

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en :

Reproduction animale

Thème

**Contribution à l'étude de l'impact des pesticides sur la
reproduction des vers de terre**

Soutenu par :

BOUCHACHIA Salima

AISSANI Nassiba

Devant le Jury :

<i>Mme SAYAD M</i>	<i>Maître assistante B</i>	<i>U.S.D. Blida</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme FAIDI H</i>	<i>Maître assistante A</i>	<i>U.S.D. Blida</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme BELMESKINE H</i>	<i>Maître de conférences B</i>	<i>U.S.D. Blida</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme DJAZOULI F/Z</i>	<i>Maître de Conférences A</i>	<i>U.S.D. Blida</i>	<i>Co-Promotrice</i>

Le 18 /09 /2016

REMERCIEMENTS

Nous voulons exprimer par ces quelques lignes de remerciements notre gratitude envers tous ceux en qui par leur présence, leur soutien, leur disponibilité et leurs conseils, nous avons eu le courage d'accomplir ce projet.

Nous commençons par remercier Mme BELMSKINE Hayet, (Maître de Conférence B à l'université Blida 1) qui nous a fait l'honneur d'être notre promotrice, nous la remercions profondément pour son encouragement continue et aussi d'être toujours là pour nous écouter, nous aider, et nous guider à retrouver le bon chemin par sa sagesse et ses précieux conseils. Ainsi que son soutien moral et sa preuve de compréhension, ce qui nous a donné la force et le courage d'accomplir ce projet.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent de même à Mme DJAZOULI F. Zohra (Maître de Conférence A à l'université Blida 1), notre co-promotrice pour ses conseils intéressants, ses encouragements continus, ainsi que le temps qu'elle nous a réservée malgré ses grandes occupations.

Nous tenons à remercier Madame SAYAD. M (Maîtresses assistantes B à l'université Blida 1), pour avoir accepté de présider ce jury et de juger notre travail.

Nous exprimons toute notre gratitude à Madame FAIDI. H (Maître assistante A à l'université Blida 1) pour avoir accepté de juger ce travail et faire partie de ce jury en qualité d'examinatrice.

Nous tenons à remercier également monsieur DJAZOULI. Z (Professeur à l'université Blida 1) de nous avoir accueilli dans son laboratoire de phytopharmacie, de nous avoir fourni les vers de terre, pour son soutien et son aide tout le long de notre travail expérimental.

Nos remerciements s'adressent aussi au chef de laboratoire anatomo-pathologie de l'hôpital de Koléa, Monsieur MERRASLI. M pour son soutien, et ses orientations au cours de notre stage pratique.

Enfin, nous ne pouvons achever ce mémoire sans exprimer notre gratitude à tous les enseignants de la faculté S.N.V de l'Université de BLIDA1 pour leur dévouement et leur assistance tout le long de nos études universitaires.

Dédicace

Que ce travail témoigne de mes respects :

A mes très chers parents :

Grâce à leurs encouragements et leurs grands sacrifices auxquels je dois ce que je suis, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux. Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

*A mes chères sœurs HANANE, SORAYA, CHAHINEZ et à mon frère BILLALE.
Pour leur amour et leur incontestable appui.*

A SID ALI la personne chère à mon cœur. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude et mon amour.

A mes chéries SAIDA et NOUSSAIBA

Pour tous les instants inoubliables que j'ai passés avec vous, je vous aime beaucoup

A tous mes chers amis ILHEM, KHAWLA, HADJER, LOUBNA, IMANE... Et la liste est bien longue

A toute la famille BOUCHACHIA et FELITI

Ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter.

A tous mes professeurs : Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

A tous mes cousins et mes cousines :

Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'un amour infini.

A toute personne qui m'a aidé d'un mot, d'une idée ou d'un encouragement

Je dis « merci ».

SALIMA

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que :

Je dédie ce travail à :

*Mes tendres parents ; ma **mère** et mon **père**, à qui je dois la vie et une part essentielle de ma personnalité. Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'ont pas cessés de m'encourager et prier pour moi.*

*A mon très cher mari **HAMID** : Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel m'ont permis de réussir mes études. Ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle. Amon grand père **DJALOUL**, pour ses prières. Qu'Allah te protège.*

*A ma sœur **HANENE**, mes frères **NACER EDDINE** et **AMINE** pour l'amour et la complicité qui nous unissent*

*A mes oncles et mes tantes, mes cousins et mes cousines
Je dédie ce travail aussi à toute la famille **AISSANI** et **GROUCI**,
Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.*

*A tous mes amis et mes collègues,
Je leur souhaite tout le succès du monde.
A mes professeurs sans exception, trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude et reconnaissance.*

*A toutes celles et tous ceux qui m'ont aidé dans mes études.
A tous ceux que je connais et que je n'ai pas pu citer.*

A vous, ceux qui sont en train de lire ces mots

NASSIBA

Résumé

Résumé

Ce travail consiste à étudier l'impact de deux pesticides utilisés couramment en Algérie ; un insecticide (*DURSBAN*) et un fongicide (*PROPICOL-70*) sur un organisme bioindicateur de la pollution du sol soit ; le vers de terre (*Eisenia Fetida*).

Durant les expositions contrôlées des vers à différentes concentrations de pesticides, nous avons suivi, la mortalité, la croissance et la reproduction, à qui s'ajoute une étude d'histologique de l'appareil reproducteur (ovaire et testicules).

En parallèle, nous avons réalisé des analyses physico-chimique du sol (pH = 8.29, MO=6.81%, CE =144.76 μ s, P=2.58ppm..) pour s'assurer que la présence d'un stress quelconque chez les vers de terre n'est pas d'origine du sol.

Nos résultats ont révèlé, l'absence de mortalité (0%) chez les vers de terre exposés, tandis que il existe un effet sur le taux de croissance, l'insecticide réduit la vitesse de croissance pour les trois concentrations, pour la reproduction on observe une diminution de nombre de cocon (T=24, C₁=9) et des vers juvéniles (T=28, C₁=14) dans les sols exposés par rapport au témoin.

L'examen histologique a confirmé la toxicité des deux pesticides DURSBAN et PROPICOL-70 chez le vers de terre, et ce à travers des altérations observées au niveau de l'appareil reproducteur très importantes (ovaire et testicules).

Mots clés : Vers de terre, Pesticides, Toxicité, Reproduction, Histologie.

Résumé

Abstract

This work consists to study the impact of two pesticides used fluently in Algeria : an insecticide (Dursban) and a fungicide (PROPICOL -70) on a bioindicator organism of pollution, earthworms (*Eisenia Fetida*).

During the controlled exposure to différent concentrations of pesticides , we followed , mortality , growth and reproduction, which adds histological study of the reproductive system (ovary and testes).

In parallel, we conducted physical and chemical analyzes of the soil to ensure the presence of any stress in earthworms is not original from soil ((pH = 8.29, MO=6.81%, CE =144.76 μ s, P=2.58ppm..).

Our results revealed the absence of mortality (0%) in earthworms exposed, while there is an effect on the growth rate. In fact, the insecticide reduced the growth rate for the three concentrations. For reproducing parameters, a decrease is observed for the number of cocoons (T=24, C₁=9) and juveniles (T=28, C₁=14) in soils exposed, comparing with our control.

The Histological examination revealed alterations in the reproductive tract, which explains the effect presence due to pesticides (ovary and testes).

Keywords : Earthworms, Pesticides, Toxicity, Reproduction, Histology.

Résumé

ملخص

هذا العمل هو دراسة تأثير المبيدات الحشرية المستخدمة عادة في الجزائر؛ المبيدات الحشرية (DURSBAN) و للفطريات 70- PROPICOL , على كائنات مؤشرة للتلوث دودة الأرض (*Eisenia Fetida*).

من خلال متابعتنا لدودة الارض التي تعرضت الى تركيزات مختلفة من المبيدات الحشرية ،تابعنا نسبة الوفيات ،النمو والتكاثر بالإضافة الي الدراسة النسيجية للجهاز التناسلي (المبيض والخصيتين) .

اضافة الى ذلك، أجرينا تحليلات فيزيائية وكيميائية للتربة (درجة الحموضة = 8.29 ،فسفور 2.58ppm,كربون, المواد العضوية=6.81%...) لضمان عدم وجود أي ضغوط على ديدان الأرض له علاقة بالتربة.

نتائجنا تكشف عن غياب للوفيات في عدد ديدان الأرض التي تعرضت للمبيدات الحشرية ، بينما هناك تأثير على معدل النمو ، حيث خفضت مبيدات الحشرات معدل النمو لكل من التركيزات الثلاثة ، فيما يخص التكاثر لوحظ انخفاض في عدد من شرنقة (T=24, C1=9) والأحداث (T=28, C1=14) في التربة مقارنة مع الشاهد.

أكد الفحص النسيجي سمية اثنين من المبيدات DURSBAN و 70- PROPICOL في ديدان الأرض، و ذلك من خلال التعديلات التي لوحظت في الجهاز التناسلي (المبيض والخصيتين)

كلمات البحث : ديدان الأرض ،المبيدات الحشرية ، السمية ، التكاثر ، علم الأنسجة.

Glossaire

- *Clitellum* anneau ou selle de tissu glandulaire située sur certaines segments du milieu du corps des lombricidés. C'est la caractéristique la plus visible du ver de terre adulte et il n'est proéminent que chez les individus parvenus à la maturité sexuelle, c'est-à-dire les adultes. Les jeunes vers qui n'ont pas atteint la maturité sexuelle se distinguent par l'absence de clitellum. Le clitellum secrète le cocon dans lequel les ovules et les spermatozoïdes sont déposés. Pendant l'accouplement, il sécrète un mucus qui enveloppe les extrémités extérieures des deux vers.
- *Cocon* enveloppe de protection des œufs formée par le clitellum d'où sortent les juvéniles.
- *Spermathèque* vésicule située dans le disséminé du vers de terre, qui reçoit le sperme du partenaire. Ce sperme s'y conserve jusqu'à la ponte dans le cocon (Reynolds, 1977).
- *Ingénieurs de l'écosystème* Ce sont des organismes qui directement ou indirectement modifient la disponibilité des ressources pour d'autres espèces en causant des changements d'état physique sur les matériaux biotiques et abiotiques.
- *Puberculum* : Le pore sexuel des vers de terre
- *Bioindicateurs* Espèce ou groupes d'espèces qui par leur présence et/ou leur abondance sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie

Sommaire

Résumés

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des photos

Liste des Abréviations

Introduction.....1

Données bibliographiques

CHAPITRE I : Biologie du ver de terre

I.1-Généralités3

I.2- Anatomie externe.....4

I. 3- La reproduction.....4

 I.3.1- Caractères sexuels externes.....5

 I.3.2. Le cycle de vie7

I.4 – Nutrition.....10

I.5. Respiration10

I.6. Prédateurs et parasites des vers10

I.7. L'importance des vers de terre.....10

I.8. Importance écologique des vers de terre.....11

I.9. Utilisation du ver de terre comme bioindicateur 12

Sommaire

CHAPITRE II : Les pesticides

II.1. Aperçu sur les pesticides.....	13
II.2. Problèmes de pollution diffuse et de contamination.....	14
II.3. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement.....	14
II.4. Impacts des pesticides sur la santé humaine.....	15
II.4.1. Cancérogénèse.....	15
II.4.2. Effet sur la reproduction.....	16
II.4.3. Perturbation du système endocrinien.....	16
II. 4. 4. Effets sur le système immunitaire.....	16
II.4.5. Effets neurologiques.....	17
II. 5. Effets des pesticides sur les vers de terre.....	17

Partie expérimentale

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

III.1. Lieu de travail.....	18
III.2. Matériel de laboratoire.....	18
III.3. Matériel biologique	18
III.4. Matériel Chimique.....	18
III.5. Les sols.....	19
III. 6. Méthodes.....	20

Sommaire

III.7. Etude histologique.....	25
CHAPITRE IV: Résultats et discussion	
IV.1. Analyses physico-chimiques du sol.....	29
IV.2. Suivi du pH du sol pendant l'essai.....	30
IV.3. L'humidité du sol.....	31
IV. 4. La capacité de rétention d'eau (CRE).....	31
IV. 5. Evaluation de la croissance.....	31
IV.6. Evaluation du pourcentage de mortalité.....	34
IV.7. Evaluation des paramètres de reproduction.....	34
IV.8. Résultats de l'étude histologique.....	36
V-Discussion	40
Conclusion générale et Perspectives	43
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Vue ventrale d'un ver de terre (El-Addan, 1990), les régions du corps, et les caractères externes (Bouché, 1972).

Figure 2 : Les organes reproducteurs (GAUER., 2007)

Figure 3 : La reproduction chez le ver de terre (GAUER, 2007)

Figure 4 : Cycle de vie d'un individu Lombrics terrestres

Figure 5: Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (INERIS, 2005).

Figure 6: mesure du Ph

Figure7 : préparation des vers de terre pour les groupes d'essai

Figure 8 : dénombrement des vers juvéniles

Figure 9 : dénombrement des cocons

Figure 10 : Effet de concentrations croissantes de DURSBAN sur le taux de croissance des vers de terre *Eisania férida* en fonction du temps

Figure 11 : Effet de concentrations croissantes de Propicol -70 sur le taux de croissance des vers de terre *Eisania férida* en fonction du temps

Figure 12 : Effet de concentrations croissantes de DURSBAN sur la reproduction des vers de terre *Eisania férida* en fonction du temps

Figure 13 : Effet de concentrations croissantes de Propicol -70 sur la reproduction des vers de terre *Eisania férida* en fonction du temps

Figure14 : Gonades normales. (A) Ovaire (fragment); (B) testicule. Pg, Protogonies; Pm, préméioses; An, auxocytes; F.s., follicules spermatiques. Hématoxyline ferrique

Figure 15: Changements histologiques au niveau des organes reproducteurs après 28 jours de traitement aux concentrations croissantes de pesticide DURSBAN ET PROPICOL-70 (C3)

Liste des figures

Figure16: Changements histologiques au niveau des organes reproducteurs après 28 jours de traitement aux concentrations croissantes de pesticide DURSBAN ET PROPICOL-70(C2)

Figure17 : Changements histologiques au niveau des organes reproducteurs après 28 jours de traitement aux concentrations croissantes de pesticide DURSBAN ET PROPICOL-70 (C3)

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats de la caractérisation physico-chimique du sol.

Tableau 2 : Les valeurs du pH du sol durant l'essai.

Tableau 3 ; les poids moyens des vers de terre durant l'essai.

Liste des photos

Liste des photos

Photo 1 : L'accouplement chez les lombrics (TREMBLAY, 2014).....6

Liste des abréviations

Liste des abréviations

CE	C onductivité E lectrique
CRE	C apacité de R étention d' E au
H	H umidité
HAP	H ydrocarbures A romatiques P olycycliques
HE	H ÉMALUN E OSINE
INRA	I nstitut National de R echerche A gronomique
ISO	I nternational S tandardisation O rganisation
M_f	M asse final
M_h	M asse humide
M_i	M asse initiale
MO	M atière O rganique
M_s	M asse sèche
OCDE	l' O rganisation de C oopération et de D éveloppement E conomique
OMS	O rganisation M ondiale de S anté

INTRODUCTION

L'usage des pesticides ou « produits phytosanitaires » a fortement contribué à l'amélioration des rendements agricoles au cours de ces dernières décennies. Faciles d'accès et d'emploi pour les agriculteurs ou les jardiniers amateurs, ces pesticides se sont révélés efficaces pour lutter contre les mauvaises herbes, champignons ou insectes nuisibles. Cependant, l'usage excessif et systématique est récemment remis en cause du fait de leurs atteintes aux écosystèmes et à l'être humain. En effet, certains pesticides seraient responsables de disparitions d'espèces d'insectes, d'autres provoqueraient des troubles de la reproduction chez certains animaux et des maladies chroniques chez l'être humain (Multigner ., 2005).

Par ailleurs, l'évaluation des risques associés à l'usage des pesticides est menée sur de nombreux organismes terrestres et aquatiques (Ramade, 2007). Parmi les organismes du sol, les vers de terre sont particulièrement utilisés dans les tests écotoxicologiques vu leur rôle important dans le maintien de la fertilité et la structure du sol (Saurel et *al.*, 2010), ainsi que dans les cycles biogéochimiques et la protection de l'environnement naturel (Jandl et Wenzel, 2011). D'autre part, ils sont considérés comme d'efficaces indicateurs biologiques de la contamination chimique des sols.

C'est ainsi que l'on s'est intéressé aux vers de terre ou lombriciens. Ces animaux constituent aujourd'hui une armée de nettoyeurs aux services des autorités locales, des particuliers et des industriels. L'utilisation des vers de terre a été principalement concentrée sur les effets des métaux lourds (Lukkari et *al.*, 2004 ; Burgos et *al.*, 2005 ; Schleifler et *al.*, 2006 ; Bundy et *al.*, 2007). Très peu d'études ont été consacrées à l'impact des polluants organiques tels que les pesticides sur le ver de terre (Gupta et Sundararaman, 1991 ; Venkateswara Rao et *al.*, 2003 ; Gambi et *al.*, 2007). Lors de l'exposition aux polluants, les vers de terre sont capables de diminuer les effets toxiques du produit chimique en réglant leurs réponses biochimiques internes avant que la croissance ne soit affectée (Gao et *al.*, 2007), d'où notre intérêt pour le métabolisme biochimique dans l'évaluation de la toxicité des produits chimiques.

En raison de la facilité de leur manipulation et culture sous les conditions de laboratoire, ainsi que leur habilité de bioaccumulation des composés organiques et inorganiques, et leur sensibilité élevée aux substances chimiques, plusieurs espèces de vers de terre (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*) ont été utilisés comme bioindicateurs de la contamination des sols. Toutefois, l'espèce *Eisenia fetida* est fortement utilisée et recommandée dans les tests standards de reproduction en écotoxicologie des sols (OCDE 2004). En effet, de nombreuses études ont abordé la relation entre la mortalité, le nombre des vers de terre et

INTRODUCTION

l'utilisation des pesticides. Cependant, ces polluants ont reçu peu d'attention, en Algérie, pour l'étude de leur impact sur le potentiel biotique en particulier la reproduction des vers de terre qui contribuent au maintien de la qualité des sols.

Dans ce contexte, notre étude vise à étudier l'effet de deux pesticides soient ; un insecticide (Dursban) et un fongicide (Propicol-70) sur la survie, la croissance et la reproduction des vers de terre *Eisenia fetida* soumis à des expositions contrôlées au laboratoire. Un autre objectif de notre étude est de réaliser des coupes histologiques au niveau de l'appareil reproducteur du ver de terre afin de voir, dans les mesures du possible, s'il y a des changements observables dues aux effets des pesticides.

I.1. Généralités

Les vers de terre, aussi appelés « lombriciens » représentent une composante majeure de la macrofaune du sol dans la plupart des écosystèmes terrestres. Selon Vigot et Cluzeau (2014), l'identification des vers de terre montre qu'il y a plus de 3000 espèces dans le monde. Les vers de terre représentent environ 70 % de la biomasse animale terrestre dans les zones tempérées. Ils jouent un rôle important dans leur environnement grâce à différents mécanismes physico-chimiques et biologiques, permettant d'améliorer la fertilité et de préserver la structure du sol (Stork et Eggleton, 1992 ; Lavelle et *al.*, 1997). Ainsi, en affectant les propriétés physiques et chimiques du sol, ils modifient le biotope des communautés microbiennes (cité par Huynh, 2009).

Ils jouent en effet un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique du sol mais également dans la structuration (agrégats) et dans l'aération du sol en creusant des galeries (Bartlett et *al.*, 2010). Ils ont un rôle important dans la chaîne alimentaire car ils sont une source d'alimentation pour les niveaux trophiques supérieurs. Selon Bouché (1977), Edwards et Lofty (1977), et Lee (1985), on distingue 3 grands groupes écologiques de lombriciens.

- **Les épigés** : qui sont des vers pigmentés de petite taille (10 à 30 mm en général) et vivent généralement dans la litière de surface et se nourrissent des matières organiques en décomposition dans cette litière. L'espèce *Eisenia fetida* appartient à ce groupe (Bouché, 1977 ; Lee, 1985).

- **Les endogés** : qui sont des vers dépigmentés, sans couleurs ou très pâles, de taille variable (1 à 20 cm), vivant généralement dans les premiers centimètres de sol où ils construisent des galeries d'orientation quelconque (Bouché, 1977).

- **Les anéciques** : qui sont de couleur brune, de taille moyenne à géante (10 à 110 cm), ce sont ceux qu'on appelle les "lombrics". Ils creusent des galeries verticales profondes à subverticales plus ou moins ramifiées s'ouvrant en surface. Ils ont un mode de vie mixte, et se nourrissent de débris organiques prélevés en surface et qu'ils laissent pourrir dans le sol avant de les ingérer avec du sol (Bouché, 1977).

I.2. Anatomie externe :

Le corps des vers de terre est cylindrique et formé d'une succession de segments semblables compris entre un lobe céphalique (prostomium) et un lobe terminal (pygidium) (figure 1). Leur système nerveux se compose d'une chaîne ventrale double comportant une paire de ganglions par segment. Cette chaîne est reliée à l'avant à des ganglions cérébroïdes dorsaux par un collier périoésophagien (BACHELIER, 1978).

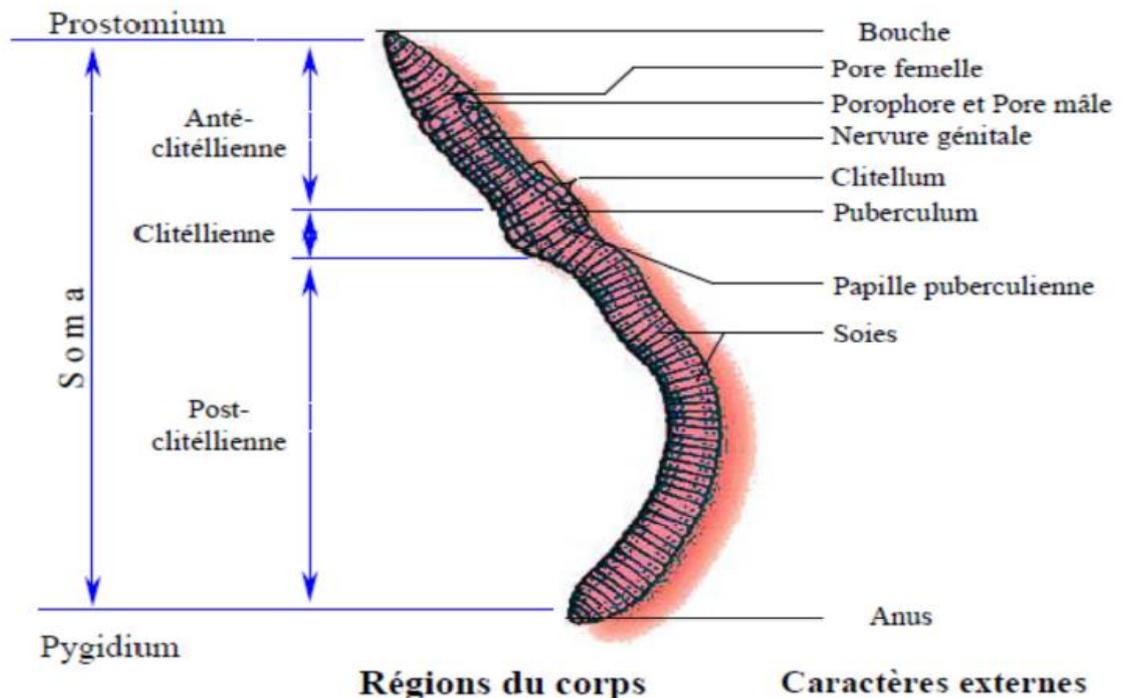


Figure 1 : Vue ventrale d'un ver de terre (El-Addan, 1990), les régions du corps, et les caractères externes (Bouché, 1972).

I. 3. La reproduction :

Les vers de terre sont hermaphrodites, l'autofécondation a été rarement observée. Les vers de terre se reproduisent en mieux au printemps et en automne, si les conditions de température et d'humidité dans le sol sont favorables (HERGER, 2003 ; VIGOT et CLUZEAU 2014).

L'accouplement des vers se fait de nuit à la surface des sols (BACHELIER, 1978 et HERGER, 2003). La maturité sexuelle des individus se caractérise par l'épaississement de la peau dans la partie antérieure (clitellum) ; la présence d'un mucus collant et spécial ; des poils clip protègent les côtés du ventre rapprochés et des gamètes qui se produisent dans les ouvertures

CHAPITRE I : Biologie du vers de terre

reproductrices mâles (HERGER, 2003). Les organes reproducteurs mâles sont sur les segments 9, 10, 11, 12 et 15 qui portent l'orifice (figure 2). Les organes reproducteurs femelles sont sur les segments 13 et 14 qui portent l'orifice. Les segments 32. 37 forment la gangue muqueuse ; les gonopores des 2 vers ne sont pas face à quelque chose de marquant. Les spermatozoïdes migrent le long de l'animal pour arriver dans les réceptacles séminaux (spermathèque). Quand ils sont accouplés (photo 1), les 2 vers sont au stade sexuel mâle. Dans certains cas, il y a accolement du gonopore mâle sur les réceptacles séminaux. Pour la phase de maturation des organes génitaux femelles, il y a fabrication de la gangue muqueuse au niveau du clitellum puis l'animal recule pour atteindre le segment 9 (Spermathèque) où il y aura fécondation externe, les spermatozoïdes d'un lombric sont déposés sur les organes génitaux femelles de l'autre lombric puis il y a formation d'un cocon (figure 3) (GAUER, 2007)

I.3.1. Caractères sexuels externes

D'après BACHELIER (1978), L'emplacement des orifices mâles, dont les lèvres, épaisses et blanchâtres au moment de la reproduction, constituent un caractère sexuel secondaire bien visible. Par contre, l'emplacement des orifices femelles ne peut pas facilement être déterminé, car ces orifices sont très petits, même aux périodes de ponte.

- L'emplacement du clitellum, bourrelet qui apparaît sur le corps des vers de terre à maturité sexuelle et qui sécrète le cocon où sont pondus les œufs.

- L'existence éventuelle de nervures génitales qui relie les orifices mâles au clitellum, notamment chez les Lumbricides.

- L'existence de crêtes de puberté saillant sur le clitellum et des mamelons blanchâtres sur certains segments antérieurs. Ainsi que l'emplacement des orifices des réceptacles séminaux ou spermathèques, parfois visibles au moment de la reproduction où *L. terrestris* possède deux paires de pores spermathécaux. Mais d'autres vers en ont davantage, jusqu' à un maximum de 7 paires.

CHAPITRE I : Biologie du vers de terre

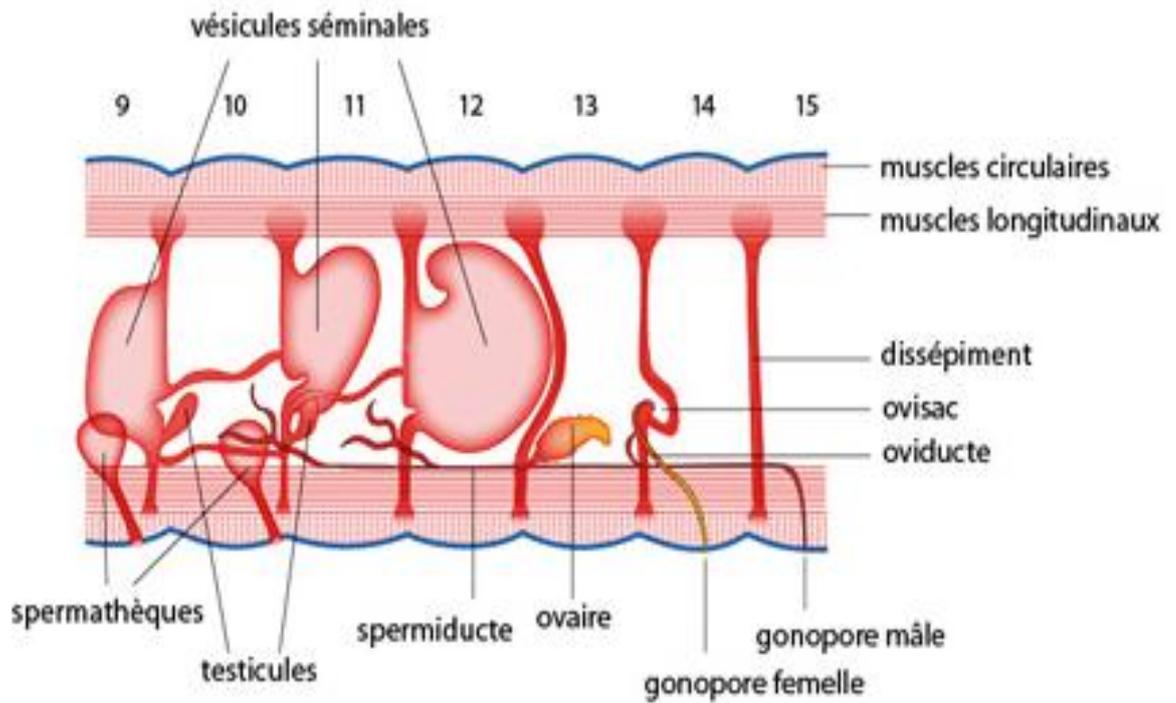


Figure 2 : Les organes reproducteurs (GAUER., 2007)



Photo 1. L'accouplement chez les lombrics (TREMBLAY, 2014)

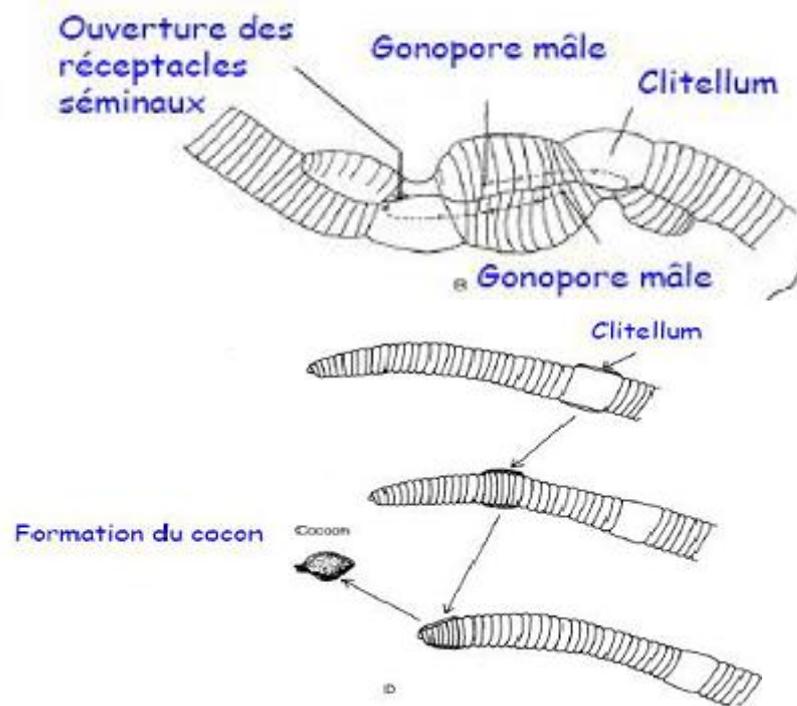


Figure 3 : La reproduction chez le ver de terre (GAUER, 2007)

I.3.2. Le cycle de vie :

Tous les vers de terre sont hermaphrodites. Un échange de spermatozoïdes a lieu lors d'un accouplement (Figure 4), qui se produit généralement à la surface du sol, lorsque les conditions sont favorables. Quelques jours plus tard, le clitellum (partie renflée formant une bague sur le corps d'un ver de terre adulte glisse le long de la partie antérieure du ver et le cocon, encore appelé œuf ou zygote, contenant des gamètes mâles et femelle, est émis dans le sol sous forme d'une capsule fermée aux deux extrémités.

Les cocons sont résistants aux conditions défavorables comme la sécheresse ou une modification de la température (Edwards et Bohlen, 1996). Parmelee et Crossley (1988) et Edwards et *al.* (1995) suggèrent qu'ils peuvent être, pour certaines espèces comme *L. rubellus*, les seules formes de vie existantes pendant les mauvaises périodes. Le dessèchement du sol provoque la déshydratation du cocon, ce qui peut retarder le développement embryonnaire (Evans et Guild, 1948b; Gerard, 1967).

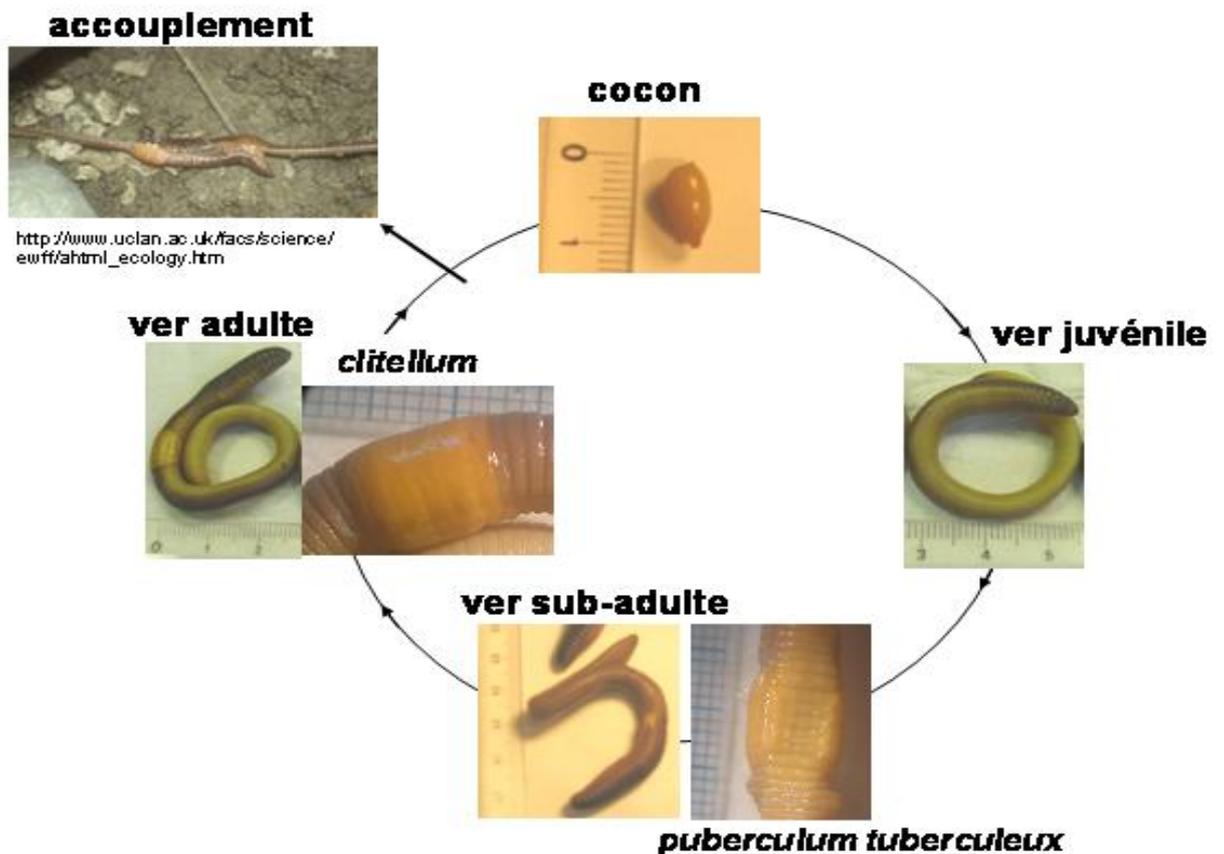


Figure 4 : Cycle de vie d'un individu *Lumbricus terrestris*

Certaines espèces sont bi-parentales, comme *L. terrestris* alors que d'autres peuvent se reproduire sans accouplement, par auto-fertilisation ou parthénogénèse (Sims et Gerard, 1999). La parthénogénèse est une reproduction monoparentale à partir d'un seul gamète alors que l'auto-fertilisation nécessite l'intervention des deux gamètes, mâles et femelles, apportés par le même individu. Les vers adultes produisent plusieurs cocons par an, en fonction de leur âge (Svendsen et *al.*, 2005) et des conditions dans lesquelles ils se trouvent (Lee, 1985). Une synthèse de plusieurs études par Satchell (1967) montre qu'*Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea longa* et *Octolasion cyaneum*, qui sont des espèces anéciques ou endogées, produisent entre 3 et 13 cocons par an alors que les épigés *L. rubellus*, *L. castaneus* et *Dendrobaena rubidus* sont capables d'en produire entre 42 et 106 par an. Le *L. terrestris* peut produire entre 10.1 et 25.3 cocons par an en fonction des conditions de température (Butt, 1991). Un ou plusieurs vers immatures, appelés juvéniles¹, éclosent quelques temps plus tard.

Butt (1993) montre que 20 % des cocons viables d'*O. cyaneum* produisent des jumeaux, comparé à 1 % pour *L. terrestris* et *A. longa*. Hartenstein et *al.* (1979) trouvent un nombre maximum de 11 vers par cocon pour *Eisenia fetida*. La durée d'incubation dépend des conditions

CHAPITRE I : Biologie du vers de terre

climatiques (Holmstrup et *al.*, 1996) et des conditions de vie de l'adulte qui a produit ce cocon (Phillipson et Bolton, 1977).

Le ver juvénile va progressivement acquérir des caractères sexuels secondaires externes liés à l'accouplement comme le puberculum tuberculeux ou les pores sexuels ; il sera alors au stade sub-adulte.

Le clitellum est un organe lié au processus de ponte, va ensuite se former et permettre au ver de devenir sexuellement mature pour pouvoir se reproduire à son tour ; le ver est alors adulte. Le temps de maturation varie beaucoup entre espèces et dépend des conditions de milieu (température, humidité, nourriture). Boström et Lofs (1996) rapportent qu'un juvénile *A. caliginosa* devient mature en 3 à 6 semaines. Au champ, *L. terrestris* devient mature généralement en 1 an (Lakhani et Satchell, 1970) alors qu'il ne lui suffira que de quelques mois pour atteindre la maturité sexuelle en conditions de laboratoire (Daniel et *al.*, 1996 ; Lowe et Butt, 2002).

Les vers de terre ont une durée de vie dépendante de l'espèce, de leur biotope et des conditions dans lesquelles ils vivent. En effet, un ver appartenant à l'espèce *L. terrestris* peut vivre plusieurs années en conditions de laboratoire (Lakhani et Satchell, 1970) alors qu'en conditions naturelles, et particulièrement en système cultivé, il est exposé à des risques qui diminuent son espérance de vie à quelques mois (Satchell, 1967). Suivant le groupe fonctionnel, les stratégies d'allocation de l'énergie varient entre les types r et k (Satchell, 1980). La stratégie de type r concerne les espèces à durée de vie courte donc plus spécifiquement les épigés, qui allouent tout d'abord leur énergie à la reproduction et à la croissance. A l'inverse, les stratégies k, principalement les endogés et les anéciques, privilégient la survie à la reproduction et à la croissance car ils ont une durée de vie plus longue.

La durée des quatre étapes fondamentales du cycle de vie des lombriciens (cocon, juvénile, sub-adulte et adulte), ainsi que la fécondité et la survie des vers dépendent fortement de l'espèce considérée mais aussi des conditions du milieu.

I.4. Nutrition

CHAPITRE I : Biologie du vers de terre

Les vers de terre se nourrissent par les plantes mortes (PFIFFNER et *al.*, 2007; SCHMUTZ, 2013). Ils peuvent manger les feuilles et les résidus de culture, Les bactéries, les algues, les protozoaires et même les champignons mycélium (HERGER, 2003 ; PELOSI, 2008), et même les nématodes et les rotifères (KÖNIG, 2007).

Selon BACHELIER (1978), les vers peuvent ingérer même le sol avec les résidus de culture. Cette ingestion de terre par les vers varie d'importance selon les espèces, mais aussi les sols, les saisons et la nature des matériaux végétaux.

I.5. Respiration

Les vers de terre ont une respiration cutanée qui n'est possible que si leur peau est maintenue humide (BACHELIER, 1978 ; HERGER, 2003). Les gaz respiratoires sont échangés à travers les vaisseaux sanguins qui se trouvent sous leurs peaux. Ils respirent d'oxygène dissous dans l'eau (HERGER, 2003), et leur respiration croît avec la température (BACHELIER, 1978).

Dans les cas extrêmes, les vers de terre perdent de l'eau par évaporation, la diurèse et la production de mucus, qui peuvent aller jusqu'à 70% de poids corporel sans avoir été endommagés (HERGER, 2003).

I.6. Prédateurs et parasites des vers

Selon BACHELIER (1978), les vers de terre sont très appréciés des taupes et des musaraignes qui contribuent grandement à la diminution de leurs populations et même les Chilopodes et les Staphylins participent dans leur régression. Les grenouilles, certaines limaces (Testacella) et surtout les oiseaux qui s'attaquent essentiellement aux vers de surface.

I.7. L'importance des vers de terre

L'importance des vers de terre est connue depuis des siècles. Au temps de la Grèce antique, le mode de vie et l'utilisation des vers de terre étaient bien connus et Aristote (350 av J.C) les appelait « Les intestins de la terre » probablement du fait qu'ils vivent et se déplacent sous la terre, "tout en la digérant" (Minnich, 1977 ; Kevan, 1985).

Charles Darwin est l'un des premiers scientifiques fondateurs de l'écologie des sols, a donné foi à la logique sur les effets bénéfiques des vers de terre sur les sols et la croissance des plantes, et donc sur la survie humaine. Il disait : « les vers de terre ont joué un rôle dans l'histoire du monde, plus important que ce que la plupart des gens peuvent le supposer ... et l'humus qui

CHAPITRE I : Biologie du vers de terre

couvre, comme un manteau, la surface de la terre a traversé plusieurs fois leur corps» (Darwin, 1881).

En effet, ils ont une importance primordiale dans la production primaire ; puisque qu'ils jouent un rôle essentiel dans la formation et l'entretien des sols fertiles et de leurs effets sur le recyclage des éléments nutritifs, le maintien de la fertilité et la structure des sols (Lee, 1985 ; James, 1991 ; Bohlen *et al.* , 1997).

A l'époque babylonienne, ils étaient utilisés en médecine comme des lumbagos (Michaelsen, 1930) et dans l'Empire égyptien, ils servaient d'indicateurs météorologiques (Righi, 1997). L'importance des vers de terre dans la vallée du Nil était reconnue, à tel point que Cléopâtre (69-30 av J.C) décréta le ver de terre comme un animal sacré (Minnich, 1977). Quelques côtés positifs des vers de terre ont été mentionnés, notamment pour certaines médecines et comme aliments pour certains peuples indiens ou comme appât pour la pêche (Feller *et al.*, 1997, 2003).

Les vers de terre sont omniprésents dans tous les sols capables de soutenir les plantes. Ils se reproduisent partout, mais rarement dans les déserts, lieux constamment enneigés, les sommets des montagnes et les zones manquant presque ou entièrement en sol et végétation.

Ils peuvent atteindre respectivement 1 million d'individus à l'hectare et 2 tonnes par hectare (Lavelle, 1983).

I.8. Importance écologique des vers de terre

Les vers de terre sont des éléments essentiels dans un écosystème (Ruppert et Barnes, 1994). Ils représentent de 60% à 80% de la biomasse animale du sol (Edwards et Bohlen, 1992; Rida, 1994). Le rôle écologique important des vers provient de leur comportement. Ils favorisent l'entrée d'eau, d'air et de racines en creusant d'importants réseaux de galeries, améliorant ainsi l'aération et le drainage du sol (Edwards et Bohlen, 1992; Rida, 1994; Efrogmson *et al.*, 1997). L'activité de brassage des sols résultant du déplacement des vers et de leur quête de nourriture favorise également le transport et le mélange des différents composants du sol. Les vers créent ainsi un milieu favorable pour les micro-organismes décomposeurs comme certains champignons et bactéries, augmentant aussi la fertilité des sols (Edwards et Bohlen, 1992; Rida, 1994). De plus, ils représentent une importante source de protéines pour de nombreux animaux, aussi bien vertébrés qu'invertébrés (Ireland, 1983; Cooke *et al.*, 1992; Rida, 1994; Efrogmson *et al.*, 1997).

I.9. Utilisation du ver de terre comme bioindicateur

En plus de leur vaste distribution et de leur importance écologique, plusieurs éléments font du ver de terre un bon candidat pour l'étude de la contamination de l'écosystème terrestre. Cet organisme est en effet en contact direct et constant avec le sol. La surface externe de son épiderme est très vascularisée, ce qui permet une entrée directe des contaminants présents dans le milieu, lors d'un processus très semblable à l'absorption pulmonaire chez les organismes supérieurs. Son mode alimentaire fournit également une autre porte d'entrée aux contaminants via l'ingestion de particules de sol (Lanno et *al.*, 2004). Ces animaux peuvent donc être contaminés par des éléments exogènes suite à une exposition cutanée ou par ingestion (Vijver et *al.*, 2003).

Plusieurs études ont démontré que les vers bioaccumulent et bioconcentrent les contaminants (Hopkin, 1989). Ces derniers peuvent alors être distribués vers des niveaux trophiques supérieurs via la chaîne alimentaire car les vers sont des proies de choix pour le nombreux animaux (Cooke et *al.*, 1992; Edwards et Bohlen, 1992). De plus, des modifications chimiques peuvent survenir dans le tractus alimentaire du ver pouvant rendre les contaminants plus disponibles pour les plantes. La décomposition et la minéralisation de vers morts peuvent aussi entraîner un relargage des contaminants bioaccumulés dans l'environnement (Ireland, 1975, 1983).

La reproduction du ver de terre peut aussi être altérée par la présence d'un stress dans son environnement. Le succès reproductif du ver de terre peut effectivement être compromis par l'action directe d'un contaminant, mais également par un changement de distribution énergétique en réponse à un stress (Morgan et *al.*, 1999). En effet, différents mécanismes au coût énergétique élevé sont mis en place chez l'organisme dans l'espoir de s'acclimater ou de s'adapter aux stress auxquels il est soumis (Postma et *al.*, 1995). De ce fait, la proportion d'énergie disponible chez l'animal pour la production de biomasse (croissance et/ou reproduction) peut être réduite. Les organismes invertébrés du sol peuvent donc être utilisés comme des éléments bioindicateurs de la contamination d'un écosystème terrestre (Morgan et Morgan, 1988 ; Dallinger, 1994). De plus, les vers de terre sont reconnus comme étant des outils de biosurveillance efficaces (Ribera et St-Denis, 1999), en particulier pour mesurer les effets des métaux (Morgan et Morgan, 1988; Edwards et Bohlen, 1992; Dallinger, 1994,), des pesticides et des HAPs (Edwards et Bohlen, 1992; Booth et al., 2000,...), des explosifs (Robidoux et al., 2000a à 2005) et des dioxines (Belmeskine et al., 2011, 2012).

II.1. Aperçu sur les pesticides

Au cours du siècle dernier, les activités anthropiques, poussées par les avancées technologiques, ont conduit à des augmentations des niveaux de contaminants organiques dans l'environnement. L'agriculture en est une source importante en raison de l'usage généralisé de pesticides pour protéger les cultures et améliorer leur rendement. En effet, depuis les années 40, l'agriculture s'est intensifiée et les pratiques ont profondément changé. Ainsi, la plupart des pesticides inorganiques (cuivre, arsenic, fer, soufre) ont progressivement été remplacés par des pesticides organiques. Ces derniers regroupent de nombreuses familles chimiques, avec des effets variés aussi bien dans leur action que dans leur devenir dans l'environnement (Lazartigues, 2010). La contamination des différentes matrices environnementales (eau, sol), a été largement rapportée dans la littérature (Tariq et *al.*, 2007 ; Azzouz et *al.*, 2011 ; Benbouzid et *al.*, 2012).

Devant le nombre considérable de pesticides (plus de 800 matières actives différentes dans près de 7000 formulations commerciales), les fabricants et utilisateurs les classent suivant la nature de l'espèce nuisible contre laquelle ils sont destinés. Les trois principales classes sont :

- **Les fongicides** : servant à combattre la prolifération des champignons phytopathogènes. Ils permettent de lutter contre les maladies cryptogamiques qui causent de graves dommages aux végétaux cultivés. Il existe plusieurs familles de fongicides, les plus importantes sont : carbamates (Carbendazine, Mancozèbe,...), triazoles (Bromuconazole, Triticonazole,...), dérivés du benzène (Chlorothalonil, Quintozène), dicarboximides (Folpel, Iprodione,...).

- **Les herbicides** : les plus utilisés des pesticides en tonnages et en surfaces traitées, ils permettent d'éliminer les mauvaises herbes adventices des cultures. Les plus représentées sont les carbamates (Chlorprophame, Triallate,...), les urées substituées (Diuron, Chlortoluron,...), les triazines (Atrazine, Simazine,...), les chlorophenoxyalcanoïques (2,4-D, MCPA, ...), les amides (Alachlore, Propyzamide,...).

- **Les insecticides** : C'est un grand groupe de pesticides utilisé pour éliminer les insectes porteurs de maladies et lutter contre les parasites qui infectent les plantes cultivées (Hodgson et *al.*, 2004). Ils se répartissent en trois grands groupes selon leur nature chimique soient ; substances minérales, molécules organiques d'origine naturelle ou produits organiques de synthèse qui sont de loin les plus utilisés actuellement. Autres que les organochlorés (DDT, Dieldrin, ...) qui sont bannis actuellement dans la plupart des pays du Nord, les insecticides

CHAPITRE II : Les pesticides

appartiennent à trois grandes familles chimiques : les organophosphorés (Diméthoate, Malation,), les pyréthrinoides de synthèse (Bifenthrine, Perméthrine, ...), et les carbamates.

II.2. Problèmes de pollution diffuse et de contamination

L'utilisation des produits phytosanitaires a permis d'augmenter considérablement les rendements agricoles en réduisant les pertes dues aux ravageurs des cultures, mais cela n'a pas été sans contrepartie. Dans les années 70, des premiers travaux ont montré que les produits phytosanitaires peuvent aussi être transférés vers les eaux de surface et les eaux de profondeur (Schiavon and Jacquin, 1973). Ceci enclenche une prise de conscience des pouvoirs publics dans le monde. En 1972, les organochlorés sont interdits d'utilisation aux Etats-Unis et en Europe et une réglementation concernant spécifiquement les produits phytosanitaires est mise en place dans les années 80.

II.3. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement

Malgré un souci croissant de protection de l'environnement, lors de l'utilisation des produits phytosanitaires, une certaine quantité de ces substances se retrouve dans l'environnement, principalement dans l'air par dérive sous forme de gouttelettes ou sur le sol (Pimentel, 1995). Ils peuvent alors être soumis à différents processus (Figure 5) (INERIS, 2005)

- la photo-dégradation (Marcheterre et *al.*, 1988);
- la dégradation par le phénomène d'hydrolyse aqueuse (Wolfe et *al.*, 1990) ou de biodégradation grâce aux micro-organismes présents dans le sol (Colin, 2000);
- la rétention dans le sol jusqu'à la formation de résidus liés (adsorption) (par exemple l'accumulation des fongicides à base de cuivre dans les sols);
- le transport vers d'autres compartiments environnementaux par des processus physicochimiques (volatilisation) ou via un vecteur, l'eau par lixiviation ou ruissellement ou les particules de sol (désorption) (Van Der Werf, 1996).

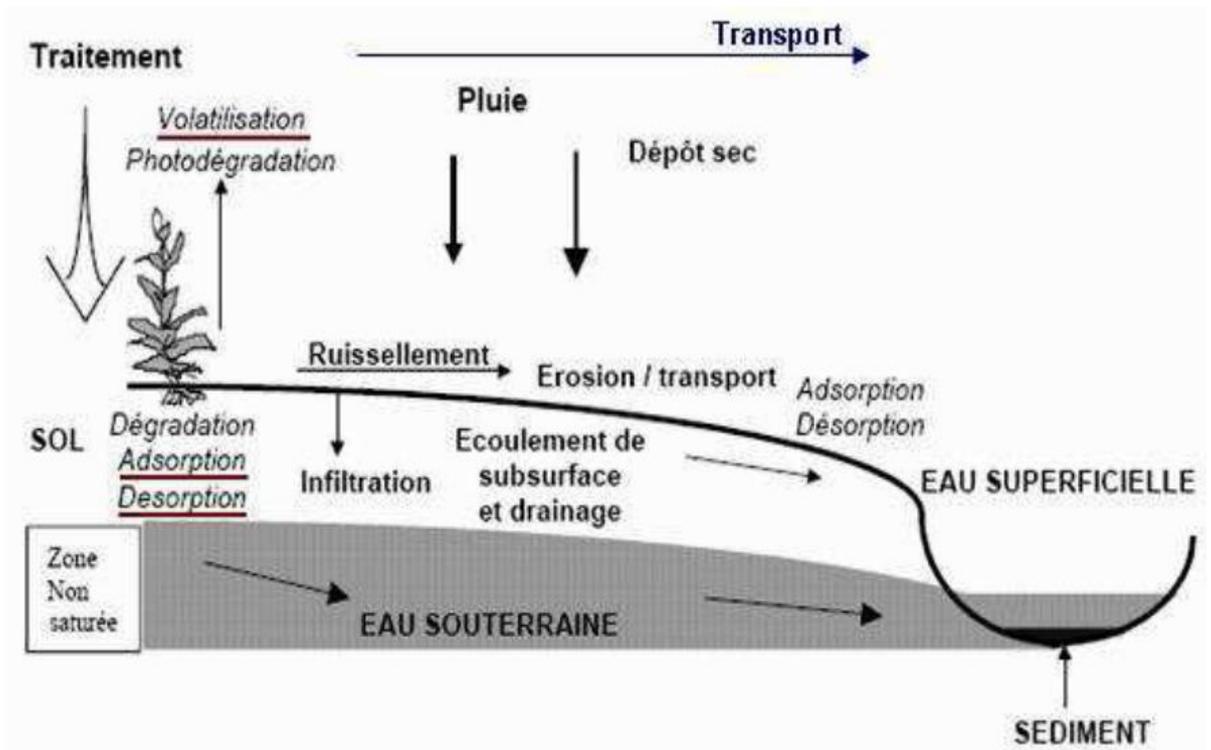


Figure 5: Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (INERIS, 2005).

II.4. Impacts des pesticides sur la santé humaine

L'évaluation des effets toxiques des pesticides est complexe car de nombreux paramètres sont considérés : la nature du composé, ses propriétés toxicodynamiques, la durée d'exposition et ses variations, etc (Capkin, Altinok, Karahan ,2006).

II.4.1. Cancérogénèse

Plusieurs études expérimentales ou épidémiologiques laissant supposer un risque important d'atteinte par certaines forme de cancer à la suite de l'exposition chronique à certains pesticides couramment utilisés. Les types de cancer les plus souvent cités sont cancer de cerveau, de poumons, de foie et de l'estomac, les carcomes des tissus mous, les lymphomes non hodgkiniens et la leucémie (Capkin, Altinok, Karahan, 2006).

CHAPITRE II : Les pesticides

II.4.2. Effet sur la reproduction

Les pesticides pouvant affecter la reproduction humaine en exerçant une toxicité directe sur les organes de reproduction ou en interférant avec la fonction hormonale (Capkin, Altinok, Karahan, 2006) .

Les pesticides sont des agents susceptibles de porter atteinte au processus de fertilité masculine via une toxicité testiculaire. Il a été aussi remarqué que chez la femme exposée à des pesticides , le risque de mortalité intra-utérin augmentait et la croissance fœtale diminuait, sans oublier les malformations congénitales et les anomalies du système nerveux central (Cuppen et al 2000).

II.4.3. Perturbation du système endocrinien

Selon l’OMS, un perturbateur endocrinien est une substance exogène ou un mélange qui altère les fonctions du système endocrinien et qui de ce fait induit des effets nocifs sur la santé d’un organisme intact, de ses descendants ou sous populations. Certains pesticides altèrent le développement de la fonction reproductrice et affectent la fertilité masculine en provoquant une oligospermie ainsi que l’autres effets épidémiologiques (cancer de la prostate, des testicules ,des seins etc) (Cuppen et al 2000).

II. 4. 4. Effets sur le système immunitaire

L’exposition à ces produits augmente les risques d’atteinte par des maladies infectieuses en plus des effets comme la chute de production d’anticorps et des réactions d’hypersensibilité retardée. D’autre part, plusieurs pesticides communément utilisés pourraient supprimer la réponse normale du système immunitaire humain à l’invasion de virus, de bactéries, de parasites et de tumeurs (Cuppen et al 2000).

II.4.5. Effets neurologiques

Les effets neurologiques constituent l’une des manifestations les plus fréquentes des intoxications aiguës des pesticides. Les effets aigus surviennent à des doses importantes chez les hommes (agriculteurs). Il s’agit de l’apparition d’un syndrome caractérisé par une paralysie des nerfs, une faiblesse musculaire et respiratoire et plus tard des troubles comportementaux, troubles neuro-dégénératifs (maladie de parkinson)(Cuppen et al 2000).

II. 5. Effets des pesticides sur les vers de terre

La nuisibilité de pesticides vis-à-vis des vers de terre dépend du type d'application (épandage de granulés, pulvérisation, etc.), de la période d'application, de la matière active qu'ils renferment, de la fréquence et de l'intensité d'application mais également du comportement des vers de terre et des conditions climatiques (Edwards et Bohlen, 1996). Les espèces épigées sont les plus exposées aux effets néfastes des pesticides car ils vivent à la surface du sol. Les anéciques, bien qu'ils se nourrissent en surface, et les endogés, semblent moins affectés par l'application de tels produits chimiques.

Bien qu'avant leur homologation, des tests de toxicité des pesticides soient réalisés sur les vers de terre, l'application de tels produits peut modifier la diversité taxonomique des communautés (Cluzeau et al., 1987 ; Cluzeau et Fayolle, 1988 ; Tebrügge et Düring, 1999). Même si peu d'herbicides semblent avoir un effet vraiment néfaste sur les populations de vers lorsqu'ils sont employés aux doses préconisées (Bachelier, 1978 ; Lee, 1985), certaines molécules utilisées comme fongicides, comme le Carbendazim (Cook et Swait, 1975) ou le Thiabendazole (Roark et Dale, 1979), sont reconnues comme pouvant avoir un effet dépressif sur les densités lombriciennes. L'application d'herbicides peut également provoquer des effets indirects importants car ils réduisent la quantité de ressource nutritive disponible pour les vers.

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

III.1. Lieu de travail

Notre travail de recherche était réalisé dans les laboratoires de phytopharmacie et d'écologie animale du département de biotechnologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Blida. L'étude histologique a été effectuée au niveau du laboratoire d'Anatomie pathologie du hôpital de Kolea. L'analyse physico-chimique a été réalisée au niveau de l'ITAF -Boufarik et INRAA –BERAKI – Algérie .

III.2. Matériel

Nos expériences étaient effectuées selon le protocole décrit dans le guide de l'organisation de coopération et de développement économique (OCDE) qui concerne les tests de reproduction des vers de terre.

III.3. Matériel biologique

Les vers de terre *Eisenia Fetida* utilisés dans notre étude proviennent d'un élevage réalisé au niveau de laboratoire de phytopharmacie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Blida. Les critères de sélection d'individus sont:

- Vers adultes, âgés de deux mois à un an et pourvus d'un clitellum.
- Leur poids est compris entre 250 et 600 mg.
- Les vers de terre sont mis en acclimatation 24 h avant chaque essai.

III.4. Matériel Chimique

Les pesticides testés dans notre étude appartiennent à la gamme utilisée dans la région agricole de Mitidja (Algérie). Ils ont été achetés au niveau d'un magasin de produits phytosanitaires. Notre choix s'est porté sur :

- DURSBAN, qui est un insecticide systémique appartenant à la famille des organophosphorés dont la dose pour toutes cultures est de 0,5 L/Ha.

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

- Propicol -70, qui est un fongicide systémique appartenant à la famille des dithiocarbamates dont la dose d'emploi pour les cultures maraîchères est de 200 à 280 g/hl.

A partir des doses concentrées citées ci-dessus, des dilutions de 1 :10, 1 :100 et 1 :1000 ont été effectuées pour application dans nos tests.

III.5. Méthodes de caractérisation du sol

L'échantillonnage est réalisé dans la région de Fouka (Tipaza), dans un jardin domestique, loin des zones industrielles ou agricoles. Les échantillons prélevés ont subi un tamisage afin de récupérer la fraction ≤ 2 mm qui sera utilisée dans notre test de reproduction. De plus, trois paramètres ont été analysés dans ces sols soient ; le pH, l'humidité et la capacité de rétention d'eau (WHC).

III.5.1. Détermination du pH

On laisse sécher une quantité de sol à température ambiante durant 12 heures. On confectionne une suspension du sol (contenant 10 g de sol) dans 50ml volume d'eau distillée. On agite énergiquement la suspension durant cinq minutes, puis on mesure le pH à l'aide d'un pH-mètre (HANNA instruments) (figure 6) (ISO, 1994).



Figure 6: mesure du pH

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

III.5.2. Détermination de l'humidité (H)

À t_0 , on pèse une cupule vide. Ensuite, on met une quantité de sol à l'intérieur et on pèse une 2^{ème} fois (Minitiale). Par la suite, la cupule avec sol est mise dans l'étuve pendant 18h à 105 °C. Le lendemain, on la repese (Mfinale).

$$H = \frac{M_i - M_f}{M_f} \times 100$$

-Mi : masse initiale

-Mf : masse finale

III.5.3. Détermination de la capacité de rétention d'eau (CRE)

Dans 3 pots de jardinage (troué), on met une quantité de sol et on ajoute de l'eau (la quantité d'eau est égale à la quantité de sol et un peu plus (sol bien mouillé). On met les pots sur un grillage et on laisse égoutter pendant 72h. Trois prélèvements de sol sont réalisés à ; 24h, 48h et 72h. On fait d'abord un quartage à la surface du pot, on inverse la surface de $\frac{1}{4}$ et on prend un échantillon plus profond. L'échantillon est pesé et séché à 105°C pendant 18h jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) se calcule comme suit (ISO, 1998) :

$$\text{CRE (en \% de masse sèche)} = (M_h - M_s) \times 100/M_s$$

Où : Mh : masse du sol humide

Ms : masse du sol sec

III. 6. Méthodes

III.6.1. Conditions expérimentales

- L'essai est conduit à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, avec des cycles réglés de lumière et d'obscurité (16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité),

- Les récipients expérimentaux ne sont pas aérés durant l'essai, mais les couvercles de ces récipients doivent autoriser les échanges gazeux avec l'atmosphère tout en limitant l'évaporation de l'humidité,

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

- La teneur en eau du substrat des récipients expérimentaux est maintenue constante tout au long de l'essai. Pour ce faire, on pèse périodiquement les récipients sans leurs couvercles et on compense toute perte avec de l'eau. La teneur en eau ne doit pas varier de plus de 10% par rapport à sa valeur au début de l'essai.

III.6.2. Mode opératoire

- *Groupes d'essai et témoins*

Selon le protocole décrit dans le guide de l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) qui concerne les tests de reproduction des vers de terre, on a déposé 4 vers par 300g de masse sèche de sol (récipient témoin et traité). Les vers sont lavés à l'eau et essuyés, puis déposés un instant sur un papier absorbant pour éponger l'excès d'eau.



Figure7 : préparation des vers de terre pour les groupes d'essai

Les récipients traités sont préparés de la même façon que les témoins, sauf qu'ils contiennent la substance d'essai.

- *Alimentation*

La nourriture est administrée après l'introduction des vers et l'ajout de la substance d'essai (pesticide) au sol il s'agit du crottin de cheval et la bouse de vache. Environ 1 g de nourriture sont parsemés à la surface du sol de chaque récipient et humidifiés avec de l'eau, la nourriture est dispensée une fois par semaine au cours des quatre semaines de l'essai.

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

Durée de l'essai et mesures

Le 28ème jour, les vers adultes vivants sont observés et comptés. Tout comportement inhabituel et changement morphologique (blessures ouvertes, par exemple) sont également notés. Tous les vers adultes sont ensuite retirés des récipients expérimentaux, comptés et pesés. Le transfert du sol renfermant les vers sur un plateau propre, avant l'évaluation, peut faciliter la recherche des adultes. Avant d'être pesés, les vers extraits du sol devraient être lavés avec de l'eau et déposés un instant sur un papier filtre qui absorbera l'eau excédentaire.

Si le sol a été retiré des récipients, il faut l'y remettre (sans les vers adultes mais avec tous les cocons engendrés). Le sol est ensuite incubé durant quatre semaines supplémentaires dans les mêmes conditions expérimentales, si ce n'est que la nourriture n'est administrée qu'une seule fois, au début de cette phase de l'essai.

À la fin de la seconde période de quatre semaines, on dénombre les vers juvéniles éclos des cocons dans le sol expérimental et les cocons. Tous les signes de nocivité ou les lésions observés sur les vers doivent aussi être enregistrés tout au long de la durée de l'essai.

- Techniques de comptage des vers juvéniles éclos des cocons

Les étapes de tri manuel des vers juvéniles :

On dépose les récipients expérimentaux dans un bain d'eau, dont la température initiale de 40°C est portée à 60°C. Après une vingtaine de minutes, les vers juvéniles devraient apparaître en amas à la surface du sol, d'où il est facile de les enlever et de les compter.



Figure 8 : dénombrement des vers juvéniles

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

- Pour les cocons

Dans un tamis, on verse le sol d'essai. Deux tamis dont les mailles mesurent 0,2 mm sont placés l'un au-dessus de l'autre. Le contenu du récipient expérimental est versé sur un tamis sous un puissant jet d'eau du robinet, de façon à retenir la majorité des jeunes vers et des cocons dans le tamis supérieur. Dès que la totalité du substrat est passée à travers le tamis, le tamis supérieur peut être rincé au-dessus d'un bol de façon à y recueillir les juvéniles et les cocons. On laisse reposer le contenu du bol jusqu'à ce que les cocons vides flottent à la surface et les cocons pleins ainsi que les juvéniles tombent au fond. Après quoi, l'eau du bol est vidée et les jeunes vers et les cocons sont transférés dans une boîte de Pétri contenant un peu d'eau. Alors compter les vers en les enlevant à l'aide d'une pince.



Figure 9 : dénombrement des cocons

III.6.3. Essais toxicologiques

III.6.3.1. Suivi du pourcentage de Mortalité

Le taux de mortalité a été déterminé en comptant le nombre de vers de terre morts par pot, par semaine.

III.6.3.2. Suivi du taux de Croissance

Après chaque période de traitement, les vers de terre sont retirés des terrariums, rincés à l'eau distillée, comptés et pesés. Le taux de croissance est déterminé en utilisant l'équation de Martin (1986) ;

$$\text{Vitesse de croissance} = \ln (P_t / P_0) \times 100$$

P_0 :est le poids moyen des vers de terre au début de l'exposition et poids.

P_t : est le poids moyen des vers de terre après la durée d'exposition.

III.7. Etude histologique

Après la période de traitement, les vers de terre de chaque lot sont choisis d'une manière aléatoire pour l'étude histologique. Les vers de terre sont mis à jeun pendant 48 heures afin que leur tube digestif soit vide.

De chaque ver, on prend une partie, en faisant une coupe juste derrière la région du clitellum, qu'on place dans une solution de formaldéhyde à 37 % pour l'étude histologique.

Les coupes sont observées grâce à un microscope photonique LEICA DM 1000.

III.7.1. Technique histopathologique

❖ *Principes de la technique*

C'est le recueil de fragments tissulaires qui sont découpés pour permettre la réalisation de fines tranches colorées à l'HES pour analyse morphologique au microscope optique.

➤ *L'analyse morphologique* est l'étude de l'architecture des tissus, des contours des cellules, des noyaux pour permettre un diagnostic.

Le plus souvent, le matériel histologique est fixé, inclus, coupé et coloré afin de pouvoir l'observer au microscope. Le matériel peut être prélevé par biopsie ou provenir d'une pièce opératoire ou d'une autopsie

➤ *Examen macroscopique* :

Première étape indispensable à l'étude de tout prélèvement

- Description, photographies, repérage des lésions.
- Préparation des prélèvements :
 - Repérage, orientation, étiquetage et identification
 - Choix du type de fixation ou de conservation.

La fixation :

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

Définition : immobiliser et conserver les cellules et l'architecture tissulaire, de façon aussi proche que possible de leur aspect à l'état vivant.

- Durées adéquate un jour.
- Choix du fixateur adéquat, fonction : Formaldéhyde= formole

Etapas après la fixation :

1- Préparation des blocs de paraffine

- ***Déshydratation***

C'est la première étape de circulation qui consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. Elle consiste à faire passer l'échantillon contenu dans les cassettes d'inclusion dans 7 (sept) bains d'alcool à concentration croissante 70°, 75°, 80°, 85°, 90°, 95° et 100° respectivement.

-L'intérêt de la déshydratation est d'éliminer le fixateur.

-Les échantillons sont par la suite passés dans deux bains de xylène pour subir l'éclaircissement.

-La durée de chaque bain est de deux heures.

- ***Imprégnation***

A cette étape l'espace qui était occupé par l'eau éliminée lors de la déshydratation va être remplacé par la paraffine liquéfiée ; donnant par conséquent une rigidité au tissu qui lui permet de garder sa forme interne au moment de la coupe.

L'imprégnation se fait par le passage des échantillons dans trois bains de paraffine liquéfiée à 54°C à une durée de deux heures pour chacun.

- ***Inclusion***

L'enrobage du tissu imprégné permet la confection des coupes.

Une quantité de paraffine est versée dans le moule. L'échantillon imprégné est déposé délicatement puis la partie de la cassette qui va servir de support sur le microtome est déposée au-dessus par la suite une autre quantité de paraffine est rajouté a travers les grilles de la cassette .la paraffine une fois solidifiée après refroidissement sur la plaque; le bloc est démoulé.

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

- Les coupes histologiques

Après avoir placé la cassette sur le support du microtome ; les blocs vont d'abord subir un dégrossissement afin d'éliminer le surplus de la paraffine (20 μ m). L'épaisseur de la coupe est réglée à 3 μ m pour obtenir un ruban de paraffine contenant le tissu.

- Etalement et collage des coupes sur des lames de verre

-Le ruban est par la suite étalé dans un bain marie à 37°C pour éviter les pliures.

-Les coupes dépliées sont récupérées du bain marie sur des lames ; ces dernières sont mises à sécher dans l'étuve à 66°C pendant 15 min.

- Coloration des lames

Les colorations réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée.

-La coloration utilisée est l'Hématéine-Eosine (H.E).

-Le montage : les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec utilisation d'une colle spéciale l'Eukitt.

CHAPITRE IV: Résultats et discussion

IV.1. Analyse physico-chimique du sol

Tableau 1 : Résultats de la caractérisation physico-chimique du sol

Paramètre		valeur
pH		8.29
C.E à 25°C (us)		144.76
Phosphore (ppm)		76.57
Potassium (ppm)		2.58
Granulométrie (%)	Argile	5.69
	Limon fin	0.27
	Limon grossie	5.75
	Sable fin	42.27
	Sable grossier	46.02
Carbone organique (%)		3.96
Matière organique (%)		6.81

Les résultats de l'analyse physico-chimique du sol sont illustrés sur le tableau 1. Il s'agit du ; pH, la conductivité électrique (CE), le phosphore (P), le potassium (K), la granulométrie ou texture et la matière organique.

Il ressort que le sol utilisé dans l'étude expérimentale est de texture sableuse, légèrement alcalin et présente une teneur riche en matière organique.

CHAPITRE IV: Résultats et discussion

IV.2. Suivi du pH du sol pendant l'essai

Tableau 2 : Les valeurs du pH du sol durant l'essai

Pesticides	valeurs du pH		
	t0	t28	t56
<u>Dursban</u>			
Témoin	8,58	8,59	8,42
C1		8,665	7,71
C2		8,87	7,76
C3		8,91	8,155
<u>Propicol</u>			
Témoin	8,58	8,56	8,53
C1		8,75	7,37
C2		8,78	8,52
C3		8,84	7,91

- CLUZEAU et *al.* (2004) montrent que les vers de terre (*EISENIA FETIDA*) préfèrent les milieux aux valeurs de pH non extrêmes (deux bornes : pH = 4,4 et 11).

Dans notre cas, le pH du sol témoin et traité reste légèrement alcalin durant la période d'essai.

IV.3. L'humidité du sol

Les vers de terre sont composés à 80-90 % d'eau lorsqu'ils sont pleinement hydratés (Lee, 1985, citée par Pelosi, 2008) et même s'ils peuvent supporter des pertes en eau, ils restent très sensibles aux faibles humidités. Lorsque les conditions de température et d'humidité du sol deviennent défavorables, la survie, la fécondité et la croissance des lombriciens sont affectées (Lee, 1985).

La température, l'humidité du sol sont les facteurs clés qui régulent l'abondance et l'activité des vers en milieu naturel (Satchell, 1967 ; Hartensein et Amico, 1983 ; Sims et Gerard, 1999 ; citée par Pelosi, 2008).

CHAPITRE IV: Résultats et discussion

Le taux de l'humidité trouve est :

$$H = \frac{M_i - M_f}{M_f} \times 100$$

$$\text{Humidité \%} = 7,806 \pm 0,027$$

IV. 4. La capacité de rétention d'eau (CRE)

- CRE (en % de masse sèche) = $(M_h - M_s) \times 100 / M_s$

$$\text{WHC \%} = 32,15 \pm 1,02$$

IV. 5. Evaluation de la croissance

Tableau 3 : les poids moyens des vers de terre durant l'essai

<u>pesticides</u>	<u>poids moyen (mg)</u>		
<u>Jours</u>	<u>0 jours</u>	<u>14^{eme} jours</u>	<u>28^{eme} jours</u>
<u>DURSBAN</u>			
<u>T</u>	<u>446,25±36,24</u>	<u>470,75±77,14</u>	<u>548±105,75</u>
<u>C1</u>	<u>532,75±81,95</u>	<u>505,25±53,50</u>	<u>681,75±65,14</u>
<u>C2</u>	<u>481,25±94,01</u>	<u>465,75±100,61</u>	<u>604,5±70,90</u>
<u>C3</u>	<u>563±41,06</u>	<u>484,5±66,42</u>	<u>678,5±54,41</u>
<u>PROPICOL-70</u>			
<u>T</u>	<u>476,25±45,22</u>	<u>470,75±37,48</u>	<u>521±50</u>
<u>C1</u>	<u>433,5±153,40</u>	<u>475,75±109,26</u>	<u>618,5±113,33</u>
<u>C2</u>	<u>453,25±145,20</u>	<u>471,75±170,12</u>	<u>676,25±170,82</u>
<u>C3</u>	<u>519±105,11</u>	<u>568,75±118,37</u>	<u>659,25±128,28</u>

CHAPITRE IV: Résultats et discussion

C : Concentration

T : Témoin

Dans le tableau 3, sont présentés les poids moyens des vers de terre durant l'essai, mesurés à t_0 , $t=14$ jours et $t=28$ jours d'exposition.

Concernant l'insecticide (Dursban), on remarque que les vers non exposés (témoin) ont gagné du poids donc leur croissance se fait normalement. Cependant les vers exposés au Dursban ont connu une perte de poids après 14 jours d'exposition, mais une augmentation à 28 jours.

Dans le cas du fongicide (Propicol), tous les vers de terre (exposés et non exposés) ont gagné du poids.

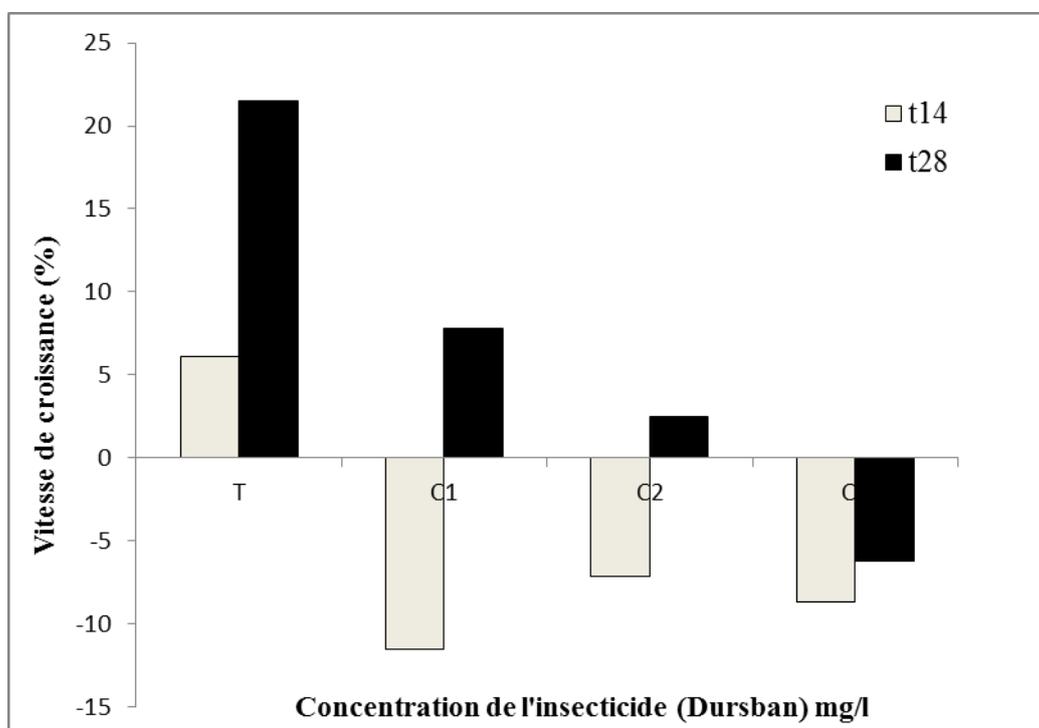


Figure 10 : Effet de concentrations croissantes de *DURSBAN* sur la vitesse de croissance des vers de terre *Eisenia fetida* au 14 et 28 jour.

La figure 10 met en évidence la variation de la vitesse de croissance des vers de terre en fonction du temps et en présence de concentrations croissantes de l'insecticide DURSBAN, Ainsi, nous remarquons que chez les vers de terre témoins le taux de croissance tend à augmenter en fonction du temps. En effet, à t_{28} jours, la vitesse de croissance est augmentée de 2 fois par rapport à t_{14} jours. Par contre, pour les vers exposés (C1, C2, C3), on remarque une diminution de la croissance après 14 jours, mais après 28 jours, les vers exposés à C1 et C2

CHAPITRE IV: Résultats et discussion

semblent avoir gagné du poids à l'inverse des vers exposés à C3 qui ont perdu du poids (diminution de la vitesse de croissance).

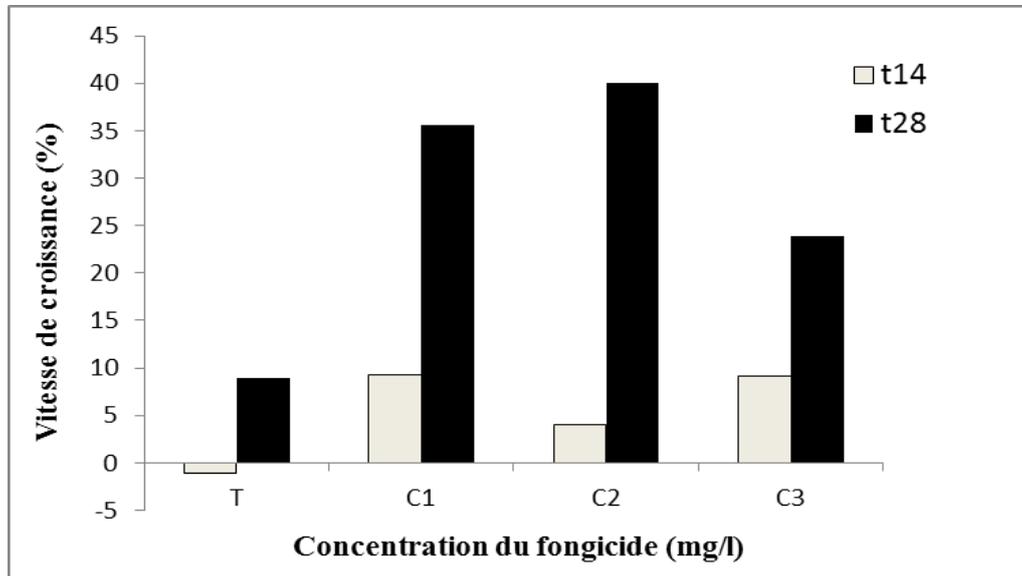


Figure 11 : Effet de concentrations croissantes de *Propicol -70* sur la vitesse de croissance des vers de terre *Eisenia fetida* au 14 et 28 jour.

La figure 11 illustre l'effet de concentrations croissantes (C1, C2, C3) de Propicol -70 sur la vitesse de croissance des vers de terre *Eisenia fetida* en fonction du temps, il ressort une augmentation (anormale) de la vitesse de croissance des vers exposés au fongicide par rapport au vers non exposés (témoin).

IV.6. Evaluation du pourcentage de mortalité

L'étude met en évidence l'effet de concentrations croissantes des pesticides (DURSBAN) et fongicides (Propicol -70) sur le pourcentage de mortalité des vers de terre. Ainsi, aucune mortalité n'a été observée durant la période d'exposition (14 et 28 jours) par rapport aux témoins.

IV.7. Evaluation des paramètres de reproduction

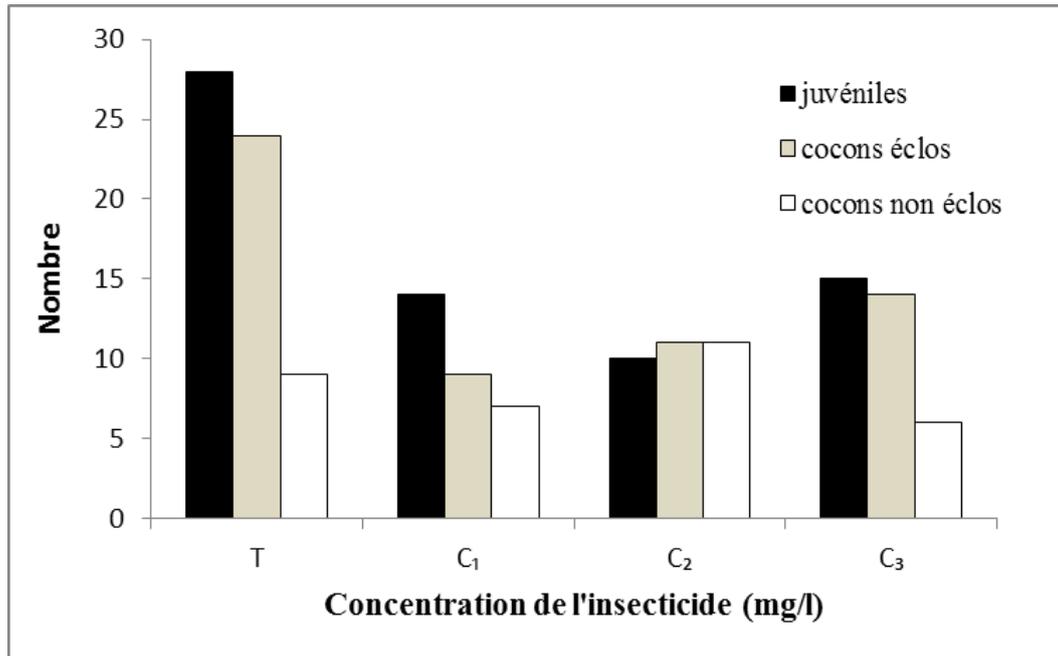


Figure 12 : Effet de l'insecticide DURSBAN sur les paramètres de reproduction des vers de terre *Eisenia fetida*

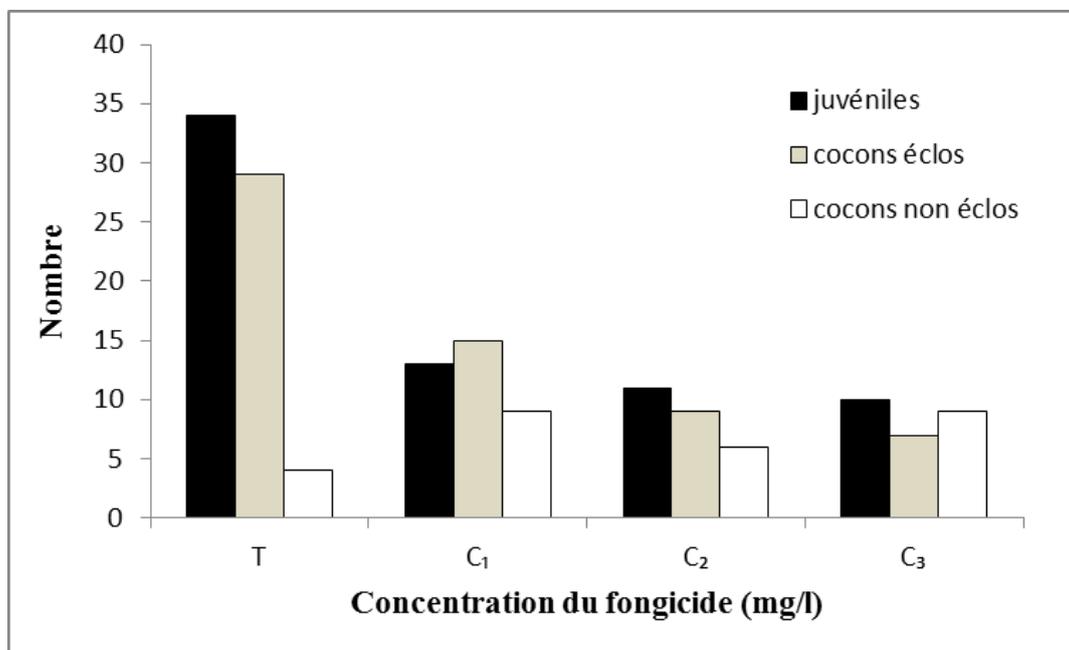


Figure 13: Effet du fongicide Propicol-70 sur les paramètres de reproduction des vers de terre *Eisenia fetida*

CHAPITRE IV: Résultats et discussion

Les figures 12 et 13 représentent les paramètres de reproduction des vers de terre *Eisenia fetida* exposés à l'insecticide DURSBAN et le fongicide PROPICOL-7, respectivement. Ces paramètres soient : le nombre de juvéniles, le nombre de cocons éclos et non éclos sont évalués (par dénombrement) à la fin du cycle de reproduction des vers c'est-à-dire après 56 jours.

Il semble que, dans les deux figures, que les valeurs des paramètres de reproduction des vers exposés aux différentes concentrations de pesticides étudiés ici sont inférieures à celles du témoin.

IV.8. Résultats de l'étude histologique

La figure 14 met en évidence l'aspect normal des gonades reproductrices des vers de terre (*Eisenia fetida*). Chez les témoins, nous observons toutes les structures normales de l'ovaire (A) et le testicule (B). On ne peut pas comparer la figure que nous avons avec notre témoin parce que les coupes histologiques de ce dernier ne sont pas bien faites et nous n'arrivons pas à visualiser toutes les structures de ces deux organes.

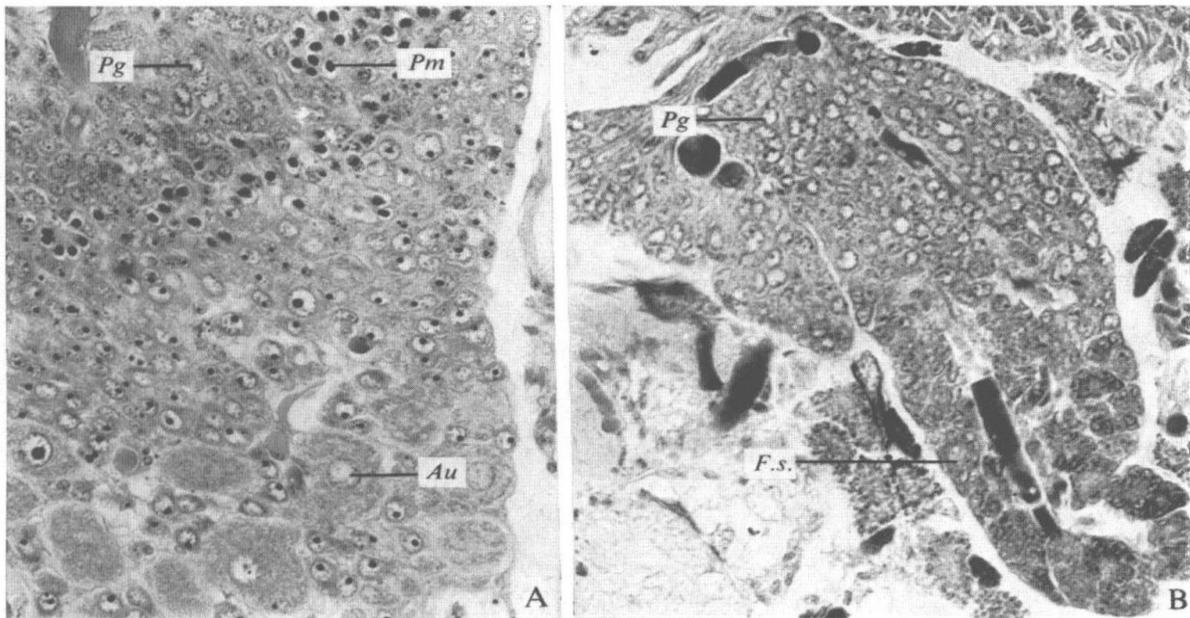


Figure 14 : Gonades normales. (A) Ovaire (fragment); (B) testicule. Pg, Protogonies; Pm, préméioses; Au, auxocytes; F.s., follicules spermatiques. Hématoxyline ferrique

Le traitement avec les pesticides pendant 28 jours provoque certaines modifications au niveau de ces organes. Ainsi, à la concentration (C3), nous avons mis en évidence, une forme différente à celle du témoin. Ces altérations sont également observées chez les traités par la concentration

CHAPITRE IV: Résultats et discussion

(C2). Pour la plus forte concentration des pesticides (C3), les altérations semblent plus importantes, par rapport au témoin.

Les planches (15, 16, 17) illustrent les coupes longitudinales effectuées au niveau de l'appareil reproducteur, chez les vers de terre traités par les pesticides (DURSBAN, PROPICOL-70).

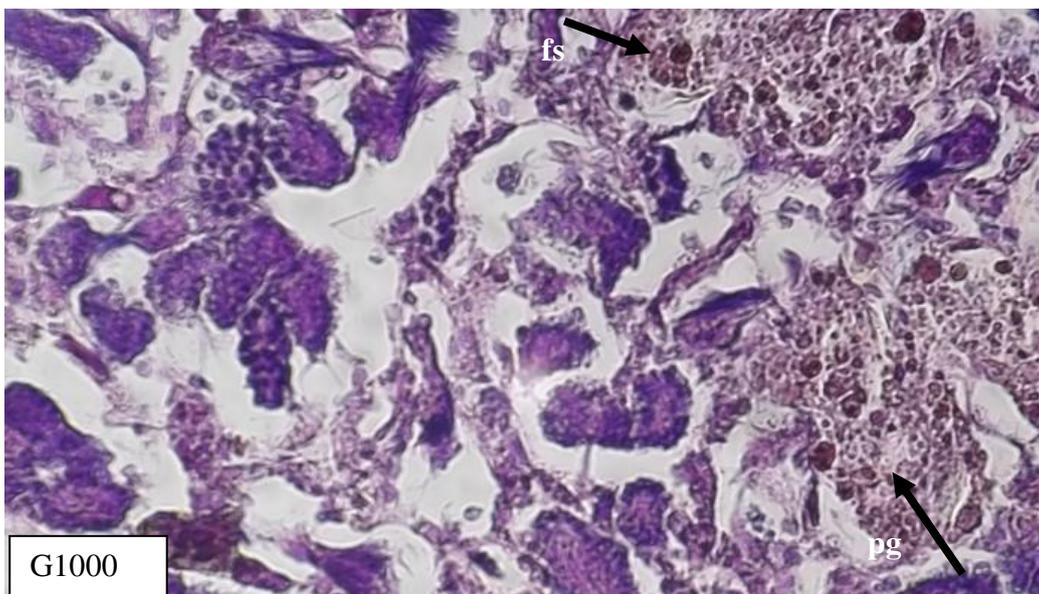
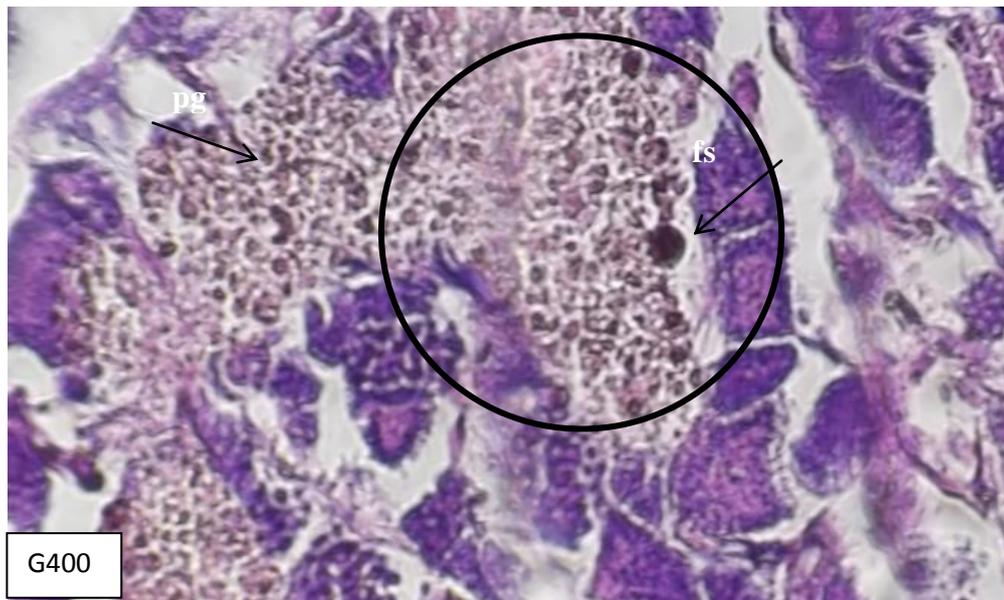


Figure 15 : coupe histologiques au niveau des testicules après 28 jours de traitement aux concentrations croissantes de pesticides *DURSBAN* (C3)

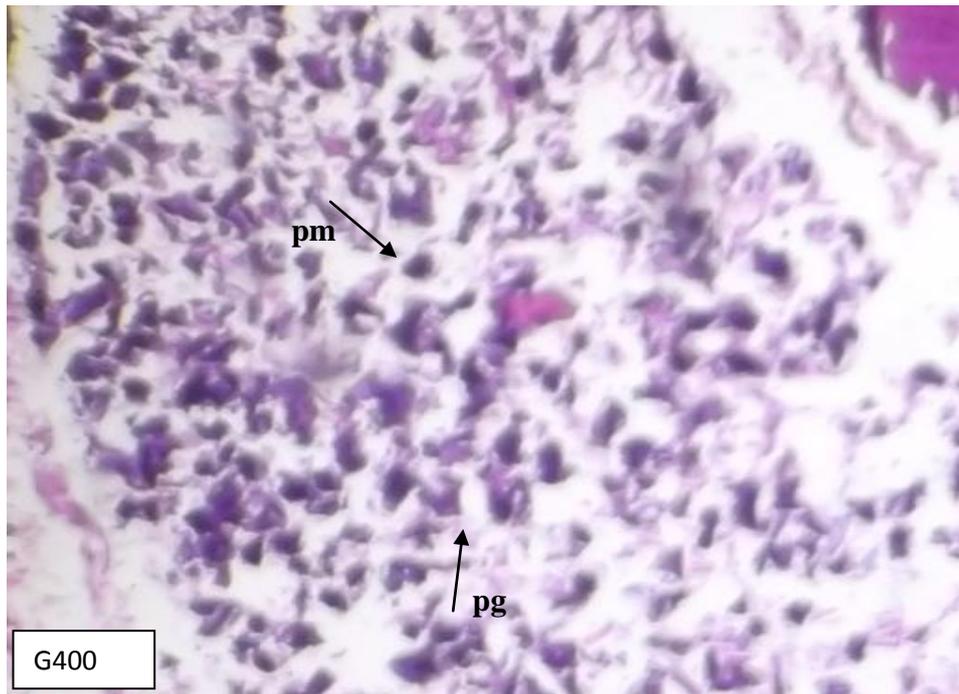


Figure 16: coupes histologiques au niveau des ovaires après 28 jours de traitement aux concentrations croissantes de pesticides PROPICOL-70(C2)

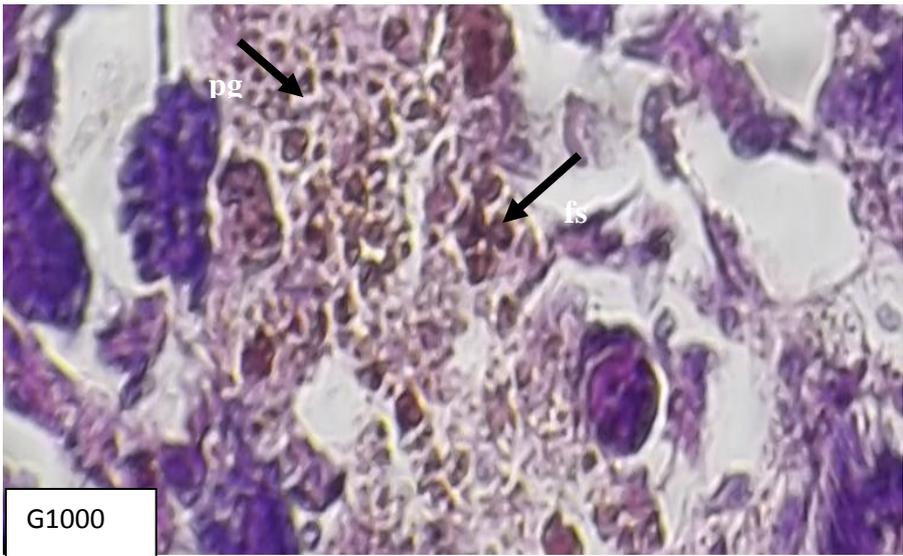
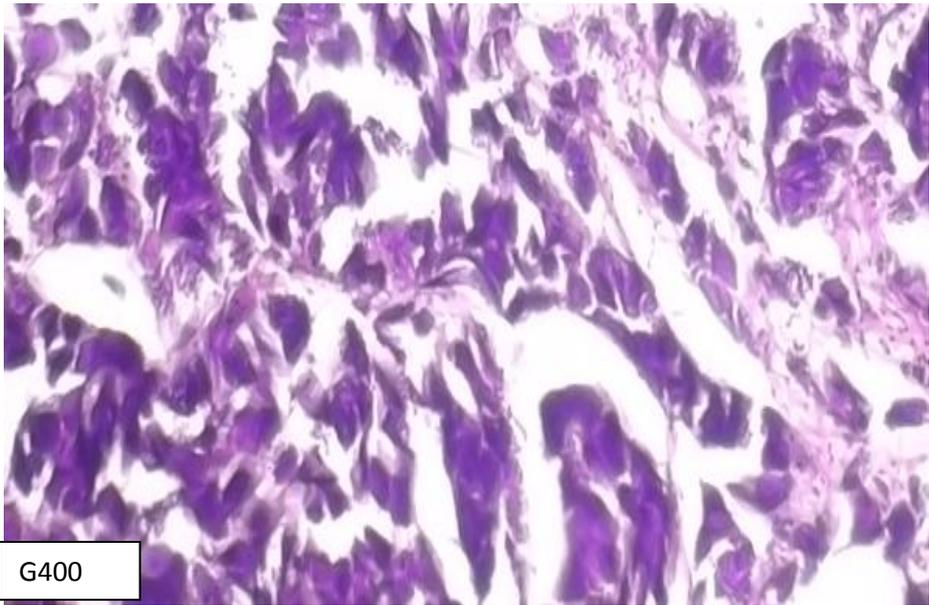


Figure 17: coupes histologiques au niveau des testicules après 28 jours de traitement aux concentrations croissantes de pesticides DURSBAN (C3)

CHAPITRE IV: Résultats et discussion

Discussion

Les vers de terre sont utilisés comme bioindicateurs pour évaluer la santé du sol en raison de leur disponibilité, facilité de manipuler et leur capacité d'améliorer la structure et la fertilité du sol (Mahajan *et al.*, 2007 ; Curry *et al.*, 2008 ; Muthukaruppan *et Ganasekaran*, 2010).

À ce jour, un certain nombre d'essais normalisés utilisant la mortalité, la reproduction et le comportement des vers de terre sont disponibles (Little, 1990 ; Doving, 1991 ; Scherrer, 1992).

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur les effets de l'insecticide DURSBAN et du fongicide PROPICOL-70 sur les vers de terre à l'aide d'une approche qui consiste en des sols enrichis en laboratoire où les critères d'évaluation ; la croissance, la mortalité et les paramètres de reproduction ont été mesurés.

Avant de commencer l'exposition, nous avons réalisé une caractérisation physico-chimique de notre sol. En effet, la qualité et la quantité de la matière organique du sol (Curry, 1998) ainsi que le type de sol, le pH et les conditions climatiques sont des facteurs du milieu qui gouvernent fortement la présence des communautés lombriciennes dans les différents biotopes (Lofs-Holmin, 1982 ; Whalen *et Parmelee*, 1999). Eventuellement, La température et la teneur en eau du sol sont les variables environnementales clés qui influencent la croissance, la survie, la fécondité et l'activité des lombriciens (Satchell, 1967 ; Hartensein *et Amico*, 1983 ; Sims *et Gerard*, 1999).

La température

Lorsque les conditions de température du sol deviennent défavorables (baisse ou hausse trop importante de la température), la survie, la fécondité et la croissance des lombriciens sont affectées (Lee, 1985). L'*E. fetida* vit dans une gamme de température expérimentale de - 2 à + 40 °C (Lee, 1985).

L'élevage des vers et nos tests sont réalisés dans des conditions (température) de laboratoire entre 20°et 24°C. Ce qui exclut tout effet de la température du milieu sur la croissance ou la reproduction de nos vers de terre.

CHAPITRE IV: Résultats et discussion

Le pH

Les vers de terre sont généralement absents dans des sols très acides ($\text{pH} < 3.5$) et sont peu nombreux dans les sols à $\text{pH} < 4.5$ (Curry, 1998). Il existe un pH optimal pour chaque espèce (Edwards et Bohlen, 1996). Les travaux de Bhatti (1962) et Bachelier (1978) définissent des valeurs limites de pH. Nos résultats obtenus sont en accord avec ceux de CLUZEAU et al. (2004) qui montrent que les vers de terre *EISENIA FETIDA* préfèrent les milieux aux valeurs de pH non extrêmes (deux bornes : $\text{pH} = 4,4$ et 11).

La matière organique.

Les populations lombriciennes se nourrissent de matière organique plus ou moins décomposée, à la surface ou dans le sol. Dans les parcelles agricoles, la quantité, la qualité et la localisation des matières organiques sont des facteurs importants pour les vers de terre et dépendent surtout, des plantes cultivées. Lofs-Holmin (1983) a rapporté que la qualité et la quantité des résidus de culture retournés dans le sol sont essentielles pour le développement et la croissance des vers de terre. Ces résultats sont en accord avec notre résultat.

Concernant nos tests de toxicité, la mortalité des vers de terre est le premier paramètre abordé. Nos résultats ont montré que celui-ci n'a pas été affecté (même aux plus fortes concentrations) par l'insecticide DURSBAN et le fongicide *PROPICOL -70*, car aucune mortalité n'a été observée au cours de la période d'exposition.

Le second paramètre mesuré dans notre étude est le taux de croissance des vers de terre. Il ressort de nos résultats que l'insecticide réduit la vitesse de croissance pour les trois concentrations (Fig10). Ce résultat est en accord avec les travaux de Mostert et al. (2000) qui a testé l'effet de cinq pesticides (le Cyfluthrine, le Carbaryl, le Chlorpyrifos, le Fipronil et l'Imidaclopride) sur le ver de terre ou encore ceux de Gomez-Eyles et al. (2009) qui a testé la toxicité d'un mélange de pesticides.

Cependant, le fongicide semble ne pas avoir un effet significatif sur la croissance (Fig.11) ce qui explique qu'il n'est pas toxique à ces concentrations (dilutions) choisis dans notre test. De plus, il est bien connu que les pesticides n'ont pas le même effet sur la biomasse terrestre. En effet, Hedde. et al., (2012) ont démontré que tous les traitements par les pesticides ne produisent pas le même effet et que les insecticides ont plus d'incidence sur les vers de terre que les herbicides ou les fongicides.

CHAPITRE IV: Résultats et discussion

D'un autre côté Booth et O'Halloran (2001) et Zhou et *al.* (2007), ont montré que la croissance des vers de terre est plus sévère au stade juvénile qu'au stade adulte ceci pourrait expliquer nos résultats concernant l'effet de *DURSBAN* et *PROPICOL-70* sur la croissance des vers de terre.

Concernant l'effet des pesticides sur la reproduction des vers de terre *Eisenia fetida*, la réaction est pratiquement semblable vis-à-vis de l'insecticide et du fongicide (fig.12 et fig. 13). En effet, les nombres de juvéniles et des cocons éclos sont plus élevés dans les témoins (absence de pesticides) par rapport aux sols traités par les pesticides à différentes concentrations, dans les deux cas. Nos résultats sont en accord avec ceux de Pelosi C *et al.*, (2013) qui ont rapporté que la réduction de l'usage des pesticides se traduit globalement par l'augmentation du nombre de vers de terre.

L'exposition aux pesticides peut produire des perturbations biochimiques, histologiques ou morphologiques, se traduisant par des altérations spécifiques d'un organe, d'un système ou d'une fonction (système hématopoïétique, fonction de reproduction...) chez des animaux et peuvent mener à un déséquilibre écologique. Ces effets varient selon l'intensité, la voie, la fréquence et la durée de l'exposition mais aussi en fonction de l'espèce, du sexe, de l'âge et de l'état de santé des populations exposées. Ils peuvent être réversibles ou irréversibles, immédiats ou différés (Luo et *al.*, 1999 ; Rao et *al.*, 2003, Moussavou Moudouma, 2010)

Selon Morgan et Turner (2005) et Oluah et *al.* (2010), les observations histologiques des tissus et cellules sont des outils précieux pour évaluer les effets toxiques des contaminants tels que les métaux lourds sur plusieurs espèces dont les vers de terre. C'est dans ce cadre la que se situe notre étude. Ainsi, les vers de terre exposés au pesticide dans le sol peuvent subir des effets toxiques multiples tels que des modifications au niveau de l'appareil reproducteur.

Gao et *al.* (2013) qui a testé l'effet d'un fongicide (Triazole) sur des vers de terre *Eisenia fetida*, et qui a également mis en évidence des nécroses tissulaires chez cet organisme.

Après 28 jours de traitement, nous avons obtenu les résultats présents dans les photos (15-17). Ces dernières montrent que les organes reproducteurs sont endommagés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Les vers de terre sont des organismes dont le rôle est primordial, non seulement dans l'environnement en général, mais également dans l'agriculture. Plusieurs espèces de vers de terre sont devenues des organismes modèles pour la recherche en écologie, toxicologie, physiologie ou encore la biologie reproductrice.

Dans ce travail, il nous est apparu important de commencer notre travail par une étude physiologique qui nous a permis de reconnaître les différentes parties du corps de vers terre *EISENIA FETIDA*, et un aperçu sur les pesticides et leur effet sur les vers de terre et sur la santé humaine.

Très peu de travaux se sont penchés sur le devenir des pesticides et leurs effets sur les vers de terre dans notre région. Dans cette étude, nous nous sommes proposés d'évaluer la toxicité potentielle des pesticides, insecticides (*DURSBAN*) fongicides (*PROPICOL-70*) sur les vers de terre *EISENIA FETIDA*. Pour cela, nous nous sommes basés sur plusieurs approches : une approche toxicologique dans laquelle nous avons évalué le pourcentage de mortalité, le taux de croissance, et la reproduction. Pour mieux détailler nos résultats, il nous a semblé judicieux de nous pencher sur l'aspect histologique qui rend compte sur les éventuelles altérations des organes reproducteurs chez l'organisme traité par les pesticides.

Dans un premier temps, il ressort de nos résultats que ces pesticides n'ont aucun effet sur le pourcentage de mortalité, pour les concentrations (dilutions) testées. En revanche, aux plus fortes concentrations de *DURSBAN* ET *PROPICOL -70* (C3), nous avons noté une diminution du taux de croissance. Cette perturbation du métabolisme globale s'est manifestée notamment par la diminution du nombre de vers juvéniles et des cocons qui est lui-même révélateur d'une perturbation du métabolisme au niveau des appareils génitaux en général.

L'étude histologique vient ainsi confirmer l'extrême sensibilité du ver de terre vis-à-vis des polluants de l'environnement en général et met en évidence la toxicité des pesticides.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Perspectives

A l'avenir, il serait judicieux de continuer des recherches dans les axes suivant:

- Réalise une étude approfondie sur l'histologie de gonades reproductrices chez les vers de terre.
- Réalise des recherches de génétique et de biologie moléculaire pour mieux connaître ces espèces.
- Effectuer une étude comparative avec notre résultat en utilisant d'autres pesticides, seuls ou en mélange.
- Etude de biomarqueurs de stress chez les vers de terre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T. H., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 179, 1-12.

Azzouz, Z., Berrebbah, H., Djebbar, MR., 2011. Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. *African Journal of Microbiology Research*, 5(20), 3243-3250.

BACHELIER G., 1978. La faune des sols son écologie et son action. O.R.S.T.O.M, Paris, 400 p.

Benbouzid, H., Berrebbah, H., Berredjem, M., Djebbar, M.R. 2012. Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium* sp. With special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 94(3), 557-565.

Belmeskine. H, Sami Haddad, Louise Vandelac, Sébastien Sauvé and Michel Fournier. Toxic effects of PCDD/Fs mixtures on *Eisenia andrei* earthworms. *J. Ecotoxicology and Environmental Safety*. (2012), doi :10.1016/j.ecoen.2012.02.008.

Belmeskine.H, Sami Haddad, Louise Vandelac, Michel Fournier. *In vitro* effects of PCDDs/Fs on Nk-like cell activity of *Eisenia andrei* earthworms. *Journal of Xenobiotics* (2012); 2:e1, doi:10.4081/xeno2012.e1.

Belmeskine.H, Pauline Brousseau, Sami Haddad, Louise Vandelac, Michel Fournier. Effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans on phagocytic response of *Eisenia andrei* cœlomocytes. *Journal of Xenobiotics* (2011); 1:e6, doi:10.4081/xeno.2011.e6.

Blakemore R.J., 1999. The diversity of exotic earthworms in Australia. a status report. Proceedings of “The Other 99%”, edited by W. Ponder and D. Lunney, Transactions of the Royal Zoological Society of NSW. 182-187 pp.

Blakemore R.J., 2000 d. Ecology of earthworms under the “Haughley Experiment” of organic and conventional management regimes. *Biological Agriculture & Horticulture*. 18 (2): 141-159.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bohlen P., McDonnell M.J., Pickett S.T. A., Pouyat R.V., Parmelee R.W., Carreiro M., Groffman P., Zipperer W.C. et Medley K., 1997. Ecosystem processes along urban-to-rural gradients. *Urban Ecosystems*. 1: 21-36.

Booth, L. H., V. J. Heppelthwaite et K. O'Halloran. 2000. "Growth, Development and Fecundity of the earthworms *Aporrectodea caliginosa* after Exposure to two Organophosphates". *New Zealand Plant Protection*, vol. 53, p. 221-225.

Boström U. et Lofs-Holmin A., 1996. Annual population dynamics of earthworms and cocoon production by *Aporrectodea caliginosa* in a meadow fescue ley. *Pedobiologia*. 40: 32–42.

Bouché M.B., 2003. Vers de terre, de Darwin à nos jours. Un révélateur heuristique. Académie des Sciences et lettres de Montpellier. Séance du 02/06/2003, Conférence n°3826. Montpellier, France.

Bouche, M.B., 1977. Stratégies lombriciennes. *Bull. Ecol., Paris*, 25: 122-132.

Bouillin J.P., 1986. Le bassin Maghrébin: une ancienne limite entre l'Europe et l'Afrique à l'ouest des Alpes. *Bull Soc. Géol. France*, 8^e sér., 2 : 547-548.

Butt., 1993. Utilisation of solid paper mill sludge and spent brewery yeast as a feed for soil-dwelling earthworms. *Bioresource Technol.* 44: 105-7.

Capkin E, Altinok I, Karahan S ,2006. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, or organochlorine pesticide, to rainbow trout. *Chemosphere* vol 64 :1793-1800.

Cluzeau D. et Fayolle L., 1988. Impact des traitements pesticides sur les peuplements lombriciens en viticulture champenoise. *CR. Acad. Agric. France*. 74 : 105-112.

Cluzeau D., Blanchard E., Peres G., Ablain F., Cuendet G., Fayolle L. et Lavelle P. 2005. Faune du sol et Lombriciens dans les sols tempérés agricoles. In : M.C. Girard, C. Walter, J.C. Rémy, J. Berthelin, J.L. Morel (Eds). *Sols et Environnement. Cours, exercices et études de cas*. Paris, Dunod. 386-407 p.

Cluzeau D., Lebouvier M., Trehen P., Bouché M. B., Badour C. et Perraud A., 1987. Relations between earthworms and agricultural practices in the vineyards of Champagne. Preliminary results. *On Earthworms*. Mucchi, Modena, 465-484 pp.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Colin F., 2000. Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires. Cas de l'Atrazine dans le bassin versant de Sousson (Gers, France). Unité mixte Cemagref-ENGREF. Structure des systèmes spatiaux. 233 p.

Cooke, A. S., P. W. Greig-Smith et S. A. Jones. 1992. "Consequences for vertebrate wildlife of toxic residues in earthworm prey". In *Ecotoxicology of earthworm*, P. W. Greig-Smith, H. Becker, P. J. Edwards and F. Heimbach (eds). Amdover (UK): Intercept. P. 109-115.

CPP, 2002. Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. Comité de la Prévention et de la Protection. 47 p.

Cuppen J.G.M, Van den Brink P.J., Camps E., Uil K.F., Brock T.C.M. 2000. Impact of the fungicide Carbendazim in fresh water microcosms. Water quality breakdown of particulate organic matter and responses of macro invertebrates. *Aquat Toxicol* Vol 48 :233-250.

Dallinger, R 1994. "Invertebrate organisms as biological indicators of heavy metals pollution". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 14, no. 2, p. 27-31.

Darwin C.R. 1881. The formation of vegetable mould, through the action of worms with observations in their habits. London: John Murray.

Decaëns T., 2010. Macro ecological patterns in soil communities. *Global Ecol. Biogeogr.* 19, 3: 287-302.

Doving, K.B., 1991. Assessment of animal behaviour as a method to indicate environmental toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100(C), 247-252.

Edwards C.A. et Bohlen P. J., 1996. *Biology and Ecology of Earthworms* (3rd ed). Chapman & Hall, London, 426 pp.

Edwards, C. A et P. J. Bohlen. 1992. "The effects of toxic chemicals on earthworms" . *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 125, p. 23-100.

Edwards, C. A. et Bohlen, P. J., 1996. *Biology and Ecology of Earthworms* 3rd ed. Chapman and Hall, London, 426 pp.

Edwards, C. A., Bohlen, P. J., Linden, D. R. et Subler, S., 1995. Earthworms in agroecosystems. In: Hendrix, P. F. (eds), *Earthworm ecology and biogeography in North America*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 185-213.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Efroymsen, R. A, M. E. Will, G. W. Suter II. 1997. "Toxicological benchmarks for contaminants of potential concern for effects on soil and litter invertebrates and heterotrophic process". Rapport Es/ErfTm-126/R2. Oakridge National Laboratory, Oakridge, Tennessee, USA

Evans A.C. et Guild W. J., 1948 b. Studies on the Relationships Between Earthworms and Soil Fertility, Annals of Applied Biology. Vol. 35: 471–484.

Evans, A.,C., et Guild W., J., 1948. Studies on the relationships between earthworms and soil fertility. IV - On the life cycles of some British Lumbricidae. V - Field populations. Ann. Appl. Biol., 35, 4, 471-484 et 485-493.

Feller C. et Beare M.H., 1997. Physical control of soil organic matter in the tropics. Geoderma.79: 69-116.

Feller C., Brown G.G., Blanchart E., Deleporte P. et Chernyanskii S.S., 2003. Charles Darwin, earthworms and the natural sciences: various lessons from past to future. Agriculture, Ecosystems and Environment. 99: 29-49 pp.

GAUER M., 2007-Biologie animale. Université Louis Pasteur Strasbourg, Strasbourg. 68p.

Gomez-Eyles J.L., Svendsen, C., Lister, L., Martin, H., Hodson, M., Spurgeon, J.D., 2009. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditiselegans* and *Eiseniafetida*. Ecotoxicol Environ Saf, 72, 71-79.

Hartensein R. et Amico L., 1983. Production and carrying capacity of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. in culture. Soil Biology and Biochemistry. 15: 51-54

Hassink J., Whitmore A.P. et Kubat J., 1997. Size and density fractionation of soil organic

Henri AYRAL zoologie agricole j. B. BAILLIERE&FILS p 46.

HERGER P., 2003- regenwürm. Zentrum für angewandte Ökologie Schattweid, Natur-Museum Luzern. Wolhusen. 49 p.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hodgson, D.A., Vyverman, W., Verleyen, E., Sabbe, K., Leavitt, P.R., Taton, A., Squier, A.H., Keely, B.J., 2004. Environmental factors influencing the pigment composition of in situ benthic microbial communities in east Antarctic lakes. *Aquatic microbial ecology*, 37, 247-263.

Holmstrup M., Ostergaard I.K., Nielsen A. et Hansen B.T., 1996. Note on the incubation of earthworm cocoons at three temperatures. *Pedobiol.* 40: 477-478.

Hopkin, S. P. 1989. Ecophysiology of meta/s in terrestria/ invertebrates. London (UK): Elsevier applied science. 366p.

<http://biocollections.org/pub/worms/docs/Blakemore-eworms-Diversity-of-exotics.html>

http://www.ineris.fr/centredoc/rap_restitution_sphair_1_2.pdf.

Index des produits phytosanitaires ; A usage agricole EDITION 2007.

INERIS, 2005. Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation. Institut national de l'environnement industriel et des risques. [consulté le, 04/05/2011].

Ireland, M. P. 1983. "Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworm". In: *Earthworm ecology from Darwin to vermicu/ter.* J. E. Satchell (eds). London (UK): Chapman and Hall. p. 247-265.

ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol – Détermination du pH. n° 10390. ISO, Genève.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ISO (Organisation internationale de normalisation) (1998). Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) – Partie 2 : Détermination des effets sur la reproduction. n° 11268-2. ISO, Genève.

James S.W., 1991. Soil, nitrogen, phosphorus, and organic matter processing by earthworms in tallgrass prairie. *Ecology*. 72 (6): 2101-2109 pp.

Kevan DK McE., 1985. Soil zoology, then and now, mostly then. *Quaestiones Entomologicae*. 21: 371.7- 472

King R.A., Tibble A.L. et Symondson W.O.C., 2008. Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Molecular Ecology*. Vol.17: 4684-4698.

KÖNIG C., 2007- les vers de terre. Futura-Sciences (www.futura-sciences.com)

Lakhani K.H. et Satchell J.E., 1970. Production of *Lumbricus terrestris* L. *Journal of animal Ecology*. 39: 473-492.

Lanno, R, J. Wells, J. Conder, K. Bradham et N. Basta. 2004. "The bioavailability of chemicals in soil for earthworms". *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 57, no. 1, p. 39-47.

Lavelle P. et Spain A., 2001. *Soil Ecology*, Kluwer Scientific Publications, ISBN 0-7923- 7123-2, Amsterdam, the Netherlands.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lavelle P., 1983. The structure of earthworm communities. In Satchell J.E. Ed. Earthworm Ecology. From Darwin to Vermiculture, 449-466. Chapman and Hall, London.

Lazartigues, A., 2010. Pesticides et polyculture d'étang : de l'épandage sur le bassin versant aux résidus dans la chair de poisson. Thèse de Doctorat .Université de Nancy, France. 191 p.

Lee, K.E., 1985. Earthworms: Their Ecology and Relationship with Soils and Land use. Academic Press: Sydney, Australia. 411p.

Little, E.E., 1990. Behavioral toxicology: stimulating challenges for a growing discipline. Environ. Toxicol.Chem,9, 1-2.

Lowe C.N. et Butt K.R., 2002. Growth of hatchling earthworms in the presence of adults: interactions in laboratory culture. Biol. Fertil. Soils. 35: 204-209.

Mahajan, S., Kanwar, S.S., Sharma, S.P., 2007. Long-term effect of mineral fertilizers and amendements on microbial dynamics in an alfisol of western Himalayas. Indian Journal of Microbiology, 47(1), 86-89.

Marcheterre L., Choudhry, G., Webster G., 1988. Environmental Photochemistry of Herbicides. Reviews of Environmental Contaminations and Toxicology. 103: 61-126.

matter and the physical capacity of soils to protect organic matter. Eur. J. Agron. 7 : 189-199.

Michaelsen W., 1930a. Ein Schlangenähnlicher Regenwurm aus Bergwäldern der Insel Luzon. Philippine Journal of Science, Manila. 41: 273-282, 1 pl. Stephenson, J. (1930). "The Oligochaeta." Oxford University, Clarendon Press. . 978 pp.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Minnich J., 1977. The earthworm book. Rodale Press, Emmaus, PA. xii + 372 pp.

Morgan, A. J., S. R Stürzenbaum, C. Winters et P. Kille. 1999. "Cellular and molecular aspects of metal sequestration and toxicity in earthworms". Invertebrate reproduction and development, vol. 36, no. 1-3, p. 17-24.

Morgan, J. E. et A. J. Morgan. 1988. "Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils". Environ. Pol/., vol. 54, p. 123-138.

Mostert, M.A., Schoeman, A.S., Van Der Merwe, M., 2000.The toxicity of five insecticides to earthworms of the Pheretimagroup, using an artificial soil test.Pest ManagSci,58, 1093-1097.

Multigner L. 2005. Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. Environnement, Risques et santé. Vol.4, N°3.

Muthukaruppan, G., Ganasekaran, P., 2010. Effect of Butachlor herbicide on earthworm Eiseniafetida – its histological perspicuity. Applied and Environmental Soil Science, 1-5

Parmelee, R. W. et Crossley, D. A. J., 1988. Earthworm production and role in the nitrogen cycle of a no-tillage agroecosystem on the Georgia Piedmont. Pedobiol. 32, 351-361

Pelosi, C., 2008 .Modelisation de la dynamique d'une population de vers de terre Lumbricusterrestrisau champ. Thèse de doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).141p.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PELOSI. C, 2008., Modélisation de la dynamique d'une population de vers de terre lumbricus terrestris au champ contribution à l'étude de l'impact de systèmes de culture sur les communautés lombriciennes. Th. Doc., Ecole doctoral. N°decommande1619,ÉditionSuisse,2013. ABIES. Paris.141 p.

PIFFNER L., MESSERLI N., BAUCHHENS J., 2007- Bodenfruchtbarkeit Bodenlebewesen Regenwurm – so lebt er, FiBL & Liebegg, Gränichen. 2p.

Phillipson J. et Bolton P. J., 1977. Growth and cocoon production by *Allobohara rosea* (Oligochaeta: Lumbricidae). *Pedobiol.* 17, 70-82.

Pimentel D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pest: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics.* 8: 17-29.

Postma, J. F., S. Mol, H. Larsen et W. Admiraal. 1995. "Life cycle changes and zinc shortage in cadmium-tolerant midges, *Chironomus riparius* (Diptera), reared in the absence of cadmium". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 14, no. 1, p. 117122.

Ramade F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie; fondements et applications. Ed. Lavoisier, pp 618.

Rida, A. M. A. 1994. "Les vers de terre et l'environnement". *La recherche*, vol. 25, p. 260-267.

Righi, G. 1979. Introduccion al estudio de las lombrices del suelo (Oligoquetos Megadrilos) de la Provincia de Santa Fe (Argentina). *Revista de la asociacion de ciencias Natural del Littoral* 10, 89-155.

Robidoux P.-Y., J. Hawari, S. Thiboutot et G. I. Sunahara. 2002a. "Ecotoxicological risk assessment of explosives contaminated sites". In: *Environmental Analysis of Contaminated*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Sites: Toxicological Methods and Approaches. Sunahara G. 1., Renoux A. Y., Gaudet C. L., Thellen C., Pilon A. (Eds). Sussex (UK): John Wiley and Sons. pp 335-359.

Robidoux, P. Y., C. Svendsen, M. Sarrazin, S. Thiboutot, G. Ampleman, J. Hawari, J. M. Weeks et G. 1. Sunahara. 2005. "Assessment of a 2,4,6-Trinitrotoluene Contaminated Site Using *Aporrectodea rosea* and *Eisenia andrei* in Mesocosms". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 46, p. 1-11.

Robidoux, P.-Y., C. Svendsen, J. Caumartin, J. Hawari, G. Ampleman, S. Thiboutot, J. M. Weeks et G. 1. Sunahara 2000b. "Chronic toxicity of energetic compounds in soil using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test". Environmental toxicology and chemistry, vol. 19, p. 1764-1773.

Robidoux, P.-Y., G. Bardai, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thiboutot, J. Hawari et G. 1. Sunahara. 2003. "Phytotoxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in spiked artificial and natural forest soils". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 44, no. 2, p. 198-209.

Robidoux, P.-Y., J. Hawari, G. Bardai, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thiboutot et G. 1. Sunahara: 2002b. "TNT, RDX and HMX decrease earthworm (*Eisenia andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 43, p. 379-388.

Robidoux, P.-Y., J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman et G. 1. Sunahara. 2001. "Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test". Environmental Pollution, vol. 111, p. 283-292.

Robidoux, P.-Y., P. Gong, M. Sarrazin, G. Bardai, L. Paquet, J. Hawari, C. Dubois et G. 1. Sunahara. 2004b. "Toxicity assessment of contaminated soils from antitank firing range". Ecotox. Environ. Safe., vol. 58, p. 300-313.

Rougerie R., Decaëns T., Deharveng L., Porco D., James S.W., Chang C.-H., Richard B., Potapov M., Suhardjono Y. et Hebert P.D.N., 2009. DNA barcodes for soil animal taxonomy. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 44: 789-801.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ruppert, E. E. et R D. Barnes. 1994.** invertebrate Zoology. Fort Worth (USA): Saunders College Publishing. 1056p.
- Satchell J.E., 1967.** Lumbricidae. In Soil Biology. (Eds., A. Burges and F. Raw): 259-322. (Academic Press: London.).
- Scherrer, E., 1992.** Behavioural responses as indicator of environmental alterations: approaches, results, developments. J. Appl. Ichthyology,8, 122–131.
- Schiavon M., Jacquin F., 1973.** Studies on the migration of two triazines as influenced by precipitation. Symposium on Herbicides and the Soil. 80-90.
- SCHMUTZ R., 2013-** Vers de terre architectes des sols fertiles. N°1619. FiBL, Suisse,6 p.
- Sims R.W. et Gerard B.M., 1999.** Earthworms: Notes for the Identification of British Species, Synopses of the British Fauna (New Series) n°.31 (Revised). London: Linnean Society.
- Svendsen T.S., Hansen P.E., Sommer C., Martinussen T., Grønvold J. et Holter P., 2005.** Life history characteristics of *Lumbricus terrestris* and effects of the veterinary antiparasitic compounds ivermectin and fenbendazole. Soil Biol. Biochem. 37: 927-936.
- Tariq, M.I., Afzal, S., Hussain, I. and Sultana, N. 2007.** Pesticides Exposure in Pakistan: A Review, Environ Intl, 33, 1107–1122.
- TREMBLAY N.,2014-** Exploitation et élevage des vers de terre pour le marché des appâts vivants. Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation , Québec, 12 p.
- Van Der Werf H., 1996.** Assessing the impact on the environment. Agriculture, Ecosystems and Environment. 60: 81-96.
- VIGOT M et CLUZEAU D, 2014.,** Les vers de terre. Chambre d’Agriculture de la Vienne. Vienne. 10p.
- Vijver, M. G., J. P. M. Vink, C. J. H. Miermans et C. A. M. Van Gestel. 2003.** "Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal route and dermal uptake of metals in earthworms". Soil. Biol. Biochem., vol. 35, p. 125132.
- Wei, L.Y., Chao, J. S., Hong, C. C., 1997.** Assessment of the ability of propoxur, methomyl and aldicarb, three carbamate insecticides, to induce micronuclei in vitro in cultured Chinese hamster ovary cells and in vivo in BALB/c mice. Environ. Molec. Mutagen, 29, 386-393.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Wolfe N., Mingelgrin U., Miller G., 1990. Abiotic transformations in : Water, sediments and soils. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA. 433 p.

Zhou, S.P., Duan, C.Q., Fu, H., Chen, Y.H., Wang, X.H., Yu, Z.F., 2007. Toxicity assessment for chlorpyrifos - contaminated soil with three different earthworm test methods. *Journal of Environmental Sciences*, 19(7), 854–858.

Annexe I

Matériel de laboratoire

- armoire.
- microscope
- pH-mètre
- balances suffisamment précises
- instruments appropriés permettant de réguler la température
- Petite chambre équipée d'un conditionnement de l'air
- pinces, crochets ou anses
- bain d'eau.
- un agitateur
- tamis (≤ 2 mm)

ANNEXE II

Tableau des dilutions

	C₁	C₂	C₃
DURSBAN	1 /1000	1/100	1/10
PROPICOL-70	1/1000	1/100	1/10

INCLUSION EN PARAFFINE

- ✓ Technique qui consiste à enrober le tissu préalablement déshydraté pour réaliser le bloc.
- ✓ La bonne réalisation du bloc conditionne la qualité de la coupe et la conservation du prélèvement.

Principe

Le prélèvement histologique est déposé bien à plat au fond d'un moule adapté à sa taille dans lequel est coulée de la paraffine chaude (56° à 60°C).

Sa cassette d'identification est posée dessus et l'ensemble est refroidi immédiatement sur une platine réfrigérante (pour durcir la paraffine). Après démoulage on obtient le bloc.

Protocole standard

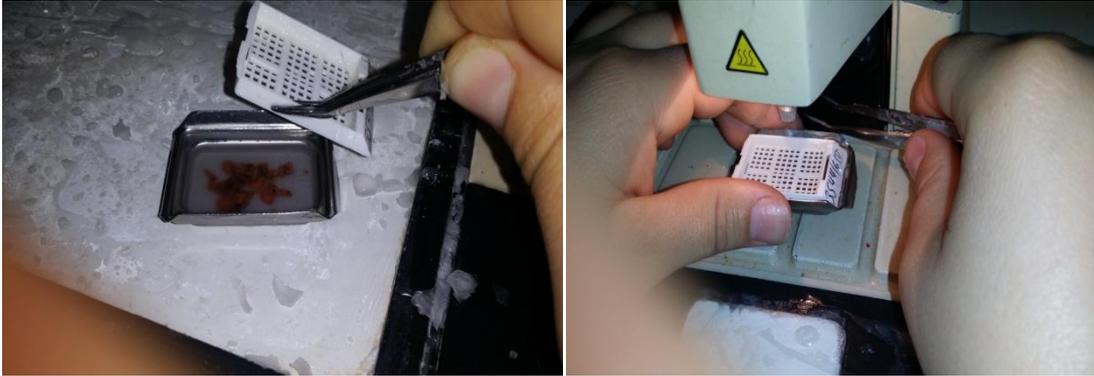
- 1- Récupérer les cassettes contenant les prélèvements déshydratés et imprégnés de paraffine chaude
- 2- Placer les prélèvements dans la station d'enrobage
- 3- Préparer le moule adéquat en le remplissant de paraffine liquide et déposer le prélèvement bien au fond et bien à plat.



- 4- Figurer le tout sur le point pelletier*
-

Annexe III

- 5- Rajouter sa cassette d'identification et recouvrir le tout de paraffine liquide jusqu'au remplissage complet de la cassette



- 6- Mettre le tout sur la platine réfrigérante, laisser refroidir et démouler le bloc.



- 7- Enlever le surplus de paraffine sur les côtés du bloc pour faciliter l'insertion dans la tête du microtome.
-

HÉMALUN EOSINE

- ✓ Coloration histologique topographique qui, en différenciant le noyau du cytoplasme, donne une vue d'ensemble d'un tissu
- ✓ 1ère étape nécessaire et essentielle pour établir un diagnostic.

Principe

Cette coloration permet de visualiser la morphologie des cellules (noyau et cytoplasme) afin de déterminer leur répartition, architecture et structure. C'est la plus simple des colorations « Combinées » qui s'effectue avec 2 colorants :

- un colorant nucléaire « basique » hématoxyline (bleu)
- un colorant cytoplasmique « acide » type éosine, orange G... (rose orangé)

Cette technique fait agir successivement:

- ✓ la solution d'hématoxyline localise la chromatine nucléaire : c'est une coloration progressive (bleu violet)
 - ✓ l'alcool-acide permet la différenciation rapide
 - ✓ l'eau ammoniacquée bleuit les noyaux
 - ✓ la solution d'éosine localise le cytoplasme : c'est une coloration régressive (rose à rose orangé)

 - ❖ Une coloration est dite « progressive » lorsqu'elle s'effectue par passage dans le colorant pendant un temps optimum.

 - ❖ Une coloration est dite « régressive » quand après sur-coloration on élimine l'excès par un différenciateur (alcool acide).
-

Annexe IV

Protocole standard

La coloration des coupes est effectuée selon les étapes suivantes :

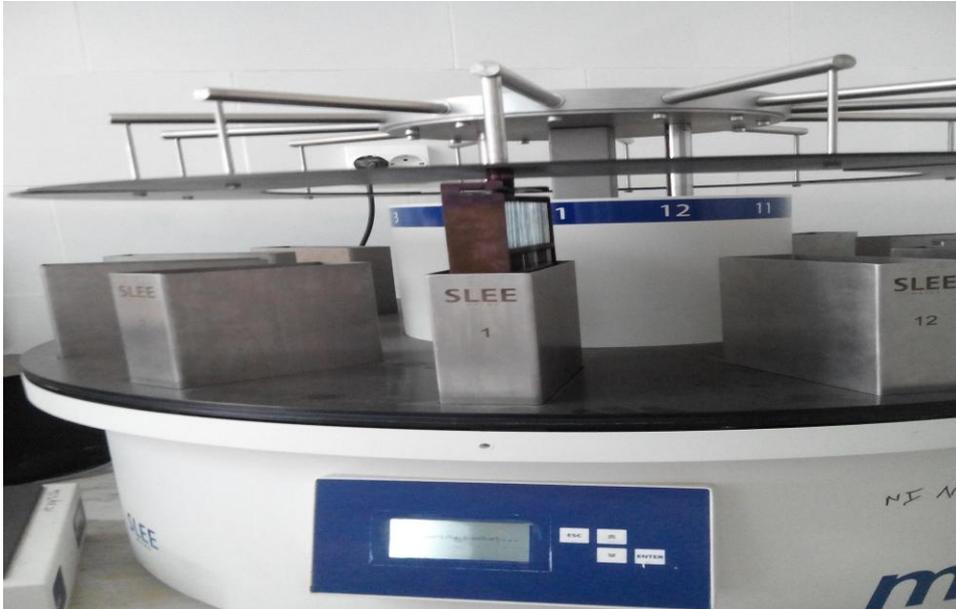
- Déparaffinage dans 2 bains de xylène pendant 10 min chacun
- Déshydratation deux bains d'alcool 5 min chacun
- Rinçage à l'eau courante
- Coloration dans un bain d'Hématoxyline pendant 5 minutes
- Rinçage à l'eau courante
- Deux bains de différenciateurs :

Le 1er différenciateur (l'acide hydro-chlorohydrique) pendant quelques secondes pour éliminer l'excès d'hématoxyline.

Rinçage à l'eau

Après, le 2^{ème} différenciateur (l'ammoniaque) pendant quelques secondes

- Un bain d'éosine pendant 2 minutes
- Rinçage à l'eau courante
- Séchage des lames
- Montage par Eukitt et lamelles



Appareil de colorations

Annexe V

Les valeurs normales de différentes matières dans le sol

Les matières	Les valeurs
MO	Plus de 5% (UNIFA parlons fertilisation)
CARBONE	5.8-6.4 % (FAO)
PHOSPHORE (ppm)	25-185 ppm (Agriculteurs et éleveurs au Nord –bénin ; écologie et genres de vie)
Potassium(ppm)	2.5ppm (ARVALIS Institut du Végétale)
pH	De 4 a 11 (Cluzeau et al 2004)

ANNEXE VI

Systematique

Les lombrics sont des vers annelés, ou Annélides (BACHELIER, 1978). Dans la plupart des écosystèmes terrestres, ce sont les lombrics qui dominent la macrofaune du sol. En Europe, il existe 400 et en Suisse 40 espèces de vers de terre (PFIFFNER, 2013). Selon VIGOT et CLUZEAU (2014), l'identification des vers de terre montre qu'il y a plus de 3000 espèces dans le monde, dont une centaine en France. Les vers de terre représentent environ 70 % de la biomasse animale terrestre dans les zones tempérées.

BOUCHE (1970 in BACHELIE, 1978) le même auteur les lombrics sont classés comme suit :

Embranchement : Annélides

Classe : Annélides oligochètes

Ordre: Opisthopores

Super famille : Lumbricina

Famille : Lumbricidae

Sous famille : Eiseninae

Genre : Eisenia

Sous famille : Lumbricinae

Genre : Eiseniella

Espèce : Eisenia fetida

Analyses physique du sol granulométrique

I- Méthode

1) Matériel

- Bain à sec 16 postes pourvu de systèmes de reflux pour le refroidissement.
- Allonges de sédimentation (tubes allongés, base plate) de 500 ml avec bouchons.
- Cristallisoirs en verre.
- Agitateur rotatif.
- Thermomètre.
- Chronomètre.
- Pipettes non jaugées de 20 ml, montées sur système d'aspiration automatique.
- Pipettes jaugées de 20 ml avec marques à 5 et à 20 cm, montées sur Pipetus automatique.
- Tamis de 50 μm et 200 μm
- Cuvettes en plastique.
- Balance analytique, précision 0.0001 g.

2) Réactifs

Eau oxygénée (H_2O_2) concentrée à 30 % et diluée à 10 % vol (666 ml H_2O_2 30 % dans 2 litres).

Dispersant (40 g/l) : dissoudre 40 g de pyrophosphate de sodium ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$ p.a.) dans 1 litre d'eau déminéralisée.

Alcool technique à 70% dans une petite pissette

3) Mode opératoire

a) Echantillon de départ

On utilise du sol tamisé à 2 mm et séché à l'air.

La prise d'essai est de 10 g (± 0.01 g).

Tamisage humide (récupération des sables)

Superposer le tamis de 200 μm à celui de 50 μm dans une cuvette en plastique ou dans un évier, en prenant soin de laisser passer un peu d'air ou de se placer au-dessus de l'évacuation pour éviter l'engorgement des tamis.

Transvaser le contenu de l'allonge dans le tamis supérieur.

ANNEXE VII

Rincer l'allonge jusqu'à ce qu'elle ne contienne plus rien de visible.

Rincer abondamment les tamis à l'eau jusqu'à ce que l'eau qui s'en écoule soit exempte de suspension.

Il n'est pas nécessaire de rincer à l'eau désionisée car aucune analyse chimique ne sera réalisée sur les fractions par la suite.

Transvaser à l'aide d'une pissette d'eau le contenu de chaque tamis dans les cristallisoirs en verre préparés et numérotés. Mettre les cristallisoirs à sécher dans l'étuve à 105 °C pendant 24 à 48 heures. Sortir les cristallisoirs de l'étuve, les laisser refroidir environ 1 heure au dessiccateur.

Peser précisément chaque cristallisoir et en déduire la masse nette de chaque fraction.

4) Récupération

Les restes de sol sont déposés dans les cuvettes de récupération situées au sous-sol. Le tout sera expédié à la déchetterie.

Calculs

Si l'on considère que :

Vt : volume total en ml de la solution (500 ml)

Mi : masse nette (après déduction de la tare) en g de la fraction prélevée au temps Ti (corrigée éventuellement par l'humidité résiduelle).

Vp : volume en ml de prélèvement (20 ml)

Vd : volume en ml de dispersant (pyrophosphate de Na) (22.5 ml)

Cd : concentration en g/ml de pyrophosphate de Na (0,04 g/ml)

Sables fins SF = masse de la fraction retenue sur le tamis de 50 µm

Sable Grossiers SG = masse de la fraction retenue sur le tamis de 200 µm

Alors, la masse de chaque fraction se calcule comme suit :

Limons Grossiers $LG = (M1 - M2) \times Vt/Vp$

Limons Fins $LF = (M2 - M3) \times Vt/Vp$

Argiles $A = (M3 \times Vt / Vp) - (Cd \times Vd)Vp$

Le pourcentage de chaque fraction se calcule ensuite, sachant que : $A + LF + LG + SF + SG = 100\%$

ANNEXE VIII

Phosphore

principe (méthode OLSEN)

L'extraction de l'acide phosphorique dans cette méthode est faite avec une solution 0.5N de bicarbonate de sodium ajusté à pH 8.5. le dosage est basé sur la formation et la réduction d'un complexe de l'acide phosphorique et de l'acide molybdique. Dans un milieu contenant des ions phosphoriques, l'addition du réactif sulphomolybdique et d'une solution d'acide ascorbique provoque par chauffage le développement d'une coloration bleue dont l'intensité proportionnelle à la concentration en ortho phosphate.

Mode opératoire

Extraction

Peser 5g de terre fine séchée (tamisée à 0.2mm) les placer dans une fiole à agitation de 250ml avec 100ml de la solution de NaHCO_3 et 2g de charbon actif, agiter 30mn sur agitateur va et vient. Filtrer toute la suspension sur papier à filtration lente.

Colorimétrie

Dans fiole jaugé de 25ml, mettre dans l'ordre :

5ml extrait de terre, 3ml de réactif chlorosulfomolybdique , laisser dégager le CO_2 .15ml d'eau distillée , homogénéiser. 2ml de solution d'acide ascorbique , homogénéiser et maintenir les fioles au bain marie à 80°C durant 5min ,refroidir et homogénéiser , passer au colorimètre à 650nm et noter la lecture.



Photo : de protocole de mesure de phosphore

ANNEXE VIII

Carbone et matière organique

1-carbone

Peser 0.5g du sol tamisé à 0.02 mm , mettre dans des fioles , ajouter 10ml de Bichromate de potassium , mettre les fioles dans la rende d'attaque pendant 5mn , ajouter l'eau distillée jusqu'à le tri de jauge

Préparation les points de gamme

6 fioles

1→0ml du glucose

2→0.5ml du glucose

3→1ml du glucose

4→2ml du glucose

5→4ml du glucose

6→6ml du glucose

En ajoute pour tous les gamme 10ml de Bichromate de potassium , après placer les points de gamme dans la rend d'attaque pendant 5mn , ajouter l'eau distillée jusqu'à le tri de jauge .



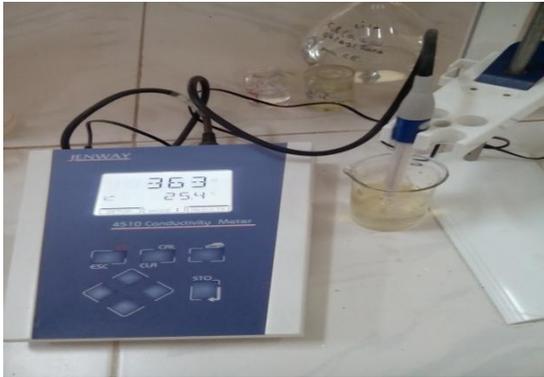
Photo de méthodes utilise pour mesure le carbone et matière organique

ANNEXE VIII

Conductivité électrique

Principe :

peser 10g du sol tamisé et en ajoute 100ml d'eau distillée , placer dans l'agitateur pendant 2h , après en passe à la filtration , la lecture se fait grâce à conductimètre.



Appareil qui mesure la conductivité électrique

Potassium assimilable

- Peser 5g de sol et les placer dans une fiole d'agitation de 200ml
- Ajouter 50ml de la solution d'acétate d'ammonium, agiter pendant 2h
- Filtrer la suspension dans une fiole jaugé de 50ml , compléter au trait de jauge à l'eau distillée
- Préparer une dilution de 1 /10 en mettant 5ml de la solution extraite dans une fiole de 50ml , compléter au volume à l'eau distillée
- Après le passage de la gamme d'étalonnage, passer l'échantillon au spectrophotomètre à flamme

Préparation de la gamme d'étalonnage ;

- Le dosage du potassium au spectrophotomètre à flamme nécessite d'étalonner l'appareil de mesure .La gamme d'étalonnage est préparée de la façon suivante :
 - solution mère à 1000ppm : introduire 1, 907g de KCL dans une fiole jaugée de 1000ml , bien agiter et compléter au volume
 - solution fille à 100ppm : prendre 10ml de la solution mère , les introduire dans une fiole de 100ml , compléter au volume
 - solution d'étalonnage : prendre des fioles de 100 ml et introduire les volumes suivants :

ANNEXE VIII

Solution N	Nombre de ml à prendre de la Solution fille à 100ppm	concentrations obtenues en ppm
1-	0.5	0.5
2-	1	1
3-	2	2
4-	4	4
5-	8	8
6-	12	12
7-	16	16
8-	20	20

- Compléter au trait de jauge avec l'eau distillée

- passer la gamme d'étalonnage au spectrophotomètre et noter la lecture obtenue pour chaque concentration.



Spectrophotomètre à flamme les point de gamme

ANNEXE VIII

Annexe IX

Appareillages



Appareil de circulation



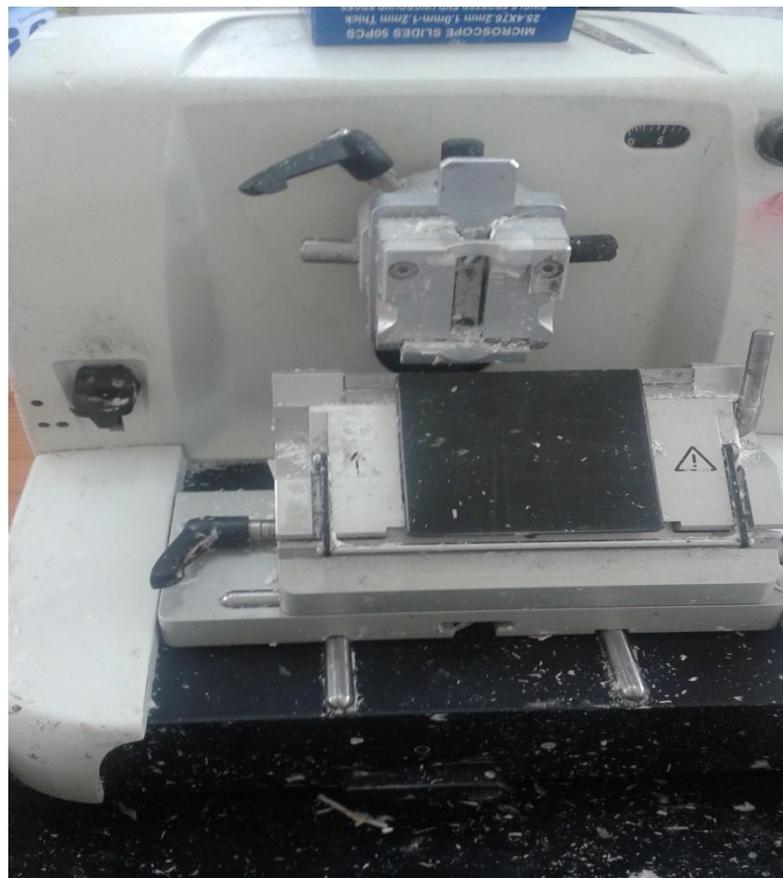
Plaque de refroidissement

Appareil d'inclusion

Annexe IX

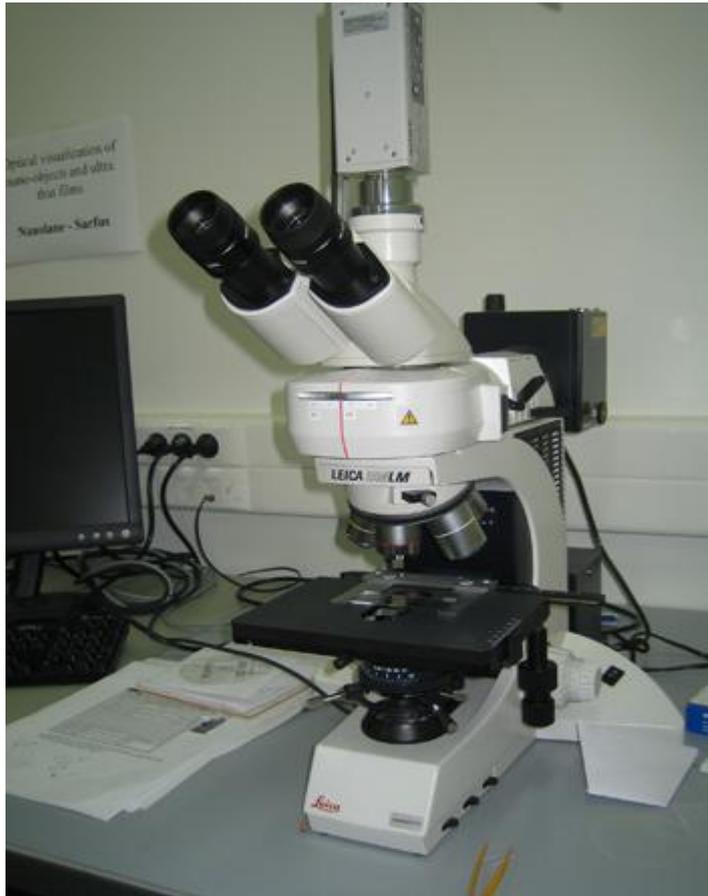


Étuve thermostatif

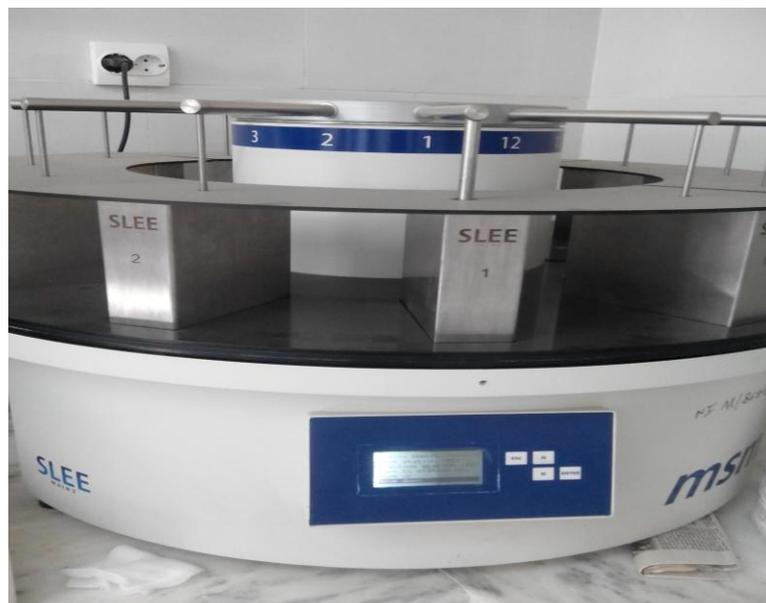


Microtome

Annexe IX



Microscope optique



Appareil de coloration HE

Annexe X

Les valeurs de CRE

Après 24h					
	cupule①	cupule②	cupule③	moyenne	Ecar type
M ₁	38.91	33.27	29.39	33.059	1.871
M ₂	29.22	25.37	21.79		
Après 48h					
M ₁	26.97	37.15	50.43	33.461	2.348
M ₂	20.2	28.34	37.14		
Après 72h					
M ₁	47.52	54.85	63.72	32.150	1.022
M ₂	36.03	41.78	47.81		

Les valeurs d'Humidité

	cupule①	cupule②	moyenne	Ecar type
M _i	92.39	92.46	7.806	0.027
M _f	85.16	85.26		