routier, il existe un effet significatif du temps d'exposition (ce qui est logique : plus le temps passe plus des individus meurent) et il n'y a aucun effet interactif entre le temps et la salinité liée aux fondants routiers (transformation arcsinus(racine carrée de fréquence) ; ANOVA à 2 champs).

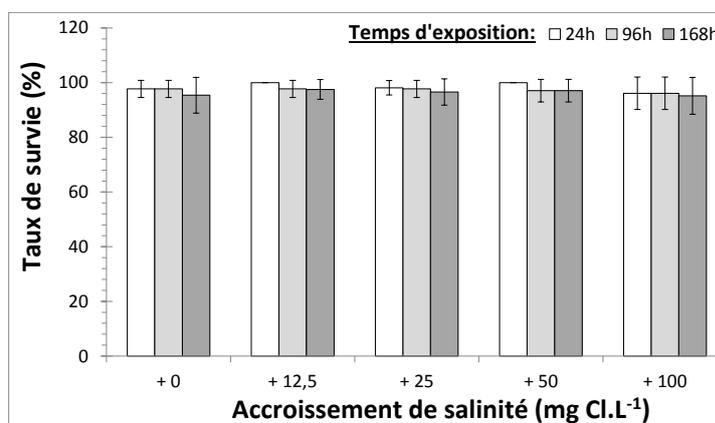


Figure 9 : Effet des fondants routier sur le taux de survie de *G. fossarum* (ANOVA à 2 champs).

L'osmolalité des gammares témoins est peu variable et est comprise entre 280 & 290 mOsm.Kg⁻¹ ce qui met en évidence la régulation homéostatique de l'osmolalité des gammares autour de la valeur de 290 mOsm.Kg⁻¹ couramment observé chez le gammare. L'osmolalité est significativement impactée par la présence de fondant routier et le temps (Figure 10 i ; ANOVA à 2 champs) : l'osmolalité augmente avec l'accroissement de salinité liée aux fondants routiers alors qu'elle diminue avec l'augmentation de la durée d'exposition (Figure 10 ii). Il existe des corrélations significatives entre l'accroissement de salinité et l'osmolalité des gammares exposé durant 24 et 96h, cette corrélation n'existe plus après 168h d'exposition (Figure 10 i ; Test de Pearson). Si aucun effet interactif n'est rapporté entre la salinité et le temps d'exposition, les effets des fondants routiers sur l'osmolalité s'atténuent avec le temps (Figure 10 ii). En fait, l'accroissement de la salinité engendre une perturbation à court terme de l'osmorégulation de l'organisme qui dépasse les valeurs « normales ». Toutefois, le gammare arrive avec le temps à retrouver ces valeurs « normales », sans mortalité associée, grâce une acclimatation physiologique. Ainsi après 96h

d'exposition, même à $+100 \text{ mg Cl.L}^{-1}$, les gammars présentent une osmolalité similaire à celle des témoins, dénotant de l'efficacité des processus homéostatiques lié à l'osmorégulation.

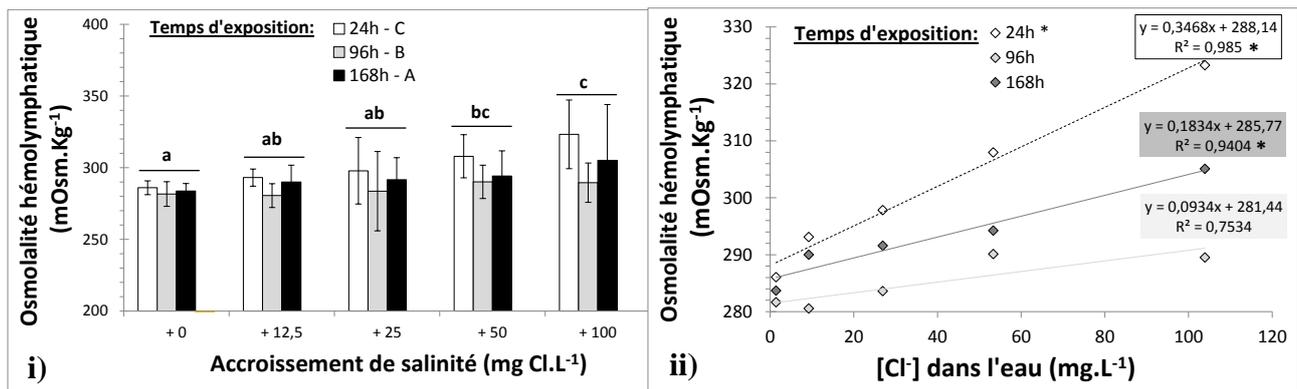


Figure 10 : Effets des fondants routiers sur l'osmolalité de *G. fossarum*. i) des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA 2 champs, $p < 0.05$): celles, minuscules, présentes au-dessus des barres d'histogramme illustrent l'effet salinité tandis que celles, majuscule après les temps d'exposition dans la légende montrent l'effet temps. ii) Des astérisques indiquent des corrélations significatives (Test de Pearson, $p < 0.05$).

Les $[\text{Cl}^-]$ et $[\text{Na}^+]$ hémolympatiques des gammars sont positivement corrélées (hautement significatif : $p < 0.001$) aux valeurs d'osmolalité hémolympatique des mêmes gammars (Figure 11).

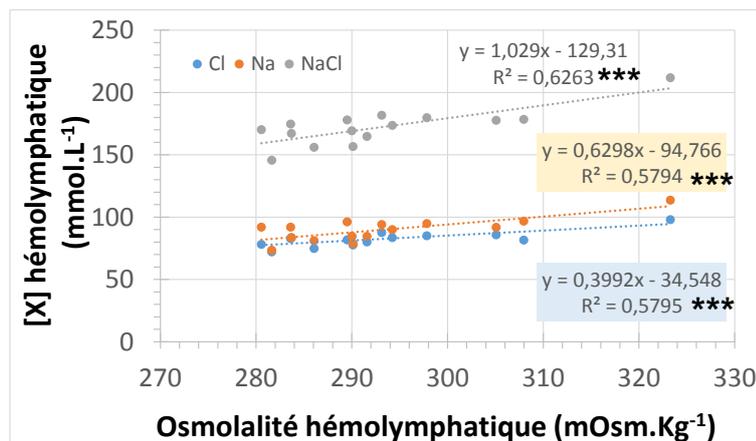


Figure 11 : Relation entre l'osmolalité et les $[\text{Cl}^-]$ et $[\text{Na}^+]$ hémolympatiques illustrant les effets des fondants routiers sur l'ionorégulation de *G. fossarum*. Les astérisques indiquent des corrélations significatives (Test de Pearson ; ***, $p < 0.05$).

Ceci est cohérent puisque l'osmolalité représente la quantité de substance osmotiquement active, à savoir la quantité de substance capable d'attirer l'eau, tel que le Cl^- et le Na^+ qui sont fortement concentrés dans l'hémolymphe et participent à près de 90% de l'osmolalité chez les crustacés (Mantel & Farmer, 1983¹⁰). Ainsi la perturbation d'osmorégulation est directement imputable à un problème d'ionorégulation. En effet, il faut savoir que tous les organismes d'eau douce présentent un milieu interne (sang, hémolymphe) hypertonique (concentré en ion) par rapport au milieu dans lequel ils vivent (Figure 12). De fait ces organismes sont confronté à des fuites passives d'ions (Na , Cl) et des entrées passives d'eau qu'il leur est crucial de compenser *via* un prélèvement actif d'ion effectué par les cellules à chlorures au niveau des branchies mais également dans le système

¹⁰ Mantel, L.H., Farmer, L.L., 1983. Osmotic and ionic regulation. The biology of Crustacea. In: Bliss, D.E., Mantel, L.H. (Eds.), Internal Anatomy and Physiological Regulation, vol. 5. Academic Press, New York, pp. 53–161.

excréteur. Le maintien de ces variables physiologiques ($[Na^+]$ et $[Cl^-]$) en dépit des conditions environnementales (et de leur variation) est indispensable pour que les organismes puissent assurer leur survie et un développement optimal. Cela permet de maintenir les gradients indispensables à la vie. Toutefois, il est à noter que ces processus d'iono/osmo-régulation **nécessitent beaucoup d'énergie**: chez le gammare ils représentent 11% du budget énergétique (Sutcliffe, 1984¹¹)

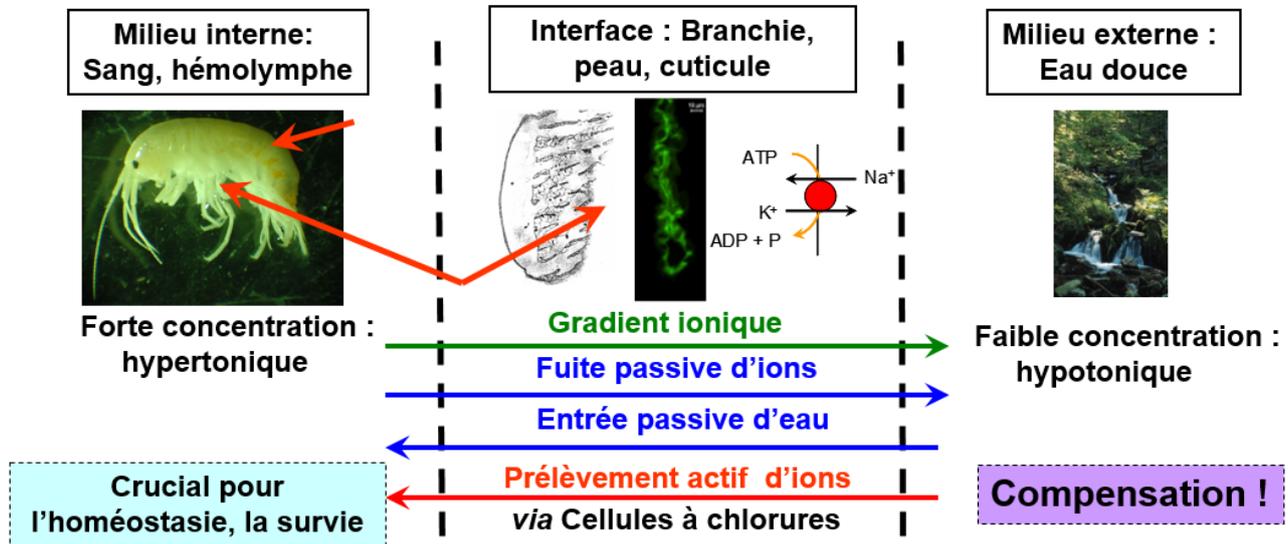
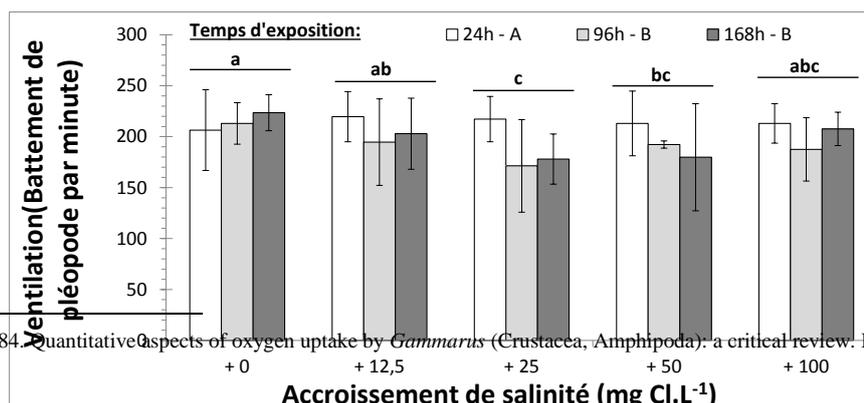


Figure 12 : Illustration schématique de l'ionorégulation des organismes d'eau douce.

Les valeurs de ventilation des gammares exposés dans l'eau non supplémentée en fondant routier (témoins, + 0 mg Cl.L⁻¹) sont similaires et normales (Figure 13) par rapport à celles rapportées dans des travaux préalables (Felten et al., 2008⁵ ; Arce Funck et al., 2013⁶). Aucun effet interactif n'est rapporté entre le temps d'exposition et la salinité. Par contre, il existe un effet significatif des fondants routiers avec une tendance à avoir une diminution de la ventilation avec l'accroissement des fondants routiers. Il existe également un effet temporel significatif avec une diminution de la ventilation avec l'accroissement des temps d'exposition : Après 24h d'exposition, elle est assez stable quelques soient les conditions de salinité tandis qu'à 96 et 168h, elle est réduite avec l'accroissement de salinité. Ces observations montrent une réduction du flux d'eau à la surface branchiale qui pourrait être un des mécanismes d'acclimation mis en place pour réduire la capture de Na et Cl au niveau branchial.



¹¹ Sutcliffe, D.W., 1984. Quantitative aspects of oxygen uptake by *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): a critical review. *Freshwater Biol.* 14, 443–489.

Figure 13 : Effets des fondants routiers sur la ventilation de *G. fossarum*. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA 2 champs, $p < 0.05$) : celles, minuscules, présentes au-dessus des barres d'histogramme illustrent l'effet salinité tandis que celles, majuscule après les temps d'exposition dans la légende montrent l'effet temps.

Les valeurs de locomotion des gammares exposés dans l'eau non supplémentée en fondant routier (témoins, + 0 mg Cl.L⁻¹) sont également similaires et normales (Figure 14) par rapport à celles rapportées dans des travaux préalables (Felten et al., 2008⁵ ; Arce Funck et al., 2013⁶). Comme préalablement, aucun effet interactif n'a été rapporté. Par contre, il existe un effet significatif des fondant routier car les organismes exposés à +12,5 mg Cl.L⁻¹ présentent une activité locomotrice significativement inférieure aux autres conditions testées. Un effet temporel est également rapporté avec une activité locomotrice significativement supérieure aux plus long temps d'exposition (96 & 168h), et plus particulièrement pour les salinités les plus fortes. Ceci pourrait être dû à un allègement de l'allocation énergétique pour la capture d'ion à la faveur d'autres fonctions telles que la locomotion.

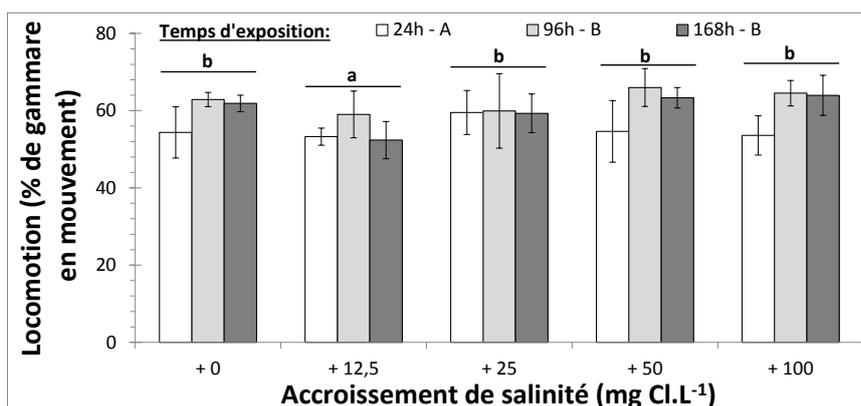


Figure 14 : Effets des fondants routiers sur la locomotion de *G. fossarum*. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA 2 champs, $p < 0.05$) : celles, minuscules, présentes au-dessus des barres d'histogramme illustrent l'effet salinité tandis que celles, majuscule après les temps d'exposition dans la légende montrent l'effet temps.

Concernant le taux d'alimentation, les valeurs des témoins sont similaires mais les résultats obtenus sont très variables (Figure 15, cf écart-types). Aucun effet interactif, ni des fondant routier ne sont observés. Par contre un effet temporel significatif est rapporté : une augmentation du taux d'alimentation avec le temps d'exposition.

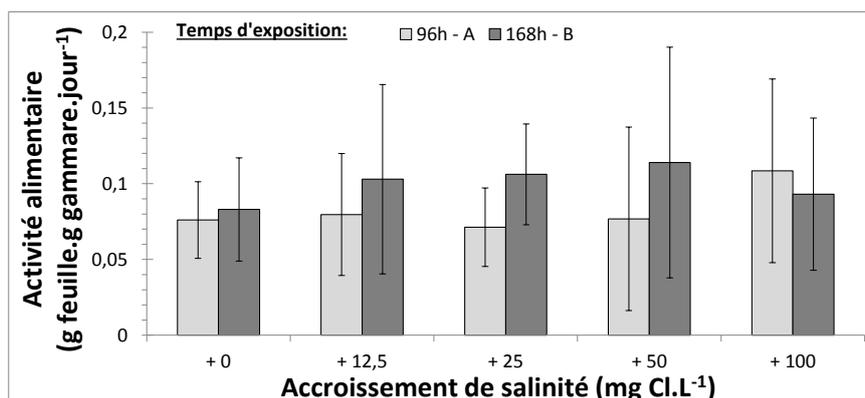


Figure 15 : Effets des fondants routiers sur le taux d'alimentation de *G. fossarum*. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA 2 champs, $p < 0.05$) : celles, minuscules, présentes au-dessus des barres d'histogramme illustrent l'effet salinité tandis que celles, majuscule après les temps d'exposition dans la légende montrent l'effet temps.

VII.5.2. Question 2: Impacts des fondants routiers sur la croissance et l'alimentation de *G. fossarum*

Le design expérimental employé pour évaluer les effets à moyen/long terme des fondants routiers sur la croissance et le taux d'alimentation de *G. fossarum* est synthétisé dans la figure 16.

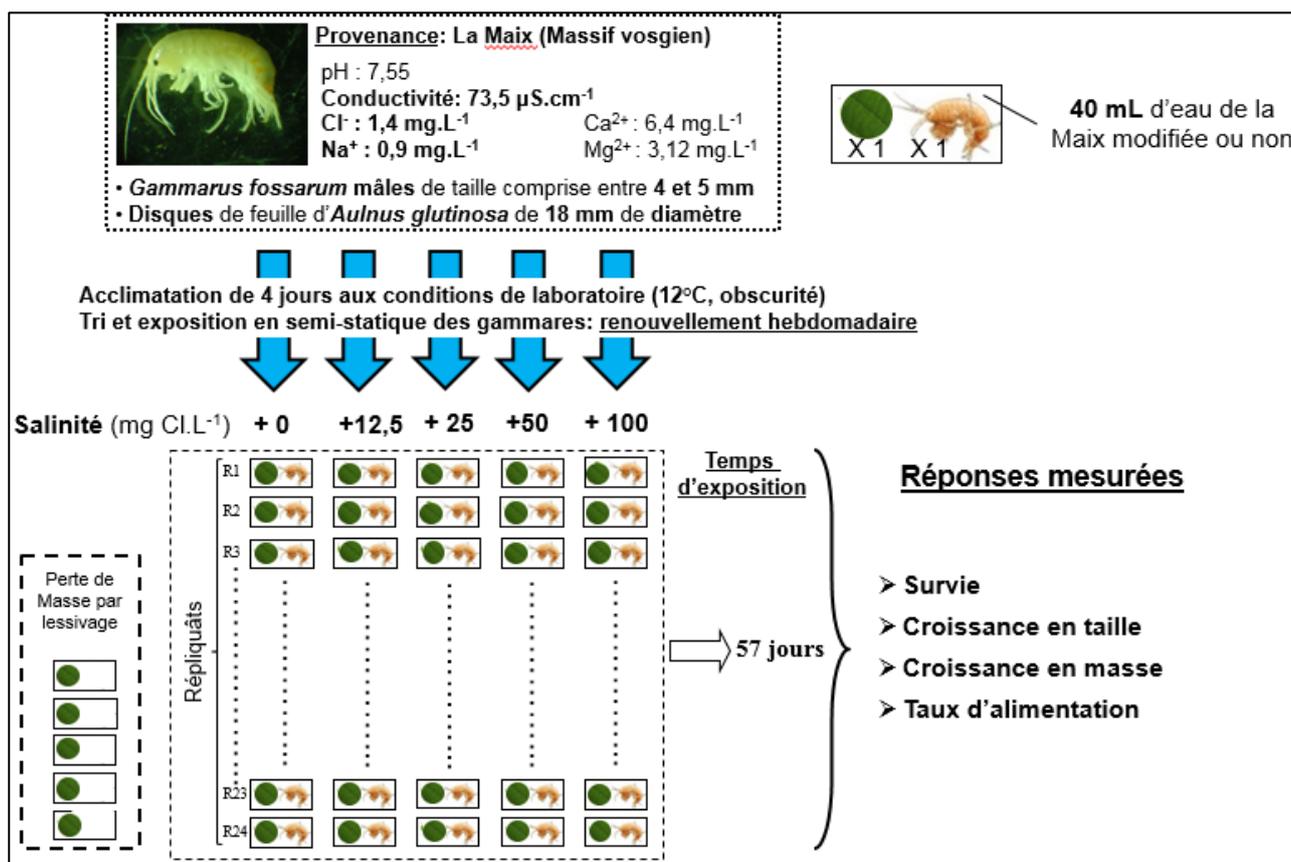


Figure 16 : Design expérimental employé pour identifier les effets des fondants routiers sur la croissance et l'alimentation de *G. fossarum* (question 2).

Brièvement, l'eau et les gammarus ont été récoltées, comme préalablement dans le ruisseau de La Maix. Les feuilles d'Aulnes employées pour l'expérimentation ont été collectées en automne à l'aide d'un filet sur la ripisylve du ruisseau de La Maix. Les 5 accroissements de concentrations sélectionnées (+0, +12.5, +25, +50 et +100 mg Cl.L⁻¹) ont été obtenus en mélangeant l'eau du ruisseau de La Maix à une quantité adéquate de fondants routiers. L'expérience a été conduite pendant 57 jours au cours desquels l'eau et les disques de feuilles ont été remplacés hebdomadairement. Les mesures de survie, de croissance (en masse et en taille) et de taux d'alimentation ont été effectuées en nous basant sur un design expérimental comprenant 24 réplicas pour chacune des 5 concentrations testées, chaque unité expérimentale comprenant 1 gammarus juvénile (taille 4-5 mm) et 1 disques de feuilles d'aulne. Les organismes ont été exposés en enceinte thermostatée à une température de $12 \pm 1^\circ\text{C}$. Hormis pour l'estimation de la survie pour laquelle des

mesures ont été effectuées tous les jours, les mesures de croissance et de taux d'alimentation ont été faites uniquement après 57 jours d'exposition.

Le taux de survie des gammars exposés dans l'eau naturelle, sans supplémentation, est significativement inférieur à celui des organismes exposés aux différentes conditions de salinités liées aux fondants routiers (Figure 17 i ; 40 % vs 62.5-75%). Par ailleurs il existe une corrélation positive significative entre la salinité et le taux de survie (Figure 17 ii) : dans les conditions du test (maximum de +100 mg Cl.L⁻¹) plus salinité est forte plus la survie est forte. Cette réponse peut être liée au fait que le type d'écosystème modèle sélectionné est naturellement limité en ces éléments : la levée de cette limitation peut avantager l'espèce étudiée. Cela est surtout visible aux faibles accroissements de salinité (+25 et +50 mg Cl.L⁻¹) puis nous observons une légère décroissance pour les accroissements supérieurs ou égal à +50 mg Cl.L⁻¹.

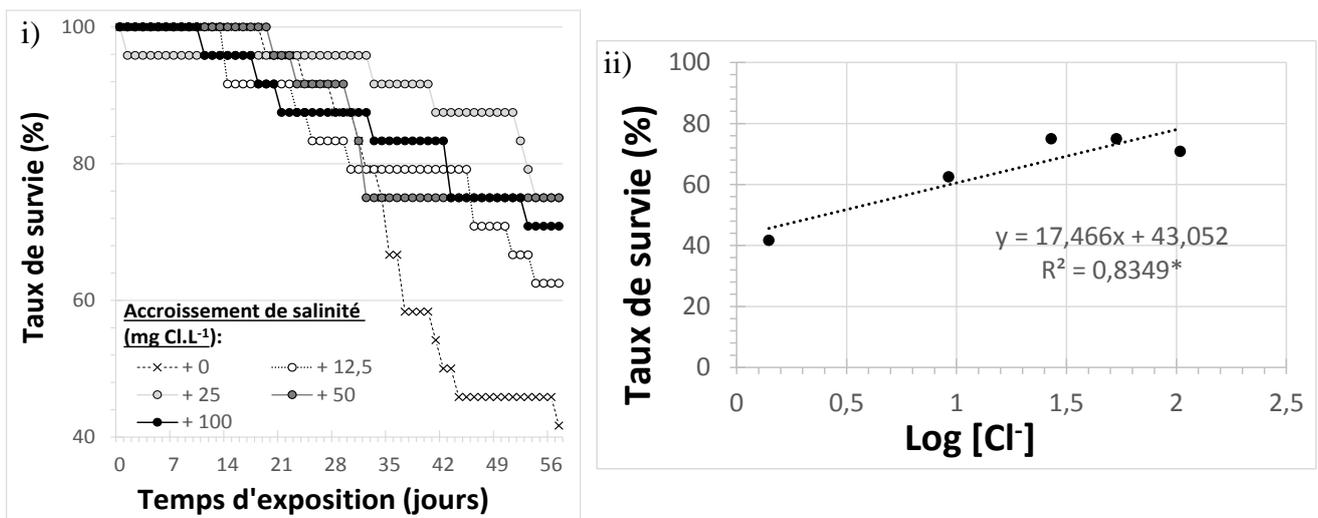


Figure 17 : Effet des fondants routiers sur la survie de gammars juvéniles durant le test de croissance. i) Evolution temporelle du taux de survie en fonction de la salinité. ii) Corrélation entre la salinité et le taux de survie (Test de Pearson ; *, $p < 0.05$).

Avant le début de l'expérimentation (T_0), la taille des gammars est similaire dans chaque groupe représentant les différentes conditions de salinité à tester (4.66 ± 0.26 mm). Les écart-type sont assez fort ce qui est normal pour ce type de réponse. Aucun effet lié au fondant routier n'est détecté (Figure 18 i) pour la croissance en taille. Toutefois, il existe une corrélation négative significative entre salinité et la croissance en taille : plus la salinité est forte (plus la quantité de fondant routiers ajoutée est forte) moins la croissance est forte (Figure 18 ii). Lorsqu'il n'y a pas d'ajout de fondant routier, il pourrait y avoir une sélection des organismes les plus adaptés/acclimatés (mortalité plus forte) et présentant une croissance plus forte. Ces observations peuvent exprimer la présence d'autres facteurs limitants (Ca^{2+} , P) pour les survivants (variabilité individuelle).

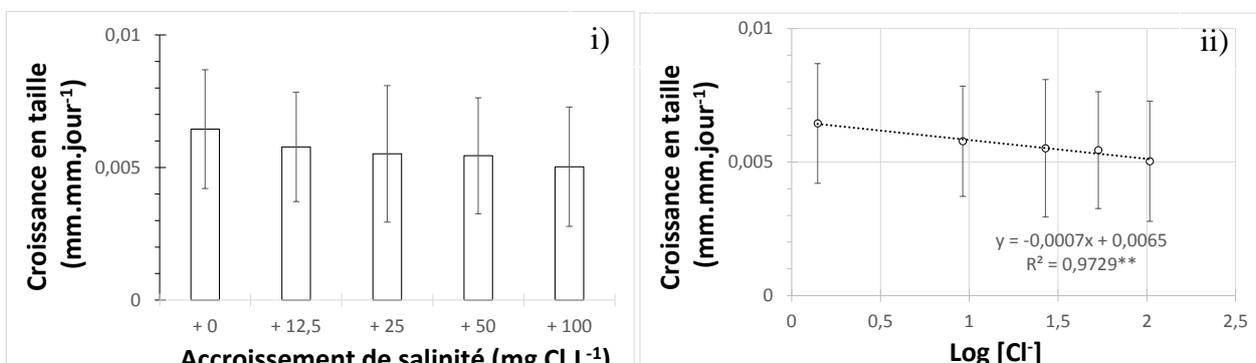


Figure 18 : i) Effet des fondants routiers sur la croissance en taille de *G. fossarum* (ANOVA 2 champs). ii) Corrélation entre la salinité et la croissance en taille (Test de Pearson ; *, $p < 0.05$).

Aucun effet des fondants routiers n'est rapporté sur la croissance en masse des gammarès (Figure 19). Les réponses de croissance en masse sont très variables (cf écart-type)

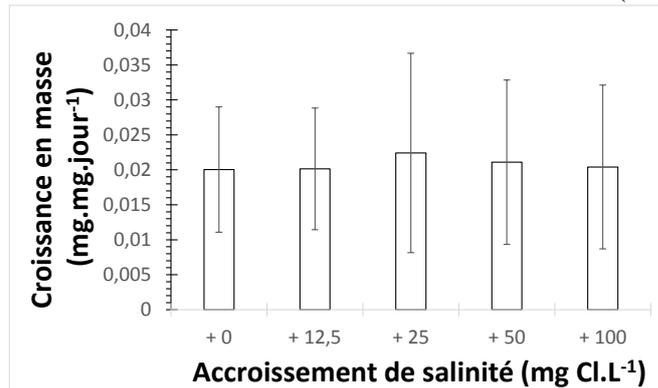


Figure 19 : Effet des fondants routiers sur la croissance en masse de *G. fossarum* (ANOVA 2 champs).

Par contre, concernant le taux d'alimentation, nous observons un effet significatif des fondants routiers : le taux d'alimentation a tendance à s'accroître avec l'accroissement de la salinité liée aux fondants routiers (Figure 20 i). D'ailleurs une corrélation positive proche de la significativité est rapportée entre la salinité et le taux d'alimentation ($p = 0.0502$; Figure 20 ii). Ceci pourrait être lié à un besoin accru d'énergie ou de certains éléments pour s'acclimater au « stress salin » lié aux fondants routiers ou croûte, ce qui peut soutenir l'hypothèse de la présence d'autres facteurs limitants (Ca^{2+} , P).

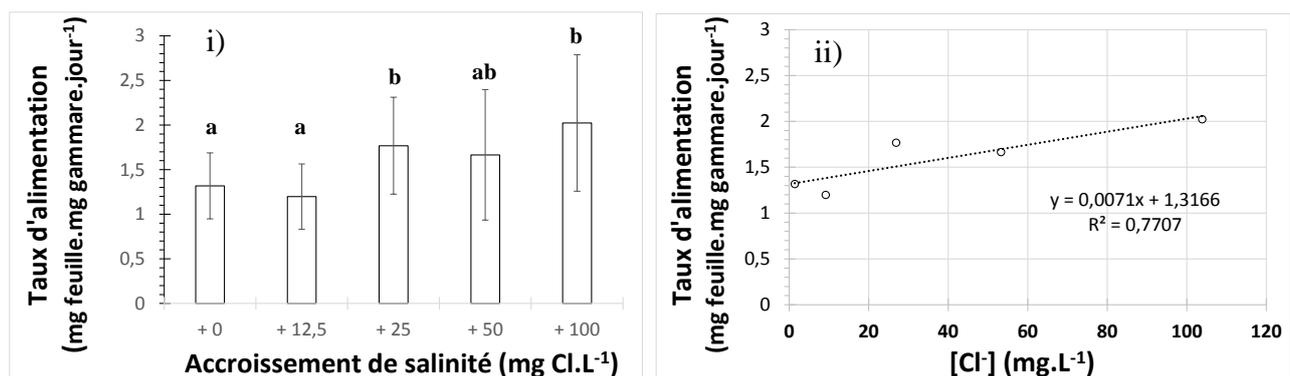


Figure 20 : i) Effet des fondants routiers sur le taux d'alimentation de *G. fossarum* (ANOVA 2 champs). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA 1 champs, $p < 0.05$). ii) Corrélation entre la salinité et le taux d'alimentation de *G. fossarum* (Test de Pearson ; *, $p < 0.05$).

VII.5.3. Question 3: Impacts des fondants routiers sur le fonctionnement des écosystèmes de tête de bassin et plus particulièrement sur l'activité microbienne

Le design expérimental employé pour évaluer les effets des fondants routiers sur le fonctionnement des écosystèmes de tête de bassin et plus particulièrement sur l'activité microbienne est synthétisé dans la figure 21.

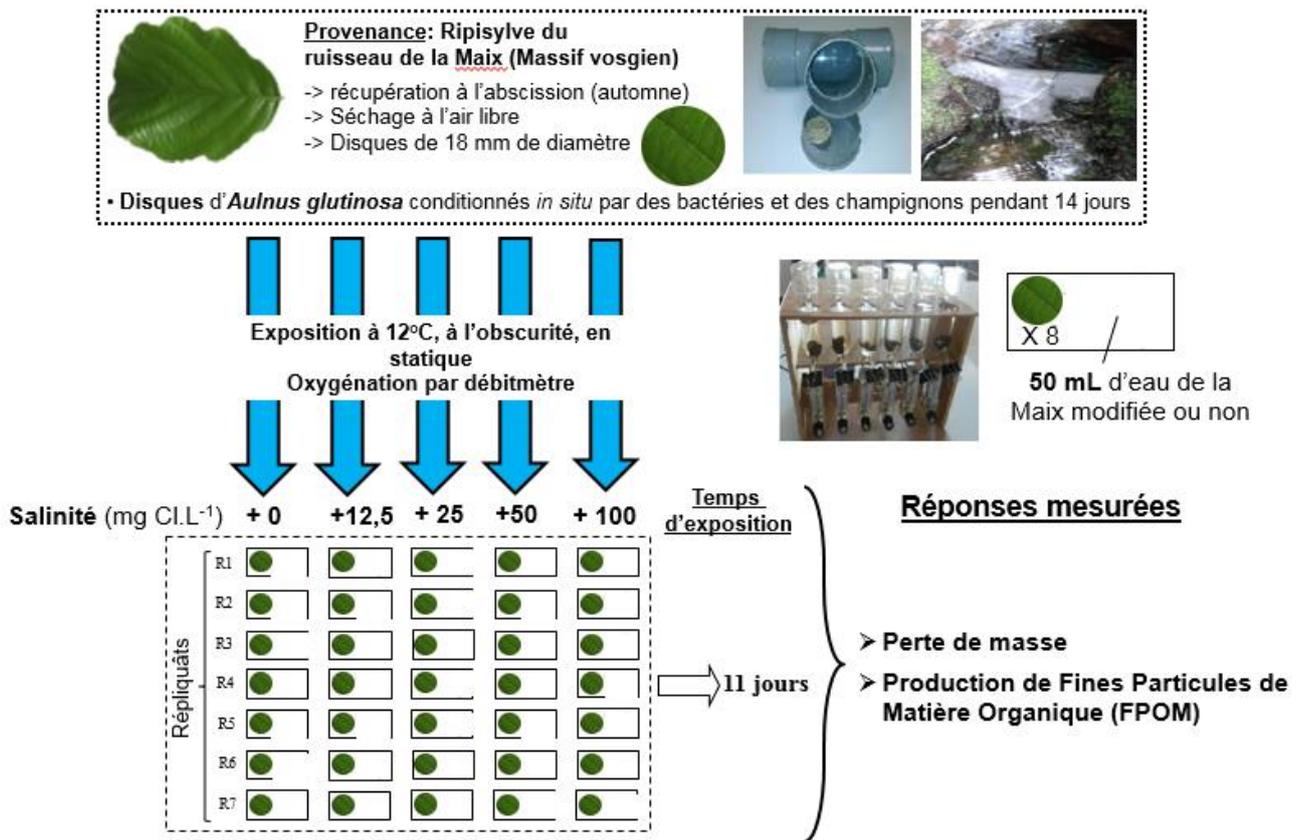


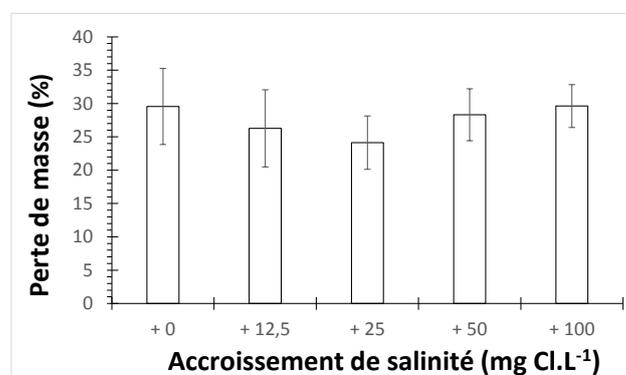
Figure 21 : Design expérimental employé pour identifier les effets des fondants routiers sur le fonctionnement des écosystèmes de tête de bassin versant et plus particulièrement sur les microorganismes (question 3).

Comme préalablement, l'eau et les gammares ont été récoltés, dans le ruisseau de La Maix et les feuilles d'Aulnes ont été collectées en automne à l'aide d'un filet sur la ripisylve de La Maix. Les 5 accroissements de concentrations sélectionnées (+0, +12.5, +25, +50 et +100 mg Cl.L⁻¹) ont été obtenus en mélangeant l'eau du ruisseau de La Maix à une quantité adéquate de fondants routiers. Après avoir été découpées en disque de 18 mm, les feuilles ont été mises à conditionner *in situ* pendant 14 jours par des bactéries et des champignons.

Pour chaque condition, 7 répliquats ont été réalisés. L'exposition a été conduite dans des microcosmes, chacun d'eux comportait 8 disques de feuille d'aune conditionnés *in situ* et 50 mL d'eau de site. Avant l'exposition des disques de feuille, chaque lot de 8 disques est séché sur un papier absorbant et pesé, ce qui a permis l'estimation de la masse fraîche initiale de chaque lot. Au total 35 microcosmes ont été déployés pour cette expérimentation qui a eu lieu en chambre froide à 12 ± 1 °C. L'oxygénation des milieux a été réalisée à l'aide d'un débitmètre, la même oxygénation est apportée à chaque microcosme créant ainsi un courant et favorisant les processus bactériofongiques.

L'expérimentation a été conduite sur 11 jours. A la fin de l'expérimentation, la mesure de la production de FPOM et de la masse restante des feuilles (décomposition) a été effectuée.

Les résultats de masse sont visibles sur des fondants routiers sur cette réponse



obtenus pour la perte de la figure 22. Aucun effet n'a été mis en évidence (ANOVA).

Figure 22 : Effet des fondants routiers sur la perte de masse des disques d'aulne (ANOVA).

La production de FPOM présente une forte variabilité ce qui est normal pour ce type de réponse. Si aucune différence significative n'est observée en réponse aux fondants routiers (ANOVA, Figure 23 i, lié aux écart-types), il existe une corrélation significative entre la production de FPOM et la [Cl⁻] : plus la salinité est forte moins la production de FPOM est forte. Cette observation suggère une modification des réponses écosystémiques (lié aux micro-organismes), plus précisément des flux de matière et potentiellement moins de FPOM disponible pour les organismes collecteurs.

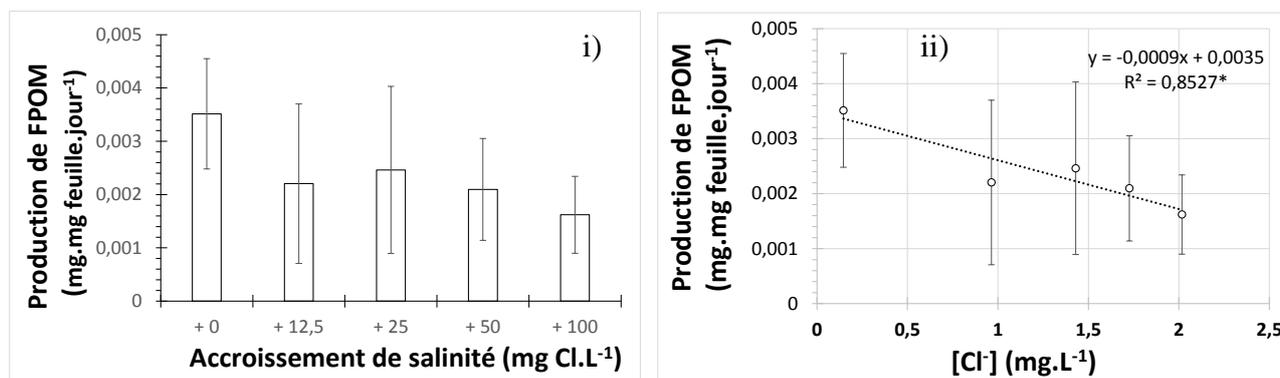


Figure 23 : i) Effet des fondants routiers sur le taux la production de FPOM des communautés bactério-fongiques (ANOVA). ii) Corrélation entre la salinité et le production de FPOM (Test de Pearson ; *, $p < 0.05$).

VII.5.4. Question 4: Effets modulateur des fondants routiers sur l'impact de l'acidification des eaux de surface

Le design expérimental de cette manipulation est synthétisé dans la figure 24. Dans le cadre de cette expérimentation, l'eau et les gammares ont été récoltés, dans un autre ruisseau de tête de bassin versant déminéralisé, drainant cette fois du granite, le ruisseau de la Meurthe. Des feuilles d'érable collectées en automne à l'aide d'un filet sur la ripisylve de La Maix ont été fournies, sous forme de disque de 18 mm aux gammares pour estimer leur taux d'alimentation dans les différentes conditions. Parallèlement de l'eau a également été collectée dans trois autres ruisseaux de tête de bassin versant connus pour leur degré d'acidification, ceci afin d'obtenir un gradient d'acidification. Des détails quant à la localisation des ruisseaux et certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques sont mentionnés dans le tableau VI.

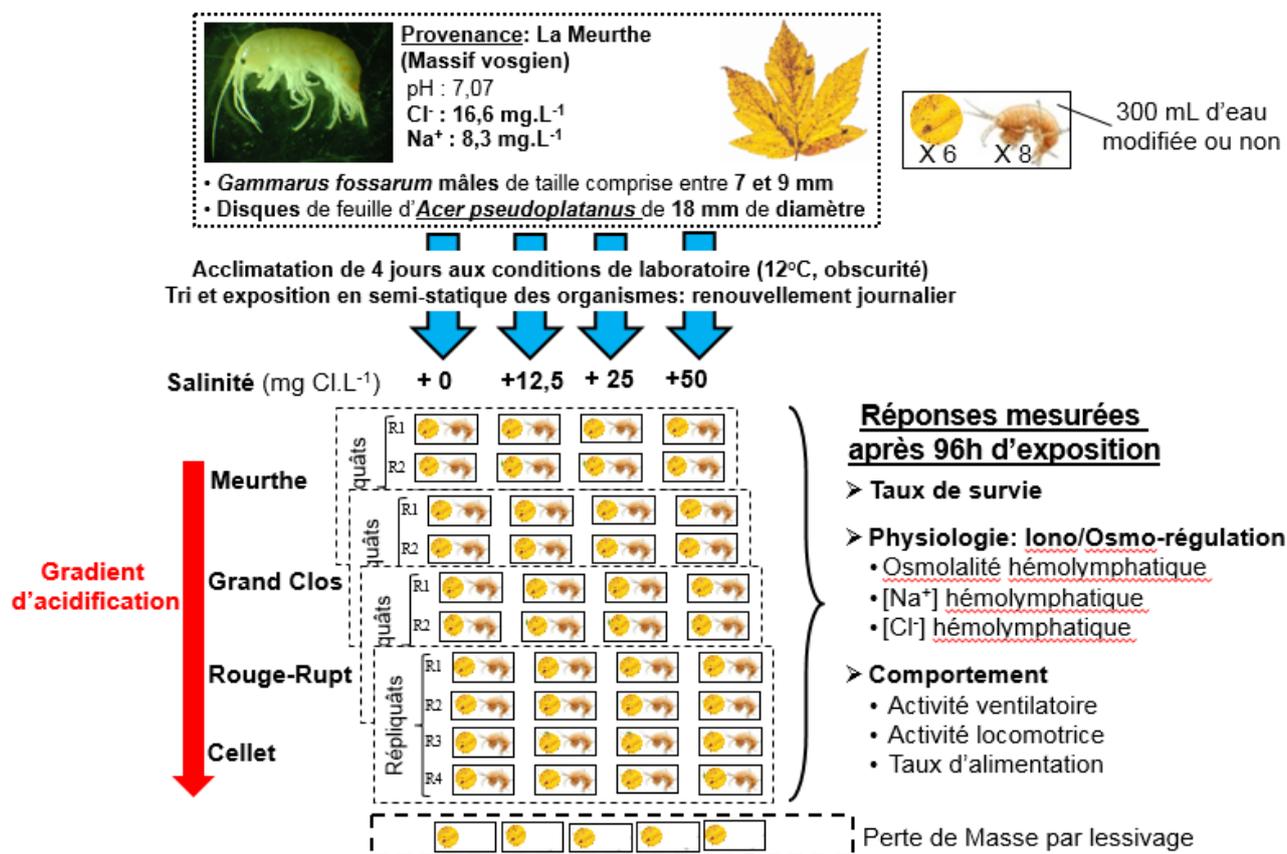


Figure 24 : Design expérimental employé pour identifier les effets modulateur des fondants routiers sur les impacts de l'acidification des eaux de surface (question 4).

Tableau VI : Localisation des sites de prélèvement d'eau et caractéristiques physico-chimiques

Cours d'eau	Longitude E	Latitude N	Altitude (m)	pH	Conductivité (μS cm ⁻¹)	ANC (μeq L ⁻¹)	[Cl ⁻] (mg L ⁻¹)	[Na ⁺] (mg L ⁻¹)
La Meurthe	7°01'04.9"	48°05'01.5"	830	7.10	81.50	142	16.60	8.30
Le Cellet	6°47'03.7"	48°03'32.3"	680	5.30	15	0.60	1.03	1.00
Le Grand-Clos	6°52'36.6"	47°58'48"	661	6.26	16.50	46	0.88	1.10
Le Rouge-Rupt	6°53'18.3"	47°58'27.9"	673	5.95	12.50	21.40	1.22	1.10

Quatre des 5 accroissements de concentrations sélectionnées ont été réalisés (+0, +12.5, +25, et +50 mg Cl.L⁻¹) sur chacune des 4 eaux collectées. Ils ont été obtenus en mélangeant l'eau des 4 ruisseaux sur lesquels une collecte a été effectuée à une quantité adéquate de fondants routiers. Pour chaque condition (4) et chaque ruisseau (4), 4 réplicats ont été effectués. Des gammarus adultes (8 par réplicat, taille 7-9 mm) ont été exposés pendant 96h en enceinte thermostatée (à 12 ± 1°C) en ont été nourris avec des disques de feuille d'érable de 18 mm (6 par réplicat). Les eaux d'exposition ont été renouvelées tous les jours afin de limiter l'évolution de l'acidification des eaux. En parallèle, des prélèvements d'eau ont été effectués avant et après renouvellement afin de mesurer leur pH ainsi que leur [Cl⁻] et [Na⁺].

Ainsi les données de pH, [Cl⁻] et [Na⁺] dans les eaux d'expositions a révélé que i) le gradient d'acidification avait bien été obtenu (en moyenne de 5.97 à 7.04), que ii) l'ajout de fondant routier ne modifiait pas le pH et que iii) les gradients d'augmentation de salinité attendus avaient bien été obtenus (Tableau VII). Après les 96h d'exposition, la survie, des réponses physiologiques

(osmolalité, les $[Cl^-]$ et $[Na^+]$ hémolympatiques) et comportementales (locomotion, ventilation et taux d'alimentation) ont été mesurés.

Tableau VII : Paramètres physico-chimique des eaux pour les différentes conditions testées

Accroissement nominal de salinité (mg Cl.L ⁻¹)		+ 0	+ 12,5	+ 25	+ 50
Meurthe (ME)	pH	7.07 ± 0.04	7.02 ± 0.07	7.04 ± 0.03	7.04 ± 0.01
	[Na ⁺] (mg.L ⁻¹)	8.30	15.80	23.20	38.00
	[Cl ⁻] (mg.L ⁻¹)	16.60	27.86	41.96	66.16
Grand-Clos (GC)	pH	6.70 ± 0.07	6.78 ± 0.07	6.80 ± 0.05	6.75 ± 0.05
	[Na ⁺] (mg.L ⁻¹)	1.10	9.30	17.20	31.30
	[Cl ⁻] (mg.L ⁻¹)	0.88	14.23	27.43	51.96
Rouge-Rupt (RR)	pH	6.64 ± 0.46	6.49 ± 0.32	6.51 ± 0.25	6.52 ± 0.17
	[Na ⁺] (mg.L ⁻¹)	1.10	9.30	17.50	31.70
	[Cl ⁻] (mg.L ⁻¹)	1.22	13.93	27.30	50.00
Cellet (CE)	pH	6.10 ± 0.45	5.90 ± 0.34	5.99 ± 0.50	5.90 ± 0.42
	[Na ⁺] (mg.L ⁻¹)	1.00	9.50	17.10	31.30
	[Cl ⁻] (mg.L ⁻¹)	1.03	14.60	27.70	52.30

pH 7,04

 Gradient d'acidification
 pH 5,97

Après 96h d'exposition, les taux de survie restent élevés et supérieurs à 87.5% (Figure 25). Les écart-types sont faibles illustrant la répétabilité de cette réponse. Bien que les gammarés exposés à des eaux acides semblent présenter des mortalités légèrement supérieures, aucun effet de l'acidification des eaux de surface, des fondants routier et de leur interaction n'a été statistiquement détecté (transformation arcsinus(racine carré de la fréquence) ; ANOVA à 2 champs).

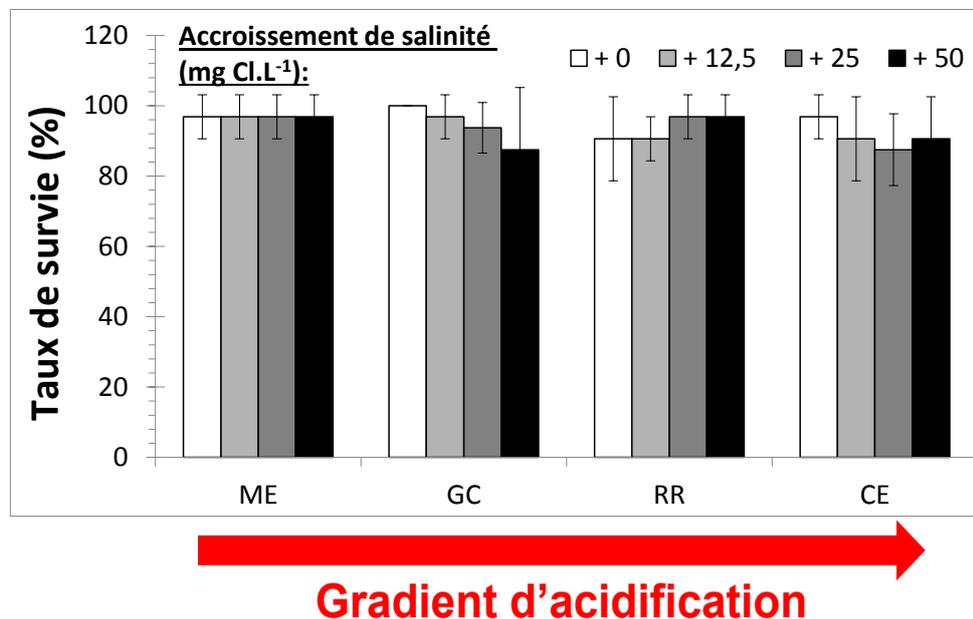


Figure 25 : Effets de l'acidification des eaux de surface et fondants routier sur le taux de survie de *G. fossarum*.

Une fois encore, l'osmolalité des gammarés témoins est peu variable et est comprise entre 280 & 290 mOsm.Kg⁻¹ ce qui met en évidence la régulation homéostatique de l'osmolalité des gammarés autour de la valeur de 290 mOsm.Kg⁻¹ couramment observé chez cette espèce (Figure 26). L'osmolalité est significativement impactée par l'acidification des eaux de surface, les organismes exposés à l'eau provenant du ruisseau CE (le plus acidifié testé) présentant une

osmolalité significativement inférieure (ANOVA à 2 champs). Ce type de réponse a déjà été mis en évidence dans d'autres travaux ayant trait à l'acidification des eaux de surface uniquement (Felten et al., 2008¹²). Un effet significatif des fondants routiers est également rapporté, les organismes exposés dans des eaux non supplémentées en fondant routier présentant une osmolalité inférieure. Par contre, aucun effet interactif n'est rapporté. *In fine*, l'ajout de fondant routier module les effets délétères des eaux acidifiées sur l'iono-/osmorégulation, neutralisant, pour les eaux et dans les conditions testées, non seulement les effets sur l'osmolalité mais également sur les $[Cl^-]$ et $[Na^+]$ hémolympatiques (non présentées car similaires et liées). Cet effet est très clairement visible pour le cas de l'exposition aux eaux du ruisseau CE (encadré en bleu sur la figure 26) et même si il est plus léger, on observe également cette tendance pour les organismes exposés à RR.

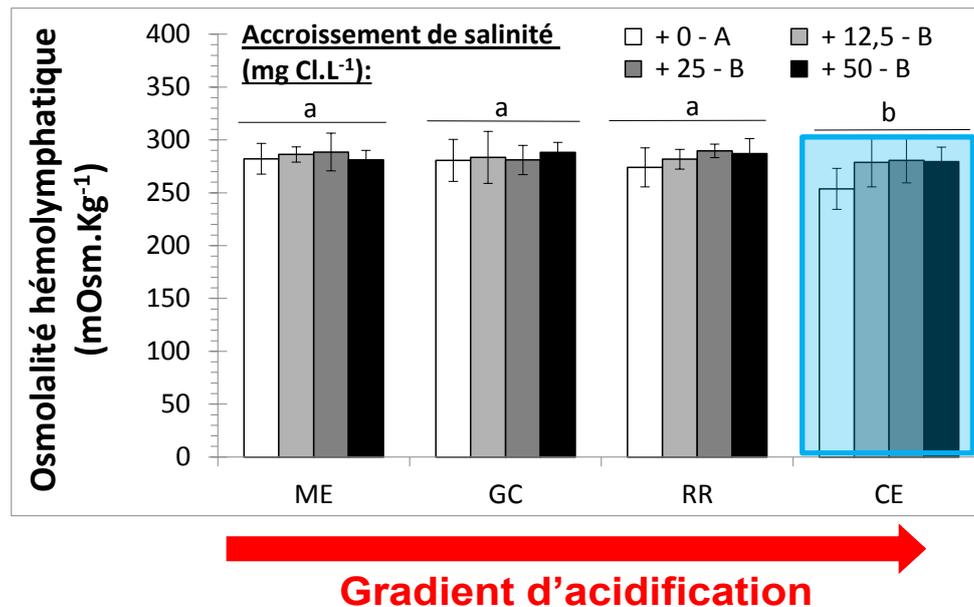


Figure 26 : Effets de l'acidification des eaux de surface et fondants routier sur l'osmolalité de l'hémolymphe de *G. fossarum*. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA 2 champs, $p < 0.05$) : celles, minuscules, présentes au-dessus des barres d'histogramme illustrent l'effet salinité tandis que celles, majuscule après les temps d'exposition dans la légende montrent l'effet temps.

Concernant la ventilation des gammarus, il existe un effet significatif de l'acidification (Figure 27) : la ventilation augmente avec le degré d'acidification, ce qui avait déjà été mis en évidence par Felten et al. (2008¹²). Par ailleurs, comme pour la première expérimentation menée (cf. Figure 13), il existe un effet significatif des fondants routiers sur la ventilation, les ventilations se réduisant avec l'accroissement de supplémentation en fondant routier, ce qui, comme préalablement mentionné doit être une acclimatation des organismes pour réduire la capture d'ion au niveau branchial et ainsi réduire les perturbations de l'homéostasie induites par les fondants routiers. Cependant, aucun effet interactif n'est rapporté.

¹² **Felten V.**, Charmantier G., Charmantier-daures M., Aujoulat f., garric j. & GEFFARD O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress. Comparative Biochemistry and Physiology C 147, 189-197.

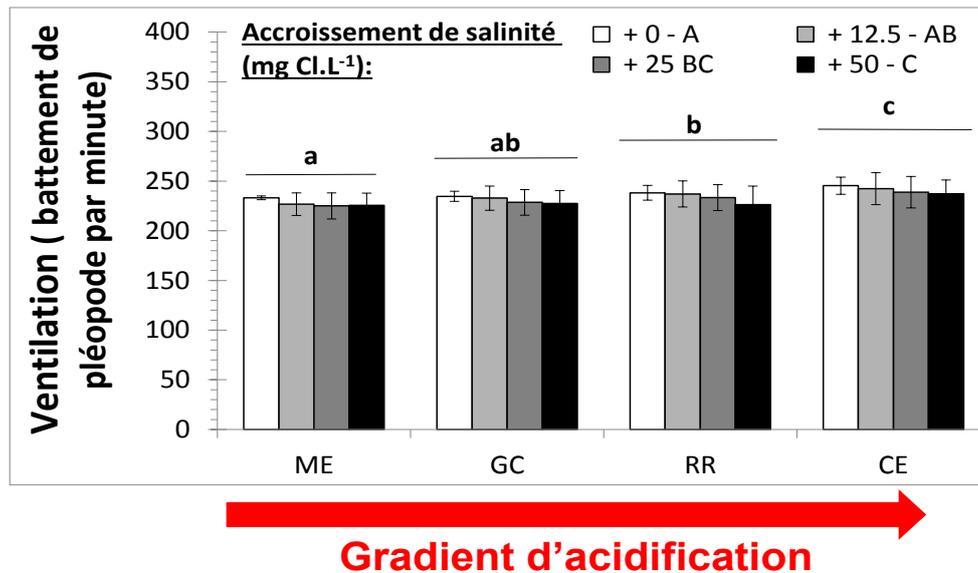


Figure 27 : Effets de l'acidification des eaux de surface et fondants routier sur la ventilation de *G. fossarum*. Des lettrines différentes indiquent des différences significatives (ANOVA 2 champs, $p < 0.05$) : celles, minuscules, présentes au-dessus des barres d'histogramme illustrent l'effet salinité tandis que celles, majuscule après les temps d'exposition dans la légende montrent l'effet temps.

La locomotion est significativement réduite par l'acidification des eaux de surface (Figure 28 ; ANOVA à 2 champs), ce qui est conforme aux résultats de Felten et al. (2008¹²). Les fondants routiers accroissent significativement l'activité locomotrice de *G. fossarum*. Par contre, il existe un effet de l'interaction entre l'acidification et les fondants routiers sur la locomotion de *G. fossarum* : l'accroissement de salinité liée aux fondants routiers module/contre les effets délétaires de l'acidification sur la locomotion, ce qui est très clairement visible pour les eaux RR et CE (encadré en bleu sur la figure 28). Comme mentionné pour la première expérimentation, cet effet modulateur pourrait être dû à un allègement de l'allocation énergétique pour la capture d'ion à la faveur d'autres fonctions telles que la locomotion.

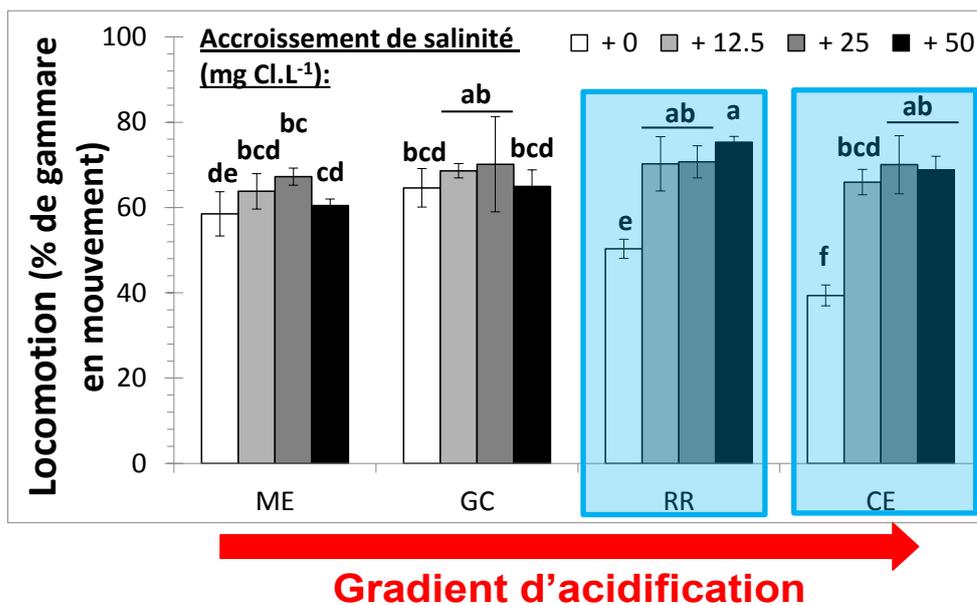


Figure 28 : Effets de l'acidification des eaux de surface et fondants routier sur la locomotion de *G. fossarum*. Des lettrines différentes indiquent des différences significatives entre les traitements (ANOVA 2 champs, $p < 0.05$).

Les résultats du taux d'alimentation sont variables (cf forts écart-type) et ne nous ont pas permis de détecter d'effet statistiques de l'acidification, des fondants routier et de leur interaction (Figure 29).

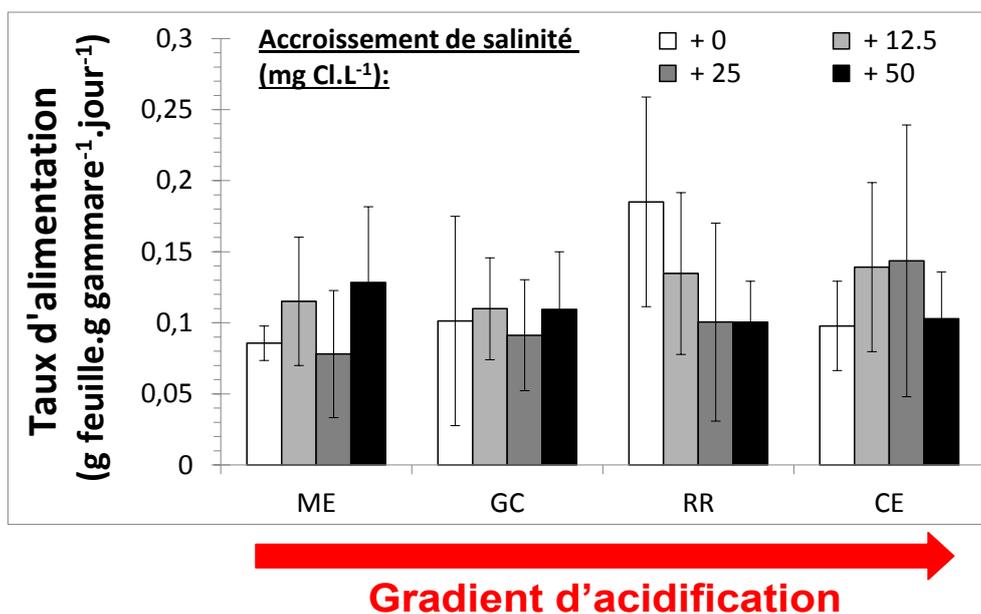


Figure 29 : Effets de l'acidification des eaux de surface et fondants routier sur le taux d'alimentation de *G. fossarum* (ANOVA 2 champs, $p < 0.05$).

VII. TAKE HOME MESSAGE

« Les résultats sont issus d'une 1^{ère} approche se basant sur un écosystème et une espèce modèle (Ruisseau de tête de bassin versant forestier déminéralisé; amphipode *Gammarus fossarum*), dans des conditions de laboratoire »

Ce que l'on peut dire

Dans nos conditions expérimentales, pour des ↑ de salinité réalistes (+0 à +100 mg.L⁻¹), les fondants routiers engendrent:

- **A cours terme (24 - 96h):**
 - des effets physiologiques (osmorégulation)
 - des effets comportementaux
 - > **mais les gammares s'acclimatent rapidement**
- **A moyen terme (57 jours):**
 - ↑ de la survie
 - ↓ de la croissance et ↑ de l'alimentation
 - > **modification potentielle de la structure des communautés et des processus fonctionnels**
- **Au niveau fonctionnel** (microorganismes colonisant les feuilles :
 - ↓ de la production de Fines Particules de Matière Organique (FPOM)
 - > **modification des flux de matière**
- **Effet modulateur** sur l'acidification des eaux de surface

Ce que l'on ne peut pas dire



➤ **Les fondants routier n'ont pas d'impacts ou des effets bénéfiques**

- Les résultats observés ne sont pas valables:
 - pour toutes les espèces
 - pour tous les écosystèmes
 - pour tous les niveaux d'organisation biologique

Ex: la favorisation d'une espèce peut modifier la compétition, de fait la structuration des communautés et ainsi les processus fonctionnels associés

- Par ailleurs la problématique des fondants routiers:
 - se surajoute à d'autres pressions
 - et revêt un aspect multi-épisode (plusieurs périodes d'épandage)

Conclusion: il y a des effets mais il est difficile d'en évaluer les conséquences

VIII. PERSPECTIVES

Ces résultats acquis grâce à cette collaboration constructive entre l'agence de l'eau Rhin-Meuse et l'université de Lorraine ont permis de mettre en évidence que les fondants routiers engendraient des effets sur le crustacé amphipode dulçaquicole *Gammarus fossarum* mais également sur le fonctionnement des écosystèmes. Même si ces effets restent modérés pour l'organisme modèle *G. fossarum* aux faibles échelles temporelles considérées, la prudence reste de mise quant à l'utilisation des fondants routiers puisque les effets s'avèrent généralement plus marqués pour des temps plus longs et sur niveaux de complexité biologique plus importants (communauté).

Suite à ces travaux et ceux conduits dans le cadre d'un projet de recherche en collaboration avec l'ONEMA (Enjeux des têtes de bassins versants pour la préservation et la restauration du bon état des masses d'eau ; Test d'indicateurs fonctionnels des cours d'eau de tête de bassin versant), de nouveaux axes, questionnements de recherche et outils ont émergés. En s'appuyant sur ces expériences, nous souhaitons élargir notre questionnement en adéquation avec les problématiques rencontrées dans le bassin Rhin-Meuse. Plus concrètement, en milieu naturel, les organismes sont confrontés à de multiples contraintes qu'elles soient d'origine anthropique (pollutions, pressions physiques) ou naturelle (facteurs limitant : calcium, phosphore, acides gras essentiels). Aujourd'hui, si de nombreuses études portent sur l'effet de contraintes uniques, de très rares études seulement se concentrent sur l'étude des effets de contraintes multiples, rendant de fait le transfert vers les milieux naturels difficiles. Aujourd'hui l'étude des effets interactifs de ces contraintes est un verrou scientifique majeur, bloquant les avancées non seulement en termes d'acquisition de connaissances scientifiques mais également en termes de gestion des milieux naturels. En effet, la combinaison de stress peut conduire à des effets synergiques, antagonistes, et potentiellement mener à des résultats contre-intuitifs. Il s'avère donc indispensable de se pencher sur ces questionnements puisque certaines zones peuvent s'avérer plus sensibles compte tenu des pressions déjà présentes sur les écosystèmes. Nous nous focaliserons plus particulièrement sur les milieux aquatiques de tête de bassin versant ce qui permettra non seulement de simplifier l'approche multi-stress (en réduisant le cocktail de pressions en présence) mais également de nous focaliser sur des écosystèmes particulièrement sensibles, peu suivis et garant de l'état des masses d'eau situées à l'aval.

VIII.1. Objectif

Si l'effet de la plupart de ces contraintes a été étudié de manière individuelle sur certain niveau d'organisation biologique, il n'en est rien en termes de stress combinés. Ainsi l'objectif du programme de recherche envisagé est d'**étudier les effets de stress multiples** en se concentrant sur les **milieux humides de tête de bassin versant** du bassin Rhin-Meuse, et plus particulièrement, pour ce qui concernera le projet porté par le LIEC, les systèmes aquatiques lotiques.

VIII.2. Démarche

Etape 1 : à échéance courte (2016-2017), elle visera à définir une **typologie des têtes de bassin versant pour le bassin Rhin-Meuse** (au sens de leur fonctionnement naturel et des milieux aquatiques qui les composent) et à identifier, les types de pressions auxquelles elles sont soumises. Cette étape est un pré-requis qui permettra de prioriser les pressions et cocktails de pressions sur lesquelles nous focaliser au sein d'une hydro-écorégion mais également de comparer les effets de pressions similaires dans plusieurs hydroécorégions. Compte tenu du peu de suivis réalisés sur les cours d'eau de tête de bassin versant (rang de Strahler 1 et inférieur, non référencés), les données des stations de surveillance existantes seront employées afin de nous orienter dans la sélection des pressions (chimique et physique) à étudier. Des analyses complémentaires seront ensuite réalisées afin de définir au mieux les pressions sur les milieux des têtes de bassin les moins connues ou les plus prioritaires au regard des activités humaines en place.

Etape 2 : Elle aura pour objectif de **sélectionner les pressions sur lesquelles nous nous focaliserons (pression prioritaire)**. Cette sélection se basera sur les pressions majoritaires au niveau du bassin Rhin-Meuse et dans chaque hydroécocorégion (politique prioritaire ; DCE), en nous basant sur la quantité de masse d'eau impactées. Nous nous attèlerons également à considérer des systèmes subissant des pressions multiples. Outre ces pressions prioritaires, nous nous intéresserons également à des pressions, nouvelles, en devenir, qui sur le long terme risquent de devenir une problématique importante au niveau du bassin Rhin-Meuse (e.g., décalcification, ...). Une fois cette seconde étape franchie, nous disposerons de différents scénarios et contextes de pression pour lesquels nous pourrions évaluer les impacts.

Etape 3 : Les effets individuels et combinés de ces pressions sélectionnées seront étudiés *via* une **double approche terrain/laboratoire**. Les outils employés pour évaluer les effets de ces stress pourront aller d'approches sub-individuelles (physiologie), en passant par des approches individuelles (trait d'histoire de vie : survie, croissance, reproduction) et allant jusqu'à des approches écosystémiques (étude de processus fonctionnels : production de biofilm, décomposition/dégradation des litières de feuilles). Les approches conduites au laboratoire permettront de tester des hypothèses quant aux effets de stress multiples afin de mieux comprendre les causes (physiologie) et les conséquences (trait d'histoire de vie) des stress appliqués. L'approche *in situ* permettra d'identifier les effets fonctionnels résultant de ces pressions. Des allers-retours entre approche au laboratoire et *in situ* seront conduits afin de parfaire nos connaissances et valider nos hypothèses.

Afin de pouvoir répondre à ces objectifs ambitieux, il est indispensable de **mettre en place un consortium de chercheur interdisciplinaire et de gestionnaire de l'environnement**, qui permettra de répondre au mieux aux questionnements sociétaux et de l'agence de l'eau (locaux et globaux) tout en permettant de bénéficier au mieux des compétences et connaissances de chaque discipline et corps de métier. L'ampleur des questionnements au niveau national conditionne des rapprochements inter-agences de l'eau (RMC, et AELB notamment) ainsi qu'avec l'ONEMA (Implication dans la rédaction dans le futur ouvrage 'Comprendre pour agir' dédié à cette thématique des têtes de bassin versant ; Bilan R&D : 2017-2021).

VIII.3. Outcomes

Outre la connaissance scientifique acquise, ce projet permettra l'établissement d'un *consortium* de chercheurs et d'experts de problématiques régionales, d'évaluer les effets des pressions majeures tout en intégrant la multiplicité des pressions et des types de tête de bassin versant. Les résultats acquis permettront, *in fine* de hiérarchiser les priorités en identifiant :

- les pressions les plus impactantes pour l'atteinte ou le maintien du bon état écologique des eaux,
- les zones les plus sensibles,

De cette hiérarchisation pourra alors émerger une véritable stratégie de préservation et de restauration des têtes de bassin versant du bassin Rhin-Meuse.