

## **Toxicité d'un Herbicide à base de Glyphosate sur le ver de Terre *Eudrilus Eugeniae* KINBERG, 1867 (Oligochaeta, Eudrilidae)**

**Gains Kouakou Kpan Kpan**

*Auteur Correspondant*

*Laboratoire National d'Appui au Développement Agricole (LANADA)*

*Laboratoire Central*

*d'Agrochimie et d'Ecotoxicologie (LCAE) 04 BP 612 Abidjan 04, Côte d'Ivoire*

*E-mail : oraclegains@gmail.com; Tel.: (+225) 47 66 38 94*

**Moïse N'guetta Ehouman**

*Unité de Recherche en Ecologie et Biodiversité (UREB)*

*UFR des Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua*

*02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire*

**Mamadou Toure**

*Unité de Recherche en Ecologie et Biodiversité (UREB)*

*UFR des Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua*

*02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire*

**Lazare Yao Brou**

*Laboratoire National d'Appui au Développement Agricole (LANADA)*

*Laboratoire Central*

*d'Agrochimie et d'Ecotoxicologie (LCAE) 04 BP 612 Abidjan 04, Côte d'Ivoire*

**Seydou Tiho**

*Unité de Recherche en Ecologie et Biodiversité (UREB)*

*UFR des Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua*

*02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire*

**Sory Karim Traore**

*Laboratoire National d'Appui au Développement Agricole (LANADA)*

*Laboratoire Central*

*d'Agrochimie et d'Ecotoxicologie (LCAE) 04 BP 612 Abidjan 04, Côte d'Ivoire*

*Laboratoire de Chimie Santé et Environnement*

*UFR des Sciences et Gestion de l'Environnement*

*Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire*

**Ardjouma Dembele**

*Laboratoire National d'Appui au Développement Agricole (LANADA), Laboratoire Central*

*d'Agrochimie et d'Ecotoxicologie (LCAE) 04 BP 612 Abidjan 04, Côte d'Ivoire*

### **Résumé**

Le glyphosate est l'herbicide le plus utilisé dans le monde pour lutter contre les espèces de plantes indésirables. L'emploi massif de cet herbicide nécessite la connaissance

de son écotoxicité afin de mieux régler son utilisation. Cette étude avait pour but de caractériser la toxicité aiguë et de déterminer les effets à long terme d'une formulation à base de glyphosate sur *Eudrilus eugeniae*. Les essais ont été effectués à Azaguié (Côte d'Ivoire), sur du sol naturel enrichi aux crottes de lapin. La concentration létale (CL50) a été  $7,80 \pm 0,29$  g/l pour 327 g de sol, soit  $3578 \pm 14,22$  mg de glyphosate/kg de sol sec. La CL50 ( $7,80 \pm 0,29$  g/l) de l'herbicide a été supérieure à la dose de 5,47 g/l, recommandée par le fabricant. L'exposition des vers à 2000 mg/l de glyphosate soit 917,43 mg/kg de sol sec, a provoqué une réduction de  $28,34 \pm 2,89$  % du taux d'éclosion et du nombre de juvénile/cocon. Bien que la CL50 de cette spécialité agrochimique soit plus élevée que sa dose recommandée, son utilisation peut être problématique pour l'environnement à cause de son effet néfaste sur la reproduction des vers de terre.

**Motsclés:** glyphosate, *Eudrilus eugeniae*, formulation, toxicité aiguë, effet à long terme

## 1. Introduction

Le glyphosate est l'herbicide le plus utilisé dans le monde. Il s'agit d'un herbicide systémique non sélectif, destiné à combattre les adventices en pré-levé et post-levé. Il inhibe l'enzyme 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), spécifique aux plantes et impliquée dans la synthèse des acides aminés (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) indispensables au métabolisme de la plante (Schronbrunn, 2001; Duke et Powles, 2008). Sa tolérance à priori envers les animaux, son action effective sur la plupart des adventices et surtout la mise au point de cultures résistantes au glyphosate, font de cette molécule une véritable panacée contre l'enherbement des cultures, des espaces verts, des voiries et bien d'autres domaines publics (Owen et Zelayan, 2005; Li *et al.*, 2007).

A l'instar des autres pesticides, l'usage récurrent des formulations à base de glyphosate peut compromettre l'équilibre des écosystèmes tels que le sol et les eaux de surface car les tests de toxicité et d'écotoxicité qui conduisent à l'homologation des produits phytosanitaires ne tiennent pas compte des co-formulants (ingrédients inertes) alors que ces derniers sont parfois dotés de toxicité envers les organismes. Ces ingrédients inertes peuvent également engendrer un « effet cocktail » ou un effet synergisant toxique en association avec les principes actifs (U.S.EPA, 2004; U.S.EPA, 2014; Cox et Surgan, 2006). Aussi, ces tests d'homologation sont-ils réalisés en conditions expérimentales ou en milieu tempéré; ce qui peut conduire à une sous-estimation des effets écotoxicologiques des molécules agrochimiques car l'amplitude et la diversité des effets des pesticides sont intimement liés aux conditions climatiques (Van den Brink *et al.*, 2003; De Silva *et al.*, 2009). Ainsi, ces produits peuvent affecter la biodiversité des organismes des sols tropicaux notamment les vers de terre qui jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique. En effet, les vers de terre présentent une grande sensibilité à la plupart des polluants (Zarea et Karimi, 2011).

Pour mieux évaluer le spectre écotoxicologique de ces herbicides, les tests d'écotoxicité doivent tenir compte de l'ensemble de la formulation et non des matières actives seules. En outre, les tests doivent se réaliser en milieu naturel, sur un plus grand nombre d'espèces vivantes et sous différents climats notamment le climat tropical où les essais écotoxicologiques sont moindres. La présente étude vise à évaluer la toxicité d'une formulation à base de glyphosate sur le ver de terre *Eudrilus eugeniae* cultivé sur un sol naturel enrichi aux crottes de lapin.

## 2. Matériel et Méthodes

### Détermination des Paramètres Physico-Chimiques du sol

Les échantillons de sol de 200 g chacun, ont été prélevés à la profondeur de 0-10 cm. chacun. La teneur en matière organique du sol a été déterminée par la méthode de la perte au feu à l'aide d'un four à

moufle (Nabertherm, Allemagne) (CEAEQ, 2003; Hasine *et al.*, 2008). Le pH (eau) du sol a été déterminé par électrométrie à l'aide d'un multimètre HQ40d (Hach, Etats - Unis) (CEAEQ, 2003). La conductivité a été obtenue par la méthode de l'extrait dilué (Montori, 1997). L'azote total a été quantifié en utilisant la méthode de Kjeldahl décrite par la norme française NFV04-407 (AFNOR, 2002). Le minéralisateur utilisé était de type Speedigesteur (Buchi, Suisse) et le distillateur était de type FB15025 (Fisher Scientific, Etats-Unis). Le phosphore total a été déterminé par la méthode AOAC-958.01 (AOAC, 1990), en utilisant un spectrophotomètre UV/VIS type UVProbe 1700 (Shimadzu, Japon). Le diamètre des particules de sol a été déterminé par lavage et tamisage à l'aide d'un tamis électronique de type AS200 (Retsch, Allemagne) et de norme ISO 3310-1. La capacité de rétention en eau du sol a été déterminée conformément à la méthode décrite par la norme ISO 11268-2:1998 (ISO, 1998).

### **Culture des Vers de Terre**

La culture des vers de terre a été réalisée à l'aide d'individus capturés sur le site de l'étude (Azaguié). Pour ce faire, des tas de crottes de lapin ont été déposés sur le site d'étude puis arrosés régulièrement pour favoriser le développement d'*Eudrilus eugeniae*. Au bout de trois semaines, des individus sont apparus dans les pièges. Les individus capturés ont été pesés à l'aide d'une balance électronique (PRO-J038), puis répliqués sur des milieux de culture préparés à partir de sol prélevé sur une parcelle de jachère. Ce sol a été séché et tamisé à l'aide d'un tamis de 2 mm de diamètre. Les milieux de culture des vers ont été préparés dans des bacs transparents en plastique de dimensions 42 cm x 32 cm x 22 cm. Les fonds des bacs ont subi de fines perforations afin de permettre le suintement en cas d'éventuel excès d'eau. Ces perforations ont été recouvertes de grillage de 500 µm de diamètre afin d'empêcher l'évasion des vers. Chaque milieu de culture a été constitué de 7,5 kg de sol sec, au-dessus desquels 1,7 kg de crottes de lapin ont été déposés, de sorte à atteindre en tout 10 cm d'épaisseur. Les crottes ont été préalablement chauffées à 105 °C durant 4 heures au moyen d'une étuve (BINDER) puis passées sur un tamis (Retsch, Allemagne) de 2 mm de diamètre. Les couvercles des bacs ont été perforés de fins trous pour permettre l'aération du vivarium (OCDE, 1984; CEAEQ, 2012). La température et l'humidité des milieux de culture ont été suivies à l'aide d'un thermomètre à sonde (Datalogger RS1315, Taiwan) et d'un thermo-hygromètre de type KW9232 (Intertronic, Allemagne). Les juvéniles ont été transférés sur de nouveaux milieux de même composition que les milieux précédents à raison de 50 juvéniles par vivarium. Cette démarche a permis de purifier la souche des vers de terre et uniformiser l'âge des individus.

### **Formulation D'herbicide**

La formulation de glyphosate utilisée (Glycel 410 SL) était de type liquide soluble (SL). Elle était dosée à 410 g de glyphosate (41 % sel d'isopropylamine) par litre de solution commerciale. La dose recommandée était de 200 ml pour 15 litres d'eau. Cette dose correspondait à une solution de 5,47 g/l. Le numéro de lot était CIR-2687/84/Glyphosate/(SL) -6. Cette formulation a été commercialisée par la firme Topex Agro-élevage Développement SARL.

### **Toxicité Aigüe**

#### **Préparation des Milieux et de Solutions Testées**

Le protocole des tests de létalité a été inspiré de la ligne directrice pour les essais de produits chimiques, élaborée par L'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE); de la méthode SPE1/RM/43 d'Environnement Canada et de la méthode MA.500-VTL1.0, développée par le Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (OCDE, 1982 ; Environnement Canada, 2004 ; CEAEQ, 2012).

Les milieux d'essais ont été préparés à partir de boîtes transparentes en plastique de 500 ml, de 300 g de sol naturel (sol de jachère) séché à l'air libre et trié, au-dessus desquels, 27 g de crottes de lapin chauffées à l'étuve (BINDER) à 105°C durant 4 heures et broyées, ont été déposés. La capacité de rétention en eau (CRE) du sol a été déterminée selon la norme ISO11268-2:1998 (ISO, 1998) et la méthode proposée par Environnement Canada (Environnement Canada, 1994).

Les solutions de glyphosate ont été préparées à partir du produit commercial (formulation) et d'eau de fontaine afin d'être proche des conditions observées en milieu paysan. Huit (08) solutions de différentes concentrations 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 et 20 g/l ont été préparées puis additionnées aux milieux, la veille de l'ajout des vers de terre. Pour chaque solution, 5 répétitions ont été réalisées à raison de 3 vers adultes (1300 mg) par boîte, soit un total de 15 vers par solution. Des témoins négatifs ont été également constitués en 5 répliques afin d'évaluer la toxicité intrinsèque des milieux, l'état de santé des vers et la validité du test. Durant le test, aucune nourriture supplémentaire ni apport en eau n'a été effectué afin d'éviter une modification de la concentration des produits commerciaux dans les milieux d'essai. Le volume de bouillie apporté à chaque milieu a été de 150 ml ; ce qui correspondait sensiblement à la CRE du sol. Le test a duré 14 jours au bout desquels le comptage des vers survivants a été effectué. Toute absence d'un individu était synonyme de sa mort. Les essais ont été réalisés en trois reprises afin d'obtenir des valeurs moyennes du nombre de vers de terre tués.

### Détermination des Concentrations Létales

Les concentrations médianes ou CL50 ont été déterminées à l'aide du modèle Probit qui est une régression logistique permettant de comprendre et de prédire les effets d'une série de variables explicatives quantitatives sur une variable réponse binaire. Ce modèle de régression (Probit) est couramment employé pour modéliser l'effet des doses en médecine, en agrochimie ou en chimie (Cochran et Finney, 1979 ; OECD, 2002). La fonction de distribution du modèle Probit est basée sur la fonction de distribution de la loi normale. Selon Cramer (2003), la fonction de répartition de ce modèle se présente comme suit :

$$F(x) = \int_{x_0}^x \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2}(u/\sigma)^2\right) du$$

$\sigma$  : écart type de la variable explicative (u)

Lorsque la variable aléatoire (u) suit la loi normale centrée réduite N ( $\mu=0$ ,  $\sigma=1$ ), on obtient :

$$F(x) = \int_{x_0}^x \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2}(u)^2\right) du$$

Dans la présente étude, la variable explicative (u) désignait une fonction du logarithme à base 10 (Log) des concentrations d'herbicide tandis que la variable réponse était l'effet léthal des solutions d'herbicide. Cette dernière variable est binaire dans la mesure où elle s'exprime en deux modalités : mort ou vie des vers de terre.

L'explicitation de F(u) permet de prédire dans un tableau, les pourcentages de réponse et les concentrations ou doses qui leur sont associées, ainsi que l'intervalle dans lequel se situe chaque concentration ou dose. La qualité du modèle d'ajustement est mesurée à travers le  $\text{Khi}^2$  associé à  $-2\text{Log}(\text{Vraisemblance})$  et au log (concentration de l'herbicide). Le  $\text{Khi}^2$  associé à  $-2\text{Log}(\text{Vraisemblance})$  est l'équivalent du coefficient de détermination ( $R^2$ ) et du test F de Fisher du modèle linéaire. Le  $\text{Khi}^2$  associé à  $-2\text{Log}(\text{Vraisemblance})$  permet d'évaluer si la variable explicative apporte une quantité d'information significative pour expliquer la variabilité de la variable binaire tandis que celui associé au log (concentration de l'herbicide) évalue la quantité d'information qu'apporte le logarithme à base 10 des concentrations d'herbicide pour expliquer la variable binaire. Les faibles valeurs du  $\text{Khi}^2$  (< 5%) indiquent une bonne qualité du modèle logistique.

Le modèle logistique génère également la mortalité naturelle théorique des individus (vers de terre). Cette mortalité théorique est comparée à la mortalité des individus du milieu témoin afin de déceler si des facteurs autres que les substances testées sont impliqués dans la mort des individus.

Lorsque la mortalité naturelle théorique est inférieure à la mortalité naturelle observée, on conclut que les substances testées sont les seuls facteurs impliqués dans la mort des individus ; mais quand la mortalité naturelle théorique est supérieure à la mortalité naturelle observée, on conclut que des facteurs autres que les substances testées sont impliqués dans la mort des individus.

## Tests de Toxicité Chronique

### Préparation des Milieux et de Solutions Testées

Le mode opératoire des essais a été inspiré des méthodes ISO (ISO, 1991 ; ISO, 1998) et de la ligne directrice de l'OCDE concernant la détermination des effets d'un sol contaminé sur la reproduction d'*E. andrei/foetida* (OECD, 2000).

Les milieux utilisés comme substrats des vers (*Eudrilus eugeniae*) ont été constitués chacun de 300 g de sol naturel (sol de jachère) séché à l'air libre et passé sur un tamis (Retsch, Allemagne) de 2 mm de diamètre. Ces milieux ont été enrichis par 27g crottes de lapin chauffées à l'étuve à 105°C durant 4 heures puis broyées. Ces milieux ont été préparés dans des boîtes transparentes de 500 ml. Les couvercles des boîtes ont été perforés de fins trous pour aérer les milieux d'essais. Les solutions de glyphosate ont été préparées à partir du produit commercial et d'eau de fontaine. Des seringues de 10 cc et 1cc ont été utilisées pour prélever avec précision les produits commerciaux. La concentration de la solution de glyphosate était 2000 mg/l soit 2 g/l et le volume de bouillie apporté à chaque milieu a été de 150 ml.

### Effet sur la Production de Cocons

Pour mesurer l'effet de l'herbicide à base de glyphosate sur la production des cocons, le substrat des vers a été préparé selon le protocole précédant. Les vers utilisés étaient âgés de 35 jours avec une masse moyenne  $1300 \pm 20$  mg et la solution de glyphosate était dosée à 2000 mg/l soit 2 g/l. Le volume de bouillie apporté à chaque milieu a été de 150 ml; ce qui correspondait à la capacité de rétention en eau du sol. Pour cette solution, 10 répétitions ont été réalisées avec 2 vers de terre par boîte, soit un total de 20 vers. Des témoins négatifs, ont été également constitués en 10 réplicas afin d'évaluer la toxicité intrinsèque des milieux sans herbicide, l'état de santé des vers et la validité du test. Un apport de 27 g de broyat de crottes de lapin a été fait à chaque milieu toutes les deux semaines. Le séjour des vers dans les milieux d'essais a été de 35 jours. Pour chaque type de milieu, le nombre de cocons pondus par chaque couple a été noté. Les essais ont été répétés trois fois.

### Effet sur le Taux D'éclosion

Des cocons pondus dans les milieux contaminés au glyphosate (2000 mg/l soit 917,43 mg/kg) ont été chacun mis en culture sur du milieu non contaminé. Le nombre de cocons utilisés a été de 60 à raison d'un cocon par milieu. Un total de 60 cocons issus de milieux non contaminés ont été isolés chacun du milieu témoin (milieu non contaminé) afin de mesurer l'effet intrinsèque du sol sur l'éclosion. Chaque milieu a reçu 150 ml d'eau de fontaine. L'incubation a duré 17 jours. Les essais ont été répétés trois fois. Le taux d'éclosion a été obtenu par la formule :

$$Te (\%) = \frac{NCE \times 100}{NTC}$$

où

Te (%) : taux d'éclosion ;

NCE : nombre de cocons éclos ;

NTC : nombre total de cocons mise en culture.

### Effet sur le Nombre de Juvéniles/Cocon

Des cocons pondus dans les milieux contaminés au glyphosate (20 mg/l soit 917,43 mg/kg) ont été chacun mis en culture sur du milieu non contaminé afin d'éviter la toxicité des herbicides sur les

juvéniles. Le nombre de cocons utilisés a été de 60 à raison d'un cocon par milieu. Un total de 60 milieux témoins (milieux non contaminés) hébergeant chacun un cocon issu d'un milieu non contaminé à l'herbicide, a été utilisé pour mesurer l'effet intrinsèque du sol sur le nombre de juvéniles par cocon. Chaque milieu a reçu 150 ml d'eau de fontaine. La durée d'incubation a été de 17 jours. Les essais ont été répétés trois fois. Le nombre d'individus par cocon a été obtenu en dénombrant les vers présents dans chaque milieu puis en calculant la moyenne d'individus apparus par l'expression suivante:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

où

$\bar{x}$  : moyenne

N : nombre total de cocons;

$x_i$  : effectif des vers de la  $i^{\text{ème}}$  boîte (milieu).

### Effet sur la Biomasse

L'effet du glyphosate sur la croissance en biomasse a été évalué sur les vers de terre adultes. Pour ce faire, la solution de 2000 mg/l de glyphosate et des vers âgés de 35 jours ont été utilisés. Le volume de bouillie apporté à chaque milieu a été de 150 ml; ce qui correspondait à la capacité de rétention en eau sol. Trente répliques ont été réalisés pour le milieu contaminé au glyphosate. Pour le milieu non contaminé (témoin) 30 répliques ont été également réalisés. Un ver adulte a été placé dans chaque milieu puis sa masse a été suivie durant une exposition de 35 jours. Les essais ont été réalisés à trois reprises.

### Analyse Statistique

Le modèle de régression logistique Probit utilisé pour l'établissement de la courbe dose -réponse et la détermination des concentrations médianes ou CL50 des herbicides a été réalisé par le biais du logiciel Xlstat 2015.4.01.

Le test U de Mann-Whitney est un test non paramétrique qui s'utilise pour la comparaison de deux échantillons indépendants. Il a été utilisé pour évaluer:

- la différence entre le nombre de cocons pondus des milieux témoins et celui des milieux contaminés,
- la différence entre le nombre d'individus par cocon des milieux témoins et celui des milieux contaminés
- et la différence de biomasse entre les milieux contaminés et les milieux non contaminés.

L'utilisation de ce test se justifie par le fait que, pour chaque paramètre, les données relatives aux milieux d'élevage des vers, peuvent être considérées comme des échantillons indépendants. En outre, pour chaque paramètre, la comparaison n'a concerné que deux types de milieu d'élevage.

Le  $\text{Khi}^2$  est un test statistique permettant de tester l'adéquation d'une série de données à une famille de lois de probabilités ou de tester l'indépendance entre deux variables aléatoires. Il a été utilisé pour évaluer la liaison entre le taux d'éclosion et la nature des milieux. Le test U de Mann-Whitney et le  $\text{Khi}^2$  ont été réalisés à l'aide du logiciel Xlstat version 7.5. Le niveau de significativité des tests a été fixé à 5%.

### 3. Résultats et Discussion

#### Résultats

##### Paramètres Physico-Chimiques

Au total, 30 échantillons de sol ont été analysés pour la détermination de neuf (9) paramètres physico-chimiques à savoir le pH, la conductivité, la matière organique, l'azote total, le carbone organique, le rapport carbone/azote, le phosphore total, et la granulométrie. Les valeurs moyennes du pH, de la capacité de rétention eau, de la teneur en matière organique du sol, ont été respectivement  $5,72 \pm 0,16$ ,  $42,09 \pm 1,69$  % et  $7,4 \pm 0,04$  %. Le rapport C/N et la teneur en phosphore total ont été respectivement  $8,59 \pm 0,57$  et  $13,76 \pm 1,06$  mg/kg. La conductivité électrique du sol a valu  $116 \pm 8,74$   $\mu$ S/cm. Ce sol était constitué de  $74,78 \pm 1,28$  % de sable, de  $24 \pm 1,26$  % de limon et de  $1,21 \pm 0,38$  % d'argile. Les valeurs moyennes de tous les paramètres physico-chimiques ont été enregistrées dans le Tableau 1.

**Tableau 1:** Paramètres physico-chimiques du sol

Paramètres	pH <sub>eau</sub>	Cond. ( $\mu$ S/cm)	MO (%)	N (%)	COT (%)	C/N	P <sub>total</sub> (mg/kg)	CRE (%)	Sable (%)	Limon (%)	Argile (%)
Teneur	5,72 $\pm$ 0,16	116 $\pm$ 8,74	8,01 $\pm$ 0,24	0,60 $\pm$ 0,16	4,65 $\pm$ 0,14	8,59 $\pm$ 0,57	13,76 $\pm$ 1,06	42,09 $\pm$ 1,69	74,78 $\pm$ 1,28	24,00 $\pm$ 1,26	1,21 $\pm$ 0,38

Cond: conductivité; COT: carbone organique total; MO: matière organique; N: azote; C/N: carbone/azote ; CRE : capacité de rétention eau; P<sub>total</sub> : phosphore total

Durant la culture des vers de terre, la température moyenne du sol a été  $28,7 \pm 1,6^\circ\text{C}$  et l'humidité relative du milieu a été  $86,7 \pm 2,5$  %.

#### Toxicité Létale

Le nombre de vers de terre tués croît sensiblement à mesure que la concentration de glyphosate augmente. Le nombre de vers tués a oscillé entre 0 - 14 pour l'essai 1, entre 0 - 13 pour l'essai 2 et entre 0 - 14 pour l'essai 3. La mortalité observée a été 0 % pour les essai 1 et 3 et 6,67 % pour l'essai 2 (Tableau 2).

**Tableau 2:** Paramètres du test de toxicité aigüe

N° Essai	Glyphosate(g/l)	Nombre de vers testés	Nombre de vers de tués	Mortalité naturelle observée
E 1	2	15	0	0 %
	3	15	1	
	4	15	3	
	5	15	5	
	8	15	7	
	10	15	9	
	15	15	13	
	20	15	14	
E2	2	15	0	6,67 %
	3	15	1	
	4	15	3	
	5	15	5	
	8	15	6	
	10	15	8	
	15	15	12	
	20	15	13	

N° Essai	Glyphosate(g/l)	Nombre de vers testés	Nombre de vers de tués	Mortalité naturelle observée
E3	2	15	0	0 %
	3	15	1	
	4	15	4	
	5	15	6	
	8	15	7	
	10	15	9	
	15	15	13	
	20	15	14	

E :essai,

L'évaluation de la linéarité entre les concentrations de glyphosate et la mortalité des vers de terre a conduit à des probabilités du  $\text{Khi}^2$  ( $\text{Pr} > \text{Khi}^2$ ) associées à  $-2\text{Log}$  (vraisemblance) inférieures 0,01 %. La variable explicative (concentration de glyphosate) apporte une quantité d'information significative à la variabilité de la mortalité des vers de terre, étant donné que les probabilités du  $\text{Khi}^2$  ( $\text{Pr} > \text{Khi}^2$ ) associés à  $-2\text{Log}$  (vraisemblance) ont été inférieures à 5 %, en d'autres termes, le glyphosate est fortement impliqué dans la mort des vers de terre (Tableau3).

**Tableau 3:** Probabilité du  $\text{Khi}^2$  associée aux fonctions d'ajustement du modèle

Essai	Statistique	DDL	$\text{Khi}^2$	$\text{Pr} > \text{Khi}^2$
E 1	-2 Log(Vraisemblance)	2	61,013	< 0,0001
E 2	-2 Log(Vraisemblance)	2	50,669	< 0,0001
E 3	-2 Log(Vraisemblance)	2	56,906	< 0,0001

E :essai

En ce qui concerne la régression logistique (Probit), les probabilités du  $\text{Khi}^2$  ( $\text{Pr} > \text{Khi}^2$ ) associées au logarithme à base 10 de la concentration de glyphosate (g/l) ont été  $p < 0,0001$ , pour chacun des trois des essais. Cela permet de dire que le logarithme à base 10 de la concentration de glyphosate apporte une quantité d'information significative à la mortalité des vers de terre. En outre, la mortalité naturelle (0 %) générée par le modèle a été inférieure ou égale à la mortalité naturelle observée sur les trois essais. Par conséquent, la mort des vers a été uniquement provoquée par le glyphosate (Tableau 4).

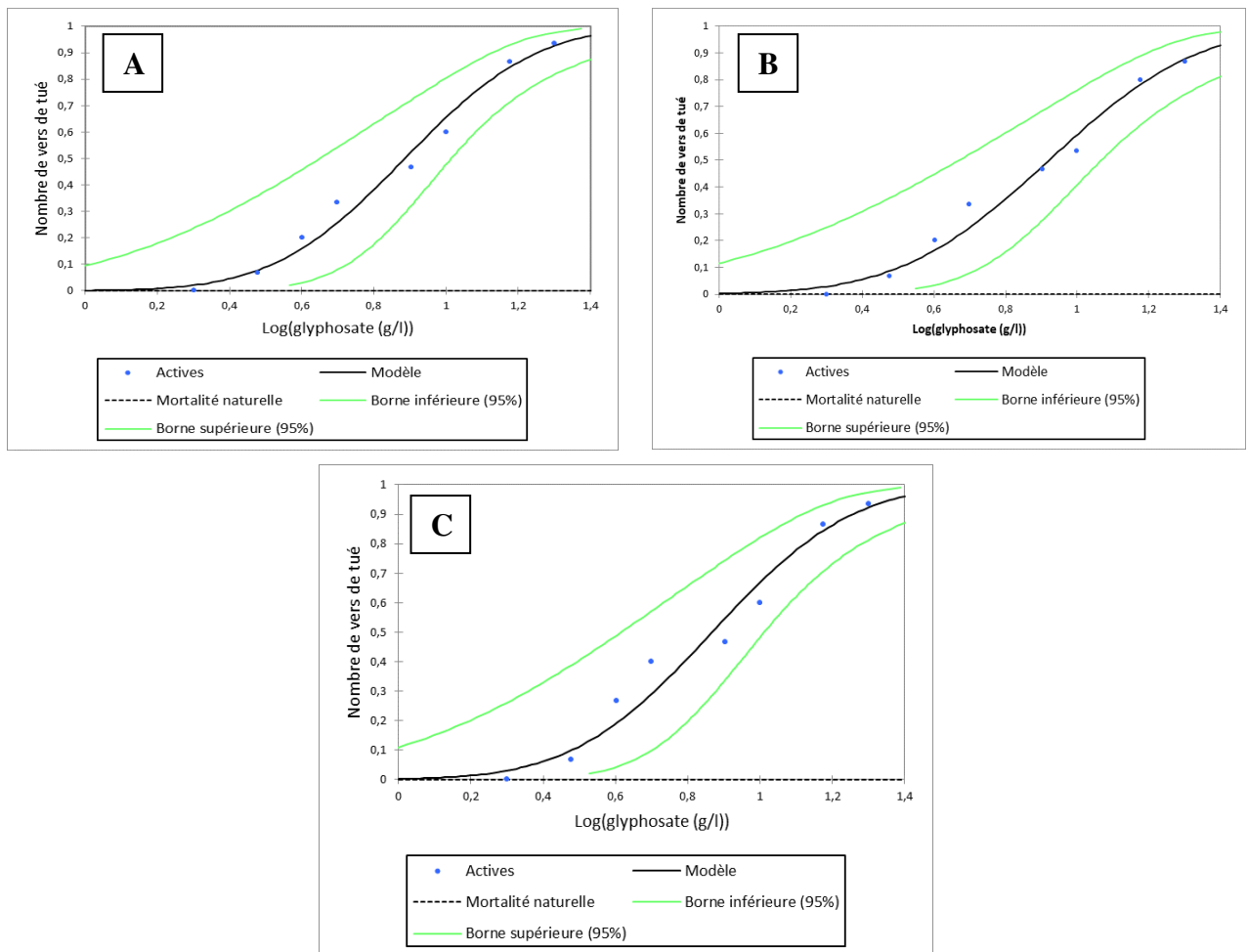
**Tableau 4:** Estimateurs des paramètres du modèle

Essai	Source	Valeur	Erreur standard	$\text{Khi}^2$ de Wald	$\text{Pr} > \text{Khi}^2$
E 1	Log [glyphosate]	3,490	0,806	18,741	< 0,0001
E 2	Log [glyphosate]	3,059	0,706	18,759	< 0,0001
E 3	Log [glyphosate]	3,296	0,727	20,541	< 0,0001

[glyphosate] : concentration de glyphosate

Les courbe dose-réponse du glyphosate montrent que tous les points « dose-réponse » se situent dans l'intervalle de confiance. Cette courbe dose-réponse permet donc de prédire de façon fiable, à un niveau de confiance de 95 %, la mortalité des vers de terre en fonction des concentrations de glyphosate étant donné que tous les points « dose-réponse » se sont situés dans l'intervalle de confiance. La mortalité naturelle théorique (quasi nulle) est également perceptible sur la courbe dose-réponse, la courbe de mortalité naturelle étant totalement confondue à l'axe des abscisses (Figure A, B et C).



**Figure A, B et C:** Courbe de la dose-réponse du glyphosate pour les essais 1, 2 et 3

Chaque essai a conduit à la détermination d'une concentration létale (CL50). Ainsi les CL50 des essais 1, 2 et 3 ont été respectivement 7,69 g/l, 8,35 g/l et 7,37 g/l. Ces CL50 sont respectivement situées, à un niveau de confiance de 95 % dans les intervalles 4,47 g/l - 10,34 g/l, 4,68 g/l - 11,69 g/l et 4,13 g/l - 10,27 g/l. La concentration létale moyenne du glyphosate a été  $7,80 \pm 0,29$  g/l pour 327 g de sol sec. Cette concentration létale est située à un niveau de confiance de 95 % dans l'intervalle  $4,43 \pm 0,16$  g/l -  $10,763 \pm 0,46$  g/l. Cette CL50 correspondant à  $3578 \pm 14,22$  mg/kg de sol. Par ailleurs, il convient de souligner que la CL50 du glyphosate ( $7,80 \pm 0,29$  g/l) est supérieure à la concentration recommandée (5,47 g/l) par le fabricant. Cela porte à croire que l'utilisation de cet herbicide conformément à la bonne pratique agricole (BPA) ne présente pas de risque de toxicité aigüe envers *Eudrilus eugeniae*.

## Toxicité Chronique

### Effet sur la Reproduction

Le nombre total de cocons pondus par les couples d'*E. eugeniae* des milieux témoins a été  $282 \pm 3,46$  contre  $239,67 \pm 3,28$  cocons pondus par les couples des milieux contaminés à l'herbicide à base de glyphosate à la concentration de 2000 mg/l de glyphosate. Lors des essais (E), le nombre moyen de cocons pondus par chaque couple du milieu témoin a été  $28,20 \pm 2,74$  (E1),  $28,80 \pm 2,64$  (E2),  $27,60 \pm 1,63$  (E3). Au niveau des milieux contaminés, le nombre moyen de cocon pondus par chaque couple a été  $23,80 \pm 2,82$  (E1),  $24,60 \pm 2,14$  (E2) et  $23,50 \pm 1,86$  (E3). Pour chaque essai, le nombre de cocons pondus dans les milieux témoins a été statistiquement identique à celui des cocons pondus dans les

milieux contaminés au glyphosate ( $p = 0,29$  (E1),  $p = 0,29$  (E2) et  $p = 0,140$  (E3)). En outre, le nombre de cocons du milieu témoin n'a pas significativement varié sur les trois essais réalisés ( $p = 0,82$ ). De même, le nombre de cocons des milieux contaminés au glyphosate n'a pas significativement varié sur les trois essais effectués ( $p = 0,95$ ) (Tableau 5).

**Tableau 5:** Nombre moyen de cocons pondus par couple de vers de terre

Essai	Nombre moyen ( $\pm \sigma$ ) de cocons/couple				
	Témoin	glyphosate (2000 mg/l)	p-valeur	R	R <sub>moy</sub> *
E1	28,20 $\pm$ 2,74	23,80 $\pm$ 2,82	0,29	1,18	1,17 $\pm$ 0,01
E2	28,80 $\pm$ 2,64	24,60 $\pm$ 2,14	0,29	1,17	
E3	27,60 $\pm$ 1,63	23,50 $\pm$ 1,86	0,140	1,17	

E : essai,  $\sigma$  : écart type de la moyenne ; R : nbre de cocons éclos (milieu témoin)/nbre de cocons éclos (milieu glyphosate) ; R<sub>moy</sub> : R<sub>moyen</sub>

En ce qui concerne l'éclosion des cocons, les trois essais ont montré chacun que le taux d'éclosion était lié à la nature du milieu ( $p = 0,036$  (E1),  $p = 0,001$ (E2) et  $p = 0,006$  (E3). Le taux d'éclosion moyen des cocons du milieu témoin négatif a été  $57,78 \pm 2$  % tandis que celui du milieu contaminé au glyphosate a été  $29,44 \pm 2$  %. L'éclosion des cocons a donc été réduite de  $28,34 \pm 2,89$  % par l'herbicide à base de glyphosate (Tableau 6).

**Tableau 6:** Taux d'éclosion des cocons

Essai	Taux d'éclosion (%)		p
	Témoin	glyphosate (2000 mg/l)	
E1	56,67	33,33	0,036
E2	61,67	28,33	0,001
E3	55	26,67	0,006
Moyenne	57,78 $\pm$ 2,00	29,44 $\pm$ 2,00	

E1 : essai

Pour chaque essai, le nombre d'individus par cocon du milieu témoin a été différent de celui du milieu contaminé ( $p = 0,0004$  (E1),  $p = 0,0002$  (E2) et  $p = 0,001$  (E3). La variation du nombre d'individus par cocon du même type de milieu n'a pas été significative d'un essai à l'autre ( $p = 0,606$  (milieu témoin) et  $p = 0,581$  (milieu contaminé). Le nombre d'individus par cocon a oscillé entre 1 et 6 avec une moyenne de  $3,13 \pm 0,26$  au niveau du milieu témoin. Quant au milieu contaminé au glyphosate, le nombre d'individus par cocon a fluctué entre 1 et 4, avec une moyenne  $1,924 \pm 0,12$  individus.

Le nombre moyen d'individus par cocon a donc été réduit par la concentration de 2000 mg/l de glyphosate (Tableau 7).

**Tableau 7:** Effectifs des individus obtenus par cocon

Essai	Effectifs des individus ( $\pm \sigma$ )/cocon		
	Témoin	glyphosate (2000 mg/l)	p
E1	3,54 $\pm$ 0,23	2,01 $\pm$ 0,2	0,0004
E 2	2,66 $\pm$ 0,23	1,68 $\pm$ 0,17	0,0002
E 3	3,18 $\pm$ 0,25	2,00 $\pm$ 0,18	0,001
Moyenne	3,13 $\pm$ 0,26	1,92 $\pm$ 0,12	

E : essai,  $\sigma$  : écart type de la moyenne

### Effet sur la Biomasse

Au niveau du milieu témoin, il n'y a pas eu de différence significative entre la masse des vers au début et à la fin du test ( $p = 0,234$  (E1),  $p = 0,391$  (E2) et  $p = 0,391$  (E3)). Au niveau des milieux contaminés au glyphosate, une absence de différence a été également observée entre la masse des vers au début ( $p = 0,391$  (E1),  $p = 0,60$  (E2) et  $p = 0,60$  (E3)). Il n'y a eu ni augmentation ni perte significative de masse chez le vers de terre *Eudrilus eugeniae*. La concentration de 2000 mg/l soit 917,43 mg/kg (sol sec) n'a donc pas affecté la masse des vers de terre (Tableau8).

**Tableau 8:** Masse moyenne ( $\pm \sigma$ ) des vers de terre des milieux d'essai

Essai	Milieu	Etape	Masse moyenne de vers ( $g \pm \sigma$ )	p
E 1	Témoin	Début	1,00 $\pm$ 0,02	0,234
		Fin	1,01 $\pm$ 0,02	
	Glyphosate (2000 mg/l)	Début	1,00 $\pm$ 0,03	0,391
		Fin	1,01 $\pm$ 0,03	
E 2	Témoin	Début	1,00 $\pm$ 0,02	0,391
		Fin	1,02 $\pm$ 0,02	
	Glyphosate (2000 mg/l)	Début	0,98 $\pm$ 0,02	0,600
		Fin	1,00 $\pm$ 0,02	
E 3	Témoin	Début	0,97 $\pm$ 0,02	0,391
		Fin	0,97 $\pm$ 0,02	
	Glyphosate (2000 mg/l)	Début	0,99 $\pm$ 0,02	0,600
		Fin	1,00 $\pm$ 0,02	

E : essai ;  $\sigma$  : écart type de la moyenne

## 4. Discussion

### Toxicité Aigüe

La moindre toxicité du glyphosate envers *E. eugeniae* pourrait s'expliquer par l'absence d'affinité entre cette molécule et les systèmes biologiques animaux. En effet, la cible du glyphosate est une enzyme appelée 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) qui n'est présente que chez les plantes et chez certaines bactéries. La toxicité de l'herbicide à base de glyphosate serait probablement causée par les co-formulants ou adjuvants qui présentent des toxicités variables suivant les organismes (Howe *et al.*, 2004 ; Cox et Sorgan, 2006). Toutefois, la toxicité intrinsèque du glyphosate ne doit pas être totalement écartée dans la mesure où des travaux récents ont révélé la toxicité du glyphosate pur envers les cellules placentaires de la femme, même si cette toxicité est moindre par rapport à celle du Roundup (Benachour et Séralini, 2009).

### Toxicité Chronique

#### -Effet sur la Reproduction

L'absence d'impact significatif du glyphosate sur la production de cocon pourrait s'expliquer par la moindre nocuité du glyphosate pour les vers de terre adultes (CL50 élevé). Ainsi, la concentration employée pour déterminer les effets à long terme n'aurait pas été insuffisante pour créer les lésions corporelles qui défavorisent l'accouplement des vers de terre (Correia et Moreira, 2010). Cette absence d'incidence du glyphosate sur la production des cocons par les vers de terre a été signalée par Zhou *et al.* (2013) qui n'ont pas observé de différence significative dans le nombre cocons produit par les vers exposés aux concentrations (0, 25, 50, 100, et 200 mg/kg) durant 28 jours.

Quant à la réduction du taux d'éclosion et du nombre de juvéniles/cocon, ces événements pourraient s'expliquer par une interférence du glyphosate sur l'enzyme de l'éclosion. En effet, le glyphosate et son surfactant, le polyoxyéthylène tallowamine (POEA) inhibent chacun l'enzyme

responsable de l'éclosion chez l'oursin *Sphaerechinus granularis*. L'inhibition de cette enzyme a été observée lors du passage du zygote du stade morula au stade blastula (Marc *et al.*, 2005).

Bien que les processus physiologiques des animaux aquatiques et ceux des animaux terrestres soient parfois différents, l'inférence du glyphosate et du POEA sur l'enzyme de l'éclosion, telle que démontrée par Marc *et al.* (2005) pourrait être la même chez les vers de terre.

En dehors de la présente étude, la réduction du nombre d'individus/cocon, provoquée par le glyphosate, a été également signalée chez *Eisenia fetida andrei* par Casabé *et al.* (2007).

### **Effet sur la Biomasse**

L'absence d'incidence du glyphosate sur la biomasse d'*E. eugeniae* pourrait s'expliquer d'une part par le fait que la concentration utilisée serait beaucoup faible pour créer un effet notoire sur la biomasse des vers terre. D'autre part, ce résultat pourrait être dû au fait que le stade de développement (stade adulte) des vers utilisés pour le test serait trop avancé pour révéler une variation significative de la biomasse des vers terre en présence de la solution de glyphosate employée dans la présente étude.

Cette absence d'incidence du glyphosate sur la biomasse des vers de terre a été observée par Zhou *et al.* (2013). Ces auteurs ont en effet observé chez l'espèce *Eisenia fetida*, une absence de différence significative entre la biomasse d'individus exposés à différentes concentrations de glyphosate (25 à 100 mg/kg) et celle des individus cultivés dans un milieu non contaminé, sur une période de 28 jours.

## **5. Conclusion**

La toxicité aigüe (mort) de l'herbicide (Glycel 410 SL) s'est manifestée dans la population d'*Eudrilus eugeniae* lorsque que la quantité de glyphosate a atteint  $7,80 \pm 0,29$  g/l soit  $3578 \pm 14,22$  mg de glyphosate/kg de sol sec. Cette CL50 a été supérieure à la concentration de 5,47 g/l, recommandée par le fabricant. Cette situation porte à croire que l'application rationnelle de cet herbicide ne provoquerait pas d'effet létal sur les vers de terre. En ce qui concerne l'effet chronique de cet herbicide, il s'est traduit au niveau de la reproduction par la réduction du taux d'éclosion et du nombre de juvéniles/cocon. La concentration de la solution de glyphosate (2 g/l) qui a réduit le taux d'éclosion des cocons et le nombre d'individus/cocon, a été inférieure à la concentration recommandée (5,47 g/l) par le fabricant. Cela suggère que l'emploi des herbicides à base de glyphosate pourrait provoquer un déclin des vers de terre; ce qui pourrait porter atteinte à la fertilité naturelle du sol et à un déséquilibre écosystémique.

## **Remerciements**

Nous remercions infiniment le Laboratoire Central d'Agrochimie et d'Ecotoxicologie (LCAE), sous entité du Laboratoire National d'Appui au Développement Agricole (LANADA), grâce auquel ce travail a pu s'accomplir. Nos remerciements sont vivement adressés au personnel de ce laboratoire pour sa disponibilité et son esprit d'équipe.

## **Références Bibliographiques**

- [1] AFNOR (2002). Détermination de l'azote total et calcul de la teneur en protéines. Norme française, NF –V04-407, 14p.
- [2] AOAC (1990). Official methods of analysis (volume1). 15<sup>th</sup> edition, Washington, 771p.
- [3] Benachour N., Séralini G.E. (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22(1): 97-105.

- [4] Casabé N., Piola L., Fuchs J., Oneto L. M., Pamparato L., Basack S., Giménez R., Massaro R., Papa Juan C., Kesten E. (2007). Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and Chlorpyrifos in an argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments* 7(4): 232 – 239.
- [5] CEAQ (2003). Détermination de la matière organique par incinération : méthode de perte au feu (PAF). MA. 1010 – PAF 1.0. Ministère de l'Environnement du Québec, 9p.
- [6] CEAQ (2003). Détermination du pH à l'eau et du pH tampon dans les sols agricoles: méthode électrométrique. MA. 205 – pH 1.0. Ministère de l'Environnement du Québec, 3p.
- [7] CEAEQ (2012). Détermination de la toxicité létale chez le ver de terre (*Eisenia andrei*). MA. 500 – VTL 1.0, 21p.
- [8] Cochran William G., Finney D. J. (1979). Chester Ittner Bliss, 1899-1979. *International Biometric Society*, 35(4): 715-717.
- [9] Correia F.V., Moreira J. C. (2010). Effects of glyphosate and 2, 4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85:264-268.
- [10] Cox C., Surgan M. (2006). Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environmental Health Perspectives*, 114 (12): 1803- 1806.
- [11] Cramer J.S. (2003). The origins and development of the logit model. University of Amsterdam commentary of chapter 9 of logit models from economics and other fields, 19p.
- [12] De Silva P.M.C.S., Pathiratne A., Van Gestel C. A.M. (2009). Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei*. *Chemosphere*, 76: 1410- 415.
- [13] Duke S.O., Powles S.B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64: 319-325.
- [14] Environnement Canada. (2004). Méthode d'essai biologique: essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*. Rapport SPE 1/RM/43, 191p.
- [15] Hasine B.H, Aloui T., Gallali T., Bouzid T., El Amri S, Hassen B.R. (2008). Evaluation quantitative et rôle de la matière organique dans les sols cultivés en zones subhumides et semi-arides méditerranéenne de la Tunisie. *Agrosolutions*, 19(2): 4-17.
- [16] Howe C.M. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23:1928–1938.
- [17] ISO (1991). Determination of the effect of Chemical Substances on the Reproduction of Earthworms. Proposition des Pays-Bas, Genève 9 p.
- [18] ISO 11268-2 : 1998. Qualité du sol- effets des polluants vis- à- vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) – partie 2 : Détermination des effets sur la reproduction. ISO 11268-2, Genève (1998).
- [19] Li B., Deng X., Guo D., Jin S. (2007). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in foods using high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 25(4): 486-490.
- [20] Marc J., Le Breton M., Cormier P., Morales J., Bellé R., Mulner-Lorillon O. (2005). A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203 (2005): 1- 8.
- [21] Montoroi J.P. (1997). Conductivité de la solution du sol et d'extrait aqueux de sol : application à un sol sulfaté acide salé de Basse – Casamance (Sénégal). *Etude et Gestion des Sols*, 4(4): 279-298.
- [22] OCDE (1984). Ver de terre, essais de toxicité aiguë. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, 10p.
- [23] OECD (2000). OECD guideline for the testing of chemicals: proposal for a new guideline-earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/andrei*), 17p.
- [24] OECD (2002). OECD guidelines for the testing of chemicals: Revised proposal for a new guideline 221. Draft guideline 221, 22p.

- [25] Owen M.D., Zelaya I.A. (2005). Herbicide resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Management Science*, 61:301-311.
- [26] Retzinger E.J., Mallory-Smith C., (1997). Classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. *Weed Technology*, 11: 384–393.
- [27] Schronbrunn E., Eschenburg S., Shuttleworth W.A., Schloss J. V., Amrhein N., Evans J.N.S., Kabsch W. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98: 1376-1380.
- [28] Shi Y., Shi Y., Wang X., Lu Y., Yan S. (2007). Comparative effects of lindane and deltamethrin on mortality, growth, and cellulase activity in earthworms (*Eisenia fetida*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89:31-38.
- [29] Song Y. (2014). Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56: 106-113.
- [30] U.S. EPA (2004). Inert (other) Pesticide Ingredients in Pesticide Products –Categorized List of Inert (Other) Pesticide Ingredients. Available: <http://www.epa.gov/opprd001/inerts/lists.html>. Consulté, le 20 septembre 2016.
- [31] U.S. EPA (2014). Inert Ingredient Frequently Asked Questions. Office of chemical safety and pollution prevention, 12p.
- [32] Van den Brink P.J., Sureshkumar S.N., Daam M.A., Domingues I., Milwain G.K., Beltman W.H.J., Perera M.W.P., Satapornvanit K., 2003. Environmental and human risk of pesticide use in Thailand and Sri Lanka. Results of a preliminary risk assessment. Alterra-report 789. MAMAS Report Series No. 3/2003. Wageningen Alterra, The Netherlands.
- [32] Zarea M.J, Karimi N. (2011). Effects of herbicides on earthworms. *Dynamic soil, Dynamic plant*, 6(1):15-13.
- [33] Zhou C.-F., Wang Y.-J., Li C.-C., Sun R.-J., Yu Y.-C., Zhou D.-M. (2013). Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution*, 180: 71-77.