



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Et Ecologie Végétale

قسم : بيولوجيا و علم البيئة النباتية.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Ecologie et environnement

Spécialité : Ecologie fondamentale et appliqué

Intitulé :

**Contribution à l'évaluation de la toxicité du cuivre
sur *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) :
Tests de toxicité aigüe et d'évitement.**

Présenté et soutenu par : *Ameziane* Idir Nazim

Le : 18/07/2019

Jury d'évaluation :

Président du jury : SAHLI L. MCA FSNV-UFMC1

Rapporteur : EL HADEF EL OKKI M. MCB INATAA-UFMC1

Examineurs : TOUATI L. MCA FSNV-UFMC1

Année universitaire

2018 - 2019

Remerciements

Avant tous je tiens à remercier ALLAH le tout puissant, de m'avoir donné la patience la force et le courage nécessaire pour effectuer ce travail, dans le cadre de Master 2 en Ecologie fondamentale et appliqué.

Ce travail a été effectué avec l'aide de plusieurs personnes à qui il me fait grand plaisir d'exprimer mon immense gratitude.

Tout d'abord je tiens à exprimer mon extrême reconnaissance et mes remerciements les plus intenses à mon encadreur Mr. Mohamed EL-HADEF EL-OKKI, pour tout le temps qu'il m'a consacré tout au long de ce travail et pour toutes les précieuses informations qu'il a pu m'apporter ainsi que pour ses conseils pertinents, pour sa compréhension et sa disponibilité d'une part et de m'avoir fait découvrir le travail de terrain mais aussi pour son immense contribution dans la rédaction de ce manuscrit d'autre part. Grâce à lui j'ai pu apprendre comment faire un travail de recherches de qualité dans les années à venir, pour tout cela

Merci

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements à Mlle SAHLIL pour avoir accepté de présider ce jury, qui a été bien plus qu'une enseignante pour moi tout au long de mon parcours en spécialité, un modèle de rigueur de sagesse de sérieux et une inépuisable source de connaissance.

Mes plus vifs remerciements vont à Mr TOUATI. L, pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail, Qu'il retrouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Toute ma gratitude va à l'ensemble du personnel du Département d'Ecologie, de l'Université des frères Mentouri (Enseignants, Techniciens,...) ainsi qu'à ceux du laboratoire de recherche de biologie BIOLAB pour leur précieuse aide.

Mes plus profonds remerciements vont à mes parents. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

Je tiens à remercier tous les doctorants pour leurs encouragements.

Merci à mes collègues de promotion

« Ecologie fondamentale et appliqué » pour leurs encouragements et leurs soutiens.

Afin de n'oublier personne je tiens à remercier toute les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je remercie enfin toutes les personnes intéressées par mon travail, en espérant qu'elles puissent trouver dans mon rapport des explications utiles pour leurs propres travaux.

Résumé

Ce travail a été effectué dans le but d'évaluer la toxicité du cuivre vis-à-vis du taxon lombricien *A.trapezoides* , Pour cela nous nous sommes proposés d'effectuer deux tests de toxicité aiguë l'un dans le sol et l'autre sur papier filtre dans le but de déterminer la DL50 et la CL50 de cet élément ainsi qu'un test d'évitement afin d'identifier le seuil au quel le comportement d'évitement apparaît pour le taxon étudié , tout cela dans des conditions de laboratoire .

Les résultats obtenus lors de nos tests et en référence à la CL50 le cuivre se révèle comme très toxique pour le taxon *A.trapezoides* , d'autre part pour le test d'évitement il apparaît que le comportement des vers de terre vis-à-vis du cuivre se manifeste à une concentration de 100ppm et que pour les doses inférieures à celle-ci les vers de terre arrivent à résister à la concentration des sols .

Une diminution de la biomasse a également été enregistrée durant le test de toxicité dans le sol , semblant ainsi indiquer un stress physiologique lié à la concentration du contaminant à la durée d'exposition .

Mots clés : *A.trapezoides* , Cuivre , Test de toxicité aiguë , Test d'évitement

Abstract

This work was done in order to evaluate the toxicity of copper to the earthworm taxon *A.trapezoides* , for that we proposed to our selfs to make two kinds of acute toxicity tests , one in the soil and an other one on filter paper in order to determine the the LD50 and LC50 of this element as well as an avoidance test to identify the threshold at which the avoidance character appears for the taxon studied , all under conditions of laboratory .

According to the results obtained during our tests and in reference to the LC50 copper is revealed as very toxic for the taxon *A.trapezoides* , However for the avoidance test it appears that the avoidance character of earthworms fot the copper is found at a concentration of 100 ppm and that for doses below the earthworms are able to resist to soil contamination .

A decrease in biomass was also recorded during the soil toxicity test , suggesting a physiological stress related to the concentration of the contaminant in the duration of exposure

Key words : *A.trapezoides* , Copper , Acute toxicity tests , avoidance test .

Sommaire

Remerciements

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction _____ 1

Chapitre 01: Synthèse bibliographique

1- Le cuivre dans le sol _____ 2

1-1- Généralités _____ 2

1-2- Les sources du cuivre dans le sol _____ 5

1-3- Comportement du cuivre dans le sol _____ 7

1-4- Biodisponibilité du cuivre dans le sol _____ 8

1-5 Impact du cuivre dans le sol _____ 10

2- Les Lombriciens (Ingénieurs des écosystèmes) _____ 10

2-1- Biologie des vers de terre _____ 10

2-2- Catégories écologiques _____ 14

2-3- Cycle de vie et stratégies de survie _____ 15

2-4- Rôle des vers de terre dans le sol _____ 16

2-5- Bioindication de la qualité des sols _____ 17

Chapitre02:Materiel et Méthodes

1- Matériel utilisé _____ 20

1-1- Matériel biologique _____ 20

1-2- Le composé chimique _____ 22

1-3- Le sol _____ 23

1-4- Le terreau _____ 24

1-5- Les supports _____ 25

2- Tests de toxicité et d'évitement	25
2-1- Tests de toxicité aigue	26
2-2- Test d'évitement	29

Chapitre 03 : Résultats et discussions

1- Résultats des tests de toxicité aigue	32
1-1- Tests de toxicité dans le sol	32
1-1-4- Observations du comportement des vers	35
1-2- Test de toxicité sur papier filtre	35
1-2-1- Mortalité	35
1-2-2- Détermination de la CL₅₀	36
1-2-3- Observations du comportement des vers	36
2- Résultats du test d'évitement	37
3- Discussion	38
Conclusion	40
Références bibliographique	41

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Principales propriétés physico-chimiques du cuivre aux conditions de pression et température ordinaires (Lenoir,2011).</i>	3
<i>Tableau 2 : Contenu en cuivre (mg.kg^{-1}) de différentes roches de la croûte terrestre (Kabata-Pendias & Pendias 1992).</i>	6
<i>Tableau 3: Stratégie de survie des différentes catégories écologiques (Cluzeau D.,com.pers.)</i>	16
<i>Tableau 4: caractéristiques du sulfate de cuivre pentahydrate.</i>	23
<i>Tableau 5: Caractéristiques physico-chimiques du terreau Fertiplus de Ferm O Feed.</i>	25
<i>Tableau 6: Résultats de la mortalité enregistrée chez vers testés.</i>	32
<i>Tableau 7: Résultats de la mortalité enregistrée chez vers testés.</i>	36
<i>Tableau 8: Résultats du dénombrement des vers dans les cylindres.</i>	38

Liste des figures

<i>Figure 1 : Sources du cuivre dans le sol (Soes,2009).</i>	7
<i>Figure 2 : Concepts de biodisponibilité (ISO/DIS17402 cité par Lanno et al. 2004)</i>	9
<i>Figure 3: Schéma caractérisant la morphologie de ver de terre (UMR ECOBIO, 2012)</i>	10
<i>Figure 4: Disposition des soies chez les vers de terre (Bachelier, 1963).</i>	11
<i>Figure 5: Anatomie interne du ver de terre (Carion, 2012).</i>	12
<i>Figure 6: Coupe anatomie interne transversale du ver de terre (Carion, 2012).</i>	13
<i>Figure 7 : les trois catégories écologiques de vers de terre (INRA,2013).</i>	15
<i>Figure 8 : Le taxon A. trapezoides (Dugès 1826).</i>	20
<i>Figure 9: Préparation des vers récoltés pour les différents tests.</i>	22
<i>Figure 10 : sulfate de cuivre pentahydraté $CuSO_4 \cdot 5H_2O$</i>	23
<i>Figure 11 : Préparation des sols pour les tests de toxicité et d'évitement.</i>	24
<i>Figure 12: Plan expérimentale du test de toxicité aiguë dans le sol.</i>	27
<i>Figure 13: Plan expérimentale du test de toxicité aigu sur papier filtre.</i>	29
<i>Figure 14: Plan expérimentale du test d'évitement dans les cylindres compartimentés</i>	31
<i>Figure 15: Taux de mortalité chez les vers en fonction des doses de sulfate de cuivre.</i>	33
<i>Figure 16: Courbe des probabilités de mortalités enregistrées à la fin du test en fonction des doses de cuivre.</i>	34
<i>Figure 17: Evolution des biomasses individuelles moyennes des vers durant la période d'expérience (14 jours).</i>	34
<i>Figure 18: Courbe des probabilités de mortalités enregistrées à la fin du test.</i>	36

Introduction

Les vers de terre sont fréquemment utilisés comme organismes indicateurs pour mesurer l'effet des contaminants métalliques dans le sol. L'effet aigu de ces éléments sur ce compartiment est généralement évalué dans des tests de laboratoire. L'OCDE (1984) proposait un guide de tests chimiques n° 207 « Ver de terre, essais de toxicité aiguë ». Ces essais sont relativement peu coûteux et faciles à réaliser (Frampton *et al.*, 2006). Ils sont le plus souvent réalisées avec l'espèce *Eisenia fetida* ou *E. andrei*. Ces espèces vivent en permanence à la surface du sol (dans la litière) ce qui fait qu'elles sont de mauvais indicateurs de l'état réel des sols. Il est donc préférable de choisir un représentant qui vit en permanence dans le sol, c'est-à-dire parmi les vers endogés. Cette catégorie de vers de terre serait donc en contact direct et permanent avec les particules dans le sol, soit par voie cutanée ou digestive (Bouché, 1972).

Faisant parti de ce groupe, le taxon *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) semble être une espèce très appropriée pour ces tests. En effet, il est fortement recommandé dans les études appliquées et les tests écotoxicologiques des éléments métalliques (Nahmani, 2003 ; van Gestel *et al.*, 2009, El-Hadef El-Okki, 2016) mais aussi pour les composés organiques (Choo et Baker, 1998 ; Wang *et al.*, 2012 ; Fernández *et al.*, 2014). Cette espèce possède une large distribution spatiale, présente dans les 5 continents, ce qui permet de constituer une base de données et la comparaison d'études réalisées au niveau local et/ou international.

Le présent travail est une continuité des travaux de recherche sur la toxicité des éléments traces métalliques vis-à-vis de ce taxon lombricien ainsi que le caractère d'évitement en présence de ces éléments dans le sol. Ainsi, nous nous sommes proposé de mettre en évidence la toxicité aiguë et le comportement d'évitement du taxon *A. trapezoides* vis-à-vis du cuivre.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1- Le cuivre dans le sol

1-1- Généralités

Le mot cuivre vient du latin *cuprum* signifiant « l'île de Chypre », qui était réputé pour ses mines de cuivre. Il est un des rares métaux qui existe à l'état natif dans le sol. Cependant, il couvre tout l'éventail des activités industrielles allant des pièces traditionnelles à des systèmes de hautes technologies. Du fait de sa grande capacité d'alliage avec d'autres éléments, il a été utilisé par l'homme depuis très longtemps. Des objets fabriqués en cuivre ont été datés d'environ 8700 avant J.C. Il a été fortement utilisé avec l'étain, par exemple dans la formation du bronze et avec le zinc pour former le laiton (Navel,2011).

Dans les minerais de cuivre, minerais de chalcopirite (CuFeS_2) et bornite (Cu_5FeS_4). En 2010, les réserves mondiales de cuivre étaient estimées à 630 millions de tonnes, avec une production d'extraction de 16,2 millions de tonnes, essentiellement en Amérique du sud (Navel,2011).

Grâce à ses propriétés physiques, et particulièrement de sa conductibilité électrique et thermique. Sa grande conductivité électrique le rend indispensable dans les industries électriques et électroniques et sa grande conductibilité thermique est un atout pour la transmission de la chaleur. De plus ses grandes capacités anticorrosives, lui procurent une utilisation importante dans le domaine de l'industrie. Ce sont aussi ces propriétés anticorrosives qui lui permettent d'être utilisé dans toute l'industrie du bâtiment. En l'agriculture, il est utilisé comme fongicide, bactéricide et/ou herbicides (Navel,2011).

Il fait partie des éléments traces métalliques (ETMs) qui englobent l'ensemble des métaux et métalloïdes dont la masse volumique est supérieure à 5 g.cm^{-3} . Les éléments les plus souvent considérés comme toxique sont : le plomb, le mercure, l'arsenic et le cadmium. D'autres comme le cuivre et le zinc pourtant nécessaires aux organismes vivants en petites quantités, peuvent devenir toxiques à doses plus importantes (Michaud,2007).

1-1-1- Principales caractéristiques

Le cuivre est un métal de la première série de transition. Il fait partie du groupe 11 (IB) dans le tableau périodique des éléments. Il est malléable, ductile, et résiste à la corrosion de l'air et de l'eau mais est attaqué par les acides. Son numéro atomique est égal à 29 et sa masse molaire est de 63,57 g.mol⁻¹ (Isabey 1933). Les deux isotopes naturels sont le ⁶³Cu (69%) et le ⁶⁵Cu (31%) (Emsley 2003). A l'état métallique (Cu⁰), il a une couleur rouge-orangée, sa structure cristalline est cubique face centrée de paramètre de maille $a=3,61 \text{ \AA}$ et de densité 8.9 g.cm⁻³. Sa densité supérieure à 5 g.cm⁻³ le classe dans la famille des métaux lourds (Flemming et Trevors 1989). Sa configuration électronique est 1s² 2s² 2p⁶ 3s² 3p⁶ 3d¹⁰4s¹ (Isabey 1933 ; Alloway 1995; Cotton et al. 1999). Suivant la règle classique de remplissage des orbitales atomiques (règle de Klechkowski), la configuration devrait être 3d⁹ 4s². Mais la configuration électronique de type s¹ d¹⁰ est énergétiquement plus favorable que la configuration s² d⁹. Du fait de la capacité des électrons de la sous couche d à se délocaliser dans le réseau métallique, ses températures de fusion et de vaporisation sont élevées (Tableau 01). Les formes les plus courantes à l'état naturel étant sont les ions cupriques Cu²⁺ (3d⁹) et cupreux Cu⁺ (3d¹⁰) (Lenoir,2011)

Tableau 1: Principales propriétés physico-chimiques du cuivre aux conditions de pression et température ordinaires (Lenoir,2011).

Paramètre	Valeur
N° atomique	29
Masse molaire	63,5 g.mol ⁻¹
Densité	8,9 g.cm ⁻³
T° de fusion	1084 °C
T° de vaporisation	2567 °C
Conductivité électrique	59,6 10 ⁵ S.m ⁻¹
Conductivité thermique	401 W.m-1K ⁻¹

1-1-2- Utilisation du cuivre

L'homme utilise depuis longtemps le cuivre, pour différentes activités qui ont évolué en même temps que ses connaissances. Les extractions minières des éléments chimiques, quelles qu'elles soient, engagent une succession de réactions chimiques qui peuvent conduire à des contaminations (Navel,2011). Il est très largement employé dans la fabrication de matériels électriques (fils, enroulements de moteurs, dynamos, transformateurs), dans la plomberie, dans les équipements industriels, dans l'automobile et en chaudronnerie.

En métallurgie, il est utilisé dans la fabrication des alliages suivants :

- le bronze avec l'étain (5 % Sn et 95 % Cu) ;
- le laiton avec le zinc (30 % Zn et 70 % Cu) ;

- le constantan avec le nickel (40 % à 50 % Ni et 60 % à 50 % Cu) ;
- le maillechort avec le nickel et le zinc (60% Cuivre, 20% Zinc, 20% Nickel) ;
- l'alliage "Dewarda" avec l'aluminium et le zinc (5% Zinc, 45% Aluminium, 50% Cuivre);
- les alliages de joaillerie avec l'or et l'argent) (INERIS, 2005).

Selon INERIS (2005), les principales formes utilisées du cuivre sont :

- *L'oxyde cuivrique*, CuO, est employé comme pigment pour le verre, les céramiques et les émaux. En métallurgie, il est utilisé dans l'industrie du cuivre, dans le soudage du bronze, dans les électrodes de galvanisation. Il est utilisé comme agent de polissage pour le verre optique. Il sert à améliorer la résistance à la fusion et à l'abrasion des fibres de verre. Il est employé dans les peintures pour bateaux ("anti-fouling"), dans les compositions pyrotechniques, pour la conservation du bois, comme insecticide pour les plants de pommes de terre. Il est également utilisé comme catalyseur.
- *L'oxyde cuivreux*, Cu₂O, est employé comme pigment pour le verre, les céramiques et les émaux. Il est utilisé dans les cellules photoélectriques, dans les pâtes pour brasure, en galvanoplastie. Il est employé comme fongicide, comme antiseptique contre la prolifération de microorganismes dans les filets de pêche, dans les peintures pour bateaux ("anti-fouling"). Il est également utilisé comme catalyseur.
- *Le chlorure cuivreux*, CuCl, est un catalyseur utilisé en synthèse organique. Dans l'industrie pétrolière, il est utilisé comme agent de désulfuration. Il est employé pour la dénitritation de la cellulose. Il sert également à fixer le CO dans l'analyse des gaz.
- *L'acétate de cuivre*, Cu₂[CH₃COO]₄, obtenu par action de l'acide acétique sur l'oxyde CuO ou sur le carbonate CuCO₃, est utilisé comme catalyseur, notamment dans la fabrication du caoutchouc. Il est employé comme pigment pour les céramiques, pour la teinture des textiles, comme fongicide, comme insecticide. Il est également utilisé en traitement préventif contre le mildiou.
- *Le chlorure cuivrique*, CuCl₂, est utilisé comme catalyseur de réactions chimiques. Dans l'industrie pétrolière, il est employé comme agent désodorisant, désulfurant ou purifiant. Il est utilisé comme mordant pour la teinture et l'impression des textiles. Il entre dans la composition d'encre indélébiles, d'encre sympathiques, de fixateurs

pour la photographie, de colorants pour les verres et céramiques. En métallurgie, il est utilisé dans les bains d'électrolyte destinés aux traitements de surface. Il est utilisé pour la production de couleurs dans les compositions pyrotechniques. Il est également employé pour la conservation du bois et pour le raffinage des métaux comme le cuivre, l'argent et l'or.

- *Le sulfate de cuivre*, CuSO_4 , est obtenu soit par lessivage de minerai de cuivre avec de l'acide sulfurique, soit par réaction entre le cuivre ou l'oxyde de cuivre, avec l'acide sulfurique dilué, suivie d'une évaporation et d'une cristallisation. Il est utilisé en analyse pour la détection et l'élimination de traces d'eau provenant des alcools et autres composés organiques. Il est employé dans la fabrication de sels de cuivre, comme mordant pour les textiles, pour la conservation du bois, le tannage du cuir, comme électrolyte dans le raffinage du pétrole, comme agent de flottation, comme pigment pour les peintures et les vernis, etc. La forme hydratée ($\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$) est utilisée comme fongicide agricole, bactéricide, herbicides. Il entre dans la composition de la bouillie bordelaise utilisée pour le traitement des vignes. Il est également employé comme antiseptique astringent, sur les muqueuses et en soins thérapeutiques chez les animaux (par exemple bains de pieds pour le traitement du piétin du mouton).

1-2- Les sources du cuivre dans le sol

Le cuivre est présent dans la croûte terrestre, mais ne représente que 0,01 % des éléments présents dans la terre. Il est aussi présent dans les océans mais à l'état de traces. Les teneurs en cuivre de la croûte continentale sont listées dans le tableau 02. La concentration moyenne est de 35 mg.kg^{-1} , avec une variation entre 2 et 120 mg.kg^{-1} selon les différentes roches (Kabata-Pendias & Pendias 1992 ; Alloway 1995 ; Baize 1997 ; Sumner 2000).

La teneur du cuivre dans le sol résulte de l'héritage des concentrations engendrées par l'altération de la roche mère, plus ou moins modifiée par des processus de pédogenèse (fond pédogéochimique). Ce fond est rehaussé par les apports des activités humaines (Baize, 1997).

1-2-1- Les sources naturelles

Le fond pédogéochimique naturel local correspond aux teneurs issues de l'évolution géologique et pédologique du sol sans tenir compte des apports anthropiques (Baize 1997). Parmi les importantes sources naturelles, citons l'activité volcanique, l'altération des continents et les incendies de forêts. La contribution des volcans peut se présenter sous forme d'émissions volumineuses dues à une activité explosive, ou d'émissions continues de faible

volume, résultant notamment de l'activité géothermique et du dégazage du magma. Le tableau 2 montre le contenu en cuivre de différentes roches de la croûte terrestre (Navel, 2005).

Tableau 2 : Contenu en cuivre (mg.kg^{-1}) de différentes roches de la croûte terrestre (Kabata-Pendias & Pendias 1992).

Types de roches	Roches magmatiques			Roches sédimentaires		
	Basiques	Intermédiaires	Acides	Argilo-sableuses	Grès	Carbonate
Cu (mg.kg^{-1})	60-120	15-80	10-30	40	5-30	2-10

1-2-2- Les sources anthropiques

Le cuivre est présent dans les minerais sous forme de sulfures (e.g. la chalcoppyrite (CuFe_2S), la bornite (Cu_5FeS_4)), et sous forme d'oxyde (e.g. cuprite (Cu_2O), malachite ($\text{Cu}_2(\text{CO}_3)$), azurite ($\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$)). Lors de son excavation, des sous-produits tels que le dioxyde de soufre sont relargués et transformés en acide sulfurique. La transformation engage donc une succession de réactions chimiques qui peuvent fortement polluer le sol localement en cuivre et en acide. La contribution anthropique aux teneurs en cuivre dans les sols agricoles est d'origine diverse. Les apports sont principalement liés à des ajouts locaux effectués par l'agriculteur, voir liés à des apports aériens diffus involontaires provenant de parcelles voisines ou plus lointaines. Sauf exception, il s'agit d'apports de fongicides en viticulture et arboriculture. Ils peuvent également provenir d'apports de dégradation des végétaux contaminés par l'activité humaine, et ces apports peuvent se faire directement par l'agriculteur, ou indirectement par l'activité éolienne ou par ruissellement. L'activité humaine est donc plutôt une source de contamination des sols. Toutefois, Juste et al. (1995) ont montré que les pratiques agricoles par rapport au cuivre peuvent fonctionner en puits de contamination. En effet, l'épandage des boues d'épuration permet une redistribution de certains éléments nutritifs tels que le phosphate et l'azote, ainsi que d'oligo-éléments (Cu, Mn et Zn) mais aussi d'autres éléments en trace métalliques (Cd, Cr, Ni, Hg, Pb).

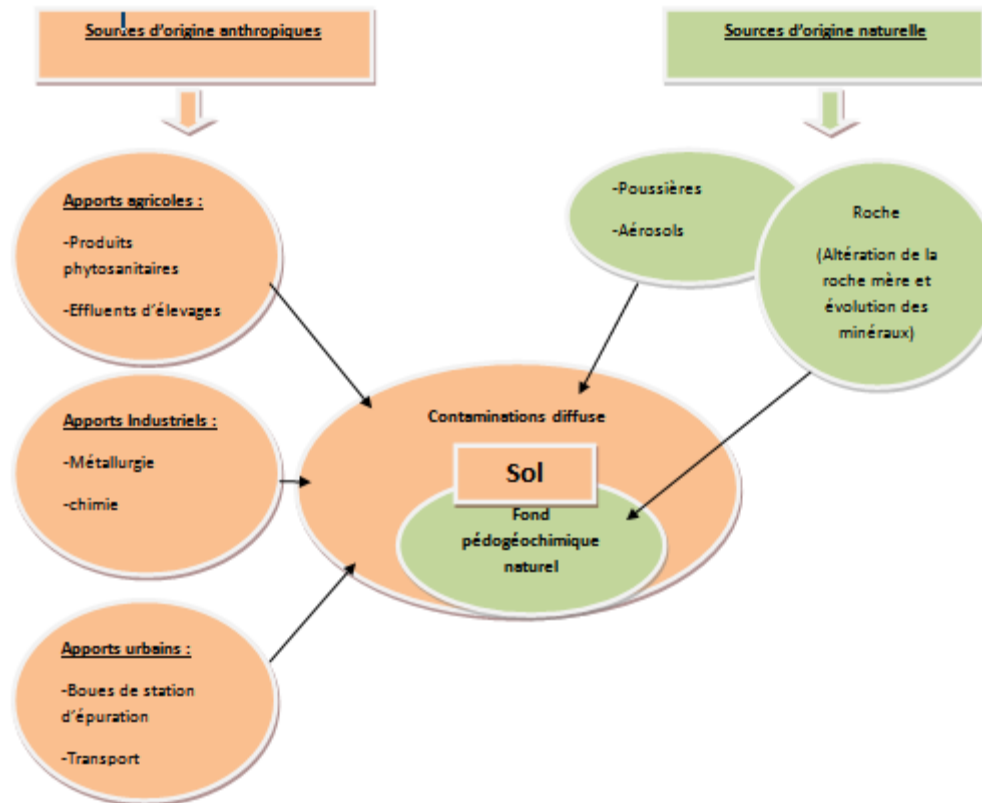


Figure 1 : Sources du cuivre dans le sol (Soes,2009).

1-3- Comportement du cuivre dans le sol

Dans le sol, le cuivre peut être :

- Inclus dans les réseaux cristallins des minéraux primaires (c'est-à-dire hérités de la roche mère mais non altérés) et des constituants secondaires (issus de l'altération pédogéochimique).
- Incorporé dans les êtres vivants : les organismes végétaux et animaux morts ou vivants, restitués dans la solution de sol, lors de leur minéralisation, ainsi que les micro-organismes.
- Associé sous une forme plus ou moins échangeable (cation ou anion), à des surfaces réactives du sol tel que les argiles, les oxydes de Fer ou la matière organique.
- Présent sous une forme soluble ou colloïdale potentiellement mobile (Navel,2011) .

Le comportement du cuivre dans le sol dépend de nombreux facteurs : le potentiel hydrogène (pH), le potentiel redox, la capacité d'échange cationique (CEC), le type, la distribution et la vitesse de décomposition des matières organiques (MO), la présence d'oxydes, les proportions d'argiles, de limons, de sables, en plus les conditions climatiques et le type de végétation (Adriano, 1986 ; Dameron et Howe, 1998).

Le cuivre forme des liaisons avec les composants du sol plus fortes que les autres cations divalents et la distribution du cuivre dans la solution de sol est moins affectée par le pH que celle des autres métaux (Adriano, 1986 ; ATSDR, 1990 ; Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Baker et Senft, 1995). Néanmoins, les grandes tendances suivantes peuvent être mises en évidence : le cuivre est plus soluble et plus mobile à des pH inférieurs à 5 (Adriano, 1986) ; l'adsorption du cuivre par les sols est en général le processus dominant à pH entre 5 et 6 ; à pH supérieur à 6, la précipitation devient la réaction prépondérante (ATSDR, 1990) ; au-delà du pH 7, le cuivre n'est pratiquement plus mobile (Adriano, 1986).

Dans les sols, le cuivre se fixe préférentiellement sur la matière organique (cela concerne de 25 à 50 % du cuivre), les oxydes de fer, de manganèse, les carbonates et les argiles minéralogiques. De fait, la plus grande partie du cuivre reste fortement adsorbée dans les quelques centimètres supérieurs du sol, spécialement sur les matières organiques présentes. Le cuivre migre donc peu en profondeur, sauf dans des conditions particulières de drainage ou en milieu très acide (Adriano, 1986 ; ATSDR, 1990 ; Juste, 1995 ; Dameron et Howe, 1998 ; Juste *et al.*, 1995 ; HSDB, 2002). Par exemple, une mobilisation significative du cuivre ne se produit qu'après une lixiviation prolongée à un pH inférieur à 3 (HSDB, 2002). Inversement, la formation de complexes avec la matière organique augmente pour des pH supérieurs à 7, à cause de la plus grande solubilité de la matière organique du sol aux pH élevés (Adriano, 1986).

La spéciation chimique de cet élément permet de comprendre le devenir des métaux dans le sol. Le cuivre dans les sols est présent en solution ou plus ou moins liés aux surfaces solides suivant leur spéciation. Il interagit avec les composés organiques et inorganiques du sol, par des mécanismes de transformation chimique (sorption, complexation, précipitation, réaction d'oxydoréduction, échange cationique) ou activement contrôlés par les processus biologiques. Pour ces derniers, on peut citer la bioaccumulation ainsi que les réactions de méthylation/déméthylation (Bolan *et al.*, 2010). Il existe plusieurs types de mécanismes impliqués dans la rétention et l'interaction de l'élément avec les constituants du sol, tel que l'adsorption sur la matrice solide, l'absorption, la formation d'hydroxydes, de complexes avec les ligands, l'échange ionique en présence de solutions salines.

1-4- Biodisponibilité du cuivre dans le sol

La biodisponibilité correspond au prélèvement (aboutissant à une accumulation ou à un effet) d'un composé par un organisme donné pendant une période de temps fixée à partir d'une unité de masse de sol impliquée (Harmsen *et al.* 2005). Une définition conceptuelle de

la biodisponibilité a été donnée dans la norme ISO/DIS 11074 (*in* Lanno et al. 2004) : « la biodisponibilité représente le degré par lequel des substances chimiques présentes dans le sol peuvent être absorbées ou métabolisées par un récepteur humain ou écologique, ou peuvent être disponibles pour une interaction avec des systèmes biologiques ». D'après cette norme, trois composantes peuvent être décrites :

- La fraction du contaminant du sol qui est potentiellement disponible pour des organismes cibles et qui résulte de processus purement physico-chimiques : il s'agit de la *disponibilité environnementale* ;
- La fraction du contaminant disponible pour l'absorption par un mécanisme physiologique par l'organisme cible : elle représente la *biodisponibilité environnementale* ;
- L'accumulation et/ou l'effet du contaminant dans l'organisme : cette dernière correspond à la *biodisponibilité toxicologique*.

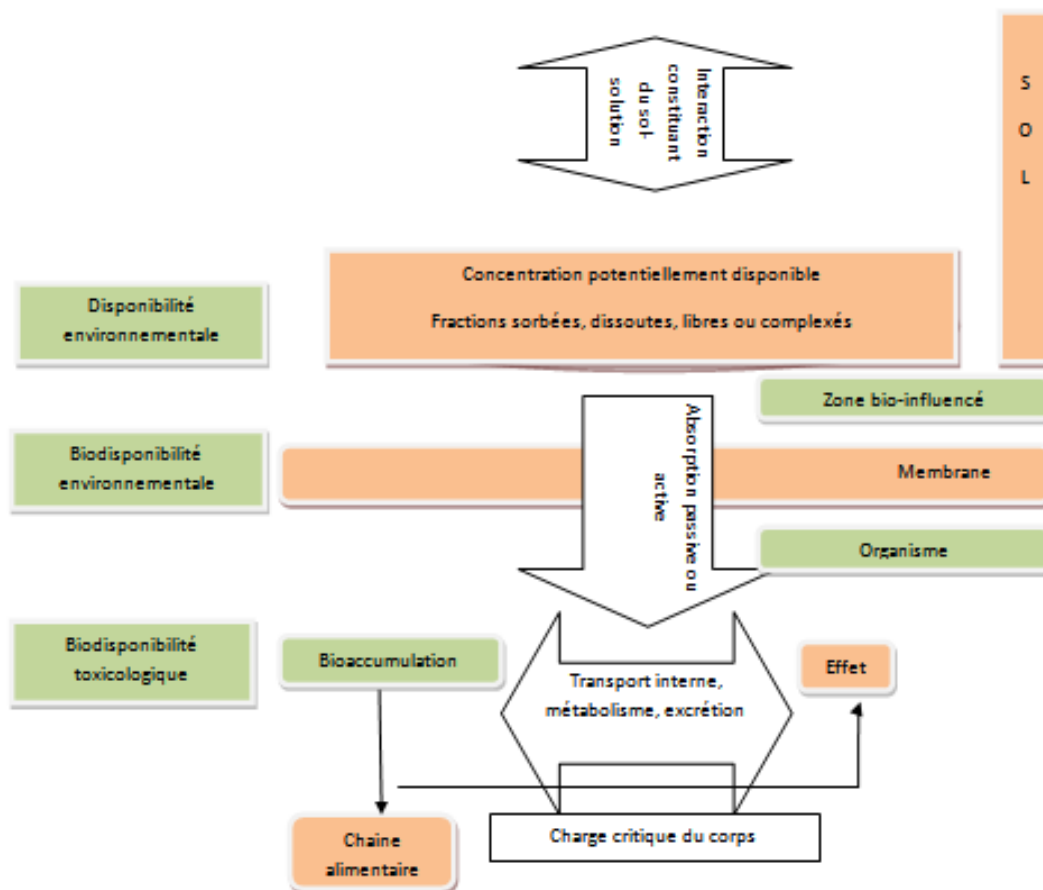


Figure 2 : Concepts de biodisponibilité (ISO/DIS17402 cité par Lanno et al. 2004)

1-6- Impact du cuivre dans le sol

L'impact d'un métal, tel le cuivre, dans les sols et particulièrement sa toxicité sur les organismes vivants dépend de sa spéciation dans le milieu. Cependant, la réponse des organismes (individus ou populations) ne sont pas forcément affectées par la concentration totale du métal dans le sol, mais par la fraction qui est biologiquement disponible sur un temps donné en fonction des conditions particulières du sol (Harmsen et al. 2005). La détermination de la fraction biodisponible du métal dans le sol est une étape nécessaire pour déterminer les risques écotoxicologiques pour les organismes vivants qui y vivent.

Pour le cuivre, il est largement reconnu que sa toxicité varie avec les espèces présentes dans l'ordre décroissant suivant la forme libre Cu^{2+} la plus toxique, les hydroxydes $\text{Cu}(\text{OH})^+/\text{Cu}(\text{OH})_2$, le carbonate de cuivre (CuCO_3 , CuHCO_3^+ , $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$) et les complexes chlorés (CuCl_2) les moins toxiques. A de très faibles doses, le cuivre est un élément indispensable à la vie, par son action sur le renforcement du métabolisme des êtres vivants. Toutefois son ingestion chronique peut être fatale à des doses peu élevées (Navel, 2011).

2- Les Lombriciens (Ingénieurs des écosystèmes)

2-1- Biologie des vers de terre

2-1-1- Morphologie

Les vers de terre sont des Annélides, dont le corps très extensible est constitué par plusieurs segments. L'extrémité antérieure est pointue et l'extrémité postérieure est légèrement aplatie. La pigmentation dorsale est plus foncée que la face ventrale (fig. 3). Le vaisseau sanguin dorsal est visible au travers la surface supérieure de la peau (Carion, 2012).

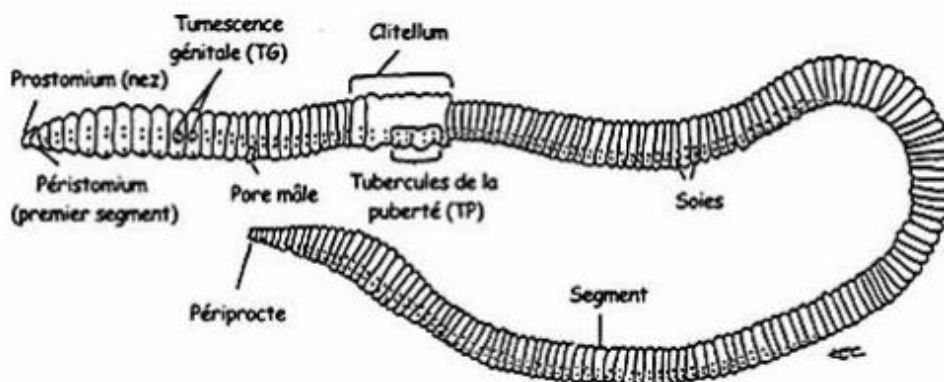


Figure 3: Schéma caractérisant la morphologie de ver de terre (UMR ECOBIO, 2012)

La taille des vers est difficile à estimer, car leur longueur peut varier du simple au double, et pour une même espèce être influencée par le pH ou l'humidité du sol (Bachelier, 1963). Elle varie de quelques millimètres à 3 mètres comme certaines espèces d'Amérique du Sud et d'Australie (Razafindrakoto, 2013)

La couleur du corps des lombrics est variée. Les genres *Lumbricus*, *Eisenia* et *Dendrobaena* qui vivent au milieu des litières en décomposition sont de couleur rouge. Les *Allolobophora* et *Octolasion* qui vivent moins en surface et ingèrent davantage de matières minérales sont de couleur gris à gris bleuté (Bachelier, 1963). Les vers des régions relativement sèches sont souvent aussi de couleur plus sombre que les vers des régions humides (Bachelier, 1978).

Les vers possèdent des soies peu nombreuses, de forme peu variée et implantées directement dans les téguments en 8 rangées groupées deux à deux (fig. 4). Chez quelques oligochètes supérieurs de la famille des Megascolecidae, ces soies sont multipliées et forment au milieu des segments une ceinture presque complète (Bachelier, 1963).

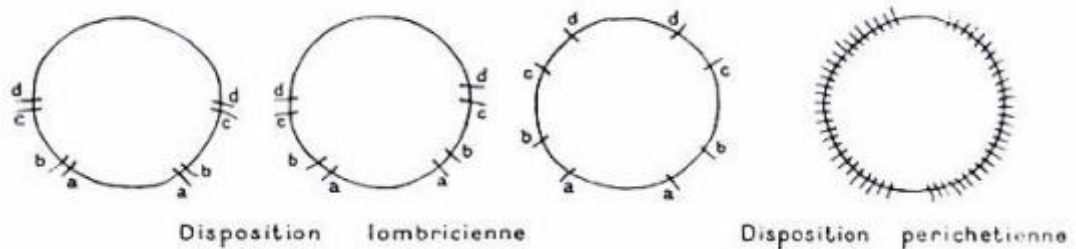


Figure 4: Disposition des soies chez les vers de terre (Bachelier, 1963).

2-1-2- Anatomie des vers de terre

D'après Lavelle et Spain (2001), les vers de terre sont des animaux qui appartiennent à la macrofaune du sol. Ils se distinguent par une anatomie allongée et circulaire. Leurs corps sont constitués par une série de nombreux anneaux successifs appelés métamères (de 60 à 200), Lesquels ont tous une anatomie à peu près semblable et se répétant régulièrement. Selon les coupes longitudinale (fig. 4) et transversale (fig. 5), on peut observer les organes suivants :

- L'épiderme, la partie supérieure de la peau des vers ;
- La cavité générale du corps, partie plus ou moins vide des vers ;
- La cavité buccale, qui représente l'entrée du tube digestif ;
- Le pharynx, est partie de tube digestif du ver de terre située après la bouche ;
- Le gésier, la poche servant d'estomac pour les vers ;

- L'œsophage, partie du tube digestif situé entre le pharynx et le jabot ;
- Le jabot, est un renflement de l'œsophage ;
- L'intestin, la dernière partie du tube digestif ;
- La chaîne nerveuse ventrale, constituée par l'ensemble des nerfs ;
- Les réceptacles séminaux, des poches relatives à la semence des vers ;
- Les vaisseaux sanguins dorsal et ventral, permettant le transport du sang ;
- Les néphridies, organe jouant le rôle des reins chez les vers ;
- Le vaisseau sanguin dorsal, transportant le sang ;
- Les vésicules séminales, petits organes creux relatifs à la semence des vers ;
- Le cœur latéral, organe du pompage sanguin des vers ;
- Les ganglions cérébroïdes, correspondant au cerveau chez les vers.
- Les muscles longitudinaux, tissus qui leur permettent d'avoir le sens de la longueur ;
- Les muscles circulaires, tissu ayant une forme circulaire ;

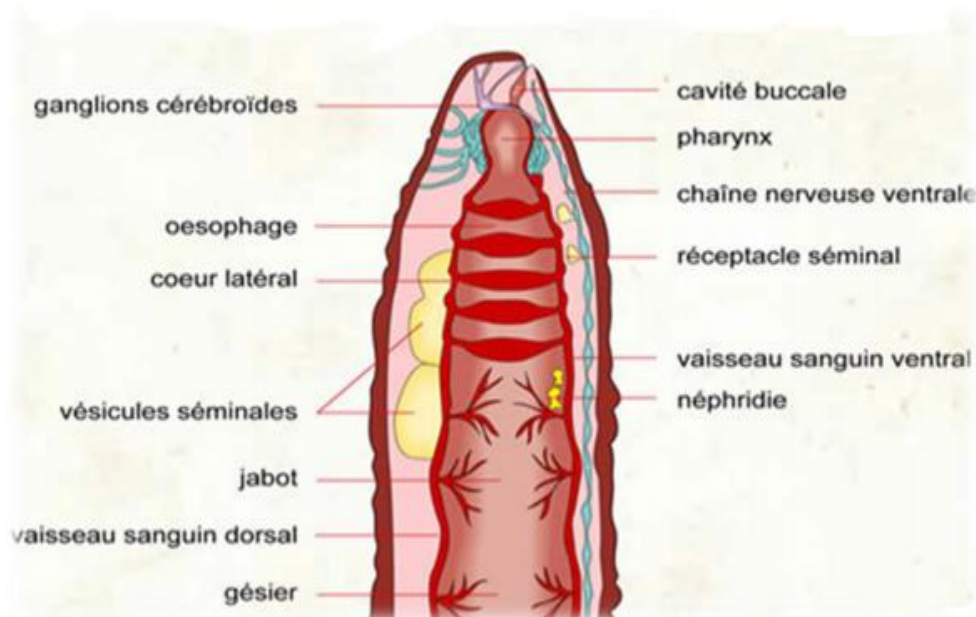


Figure 5: Anatomie interne du ver de terre (Carion, 2012).

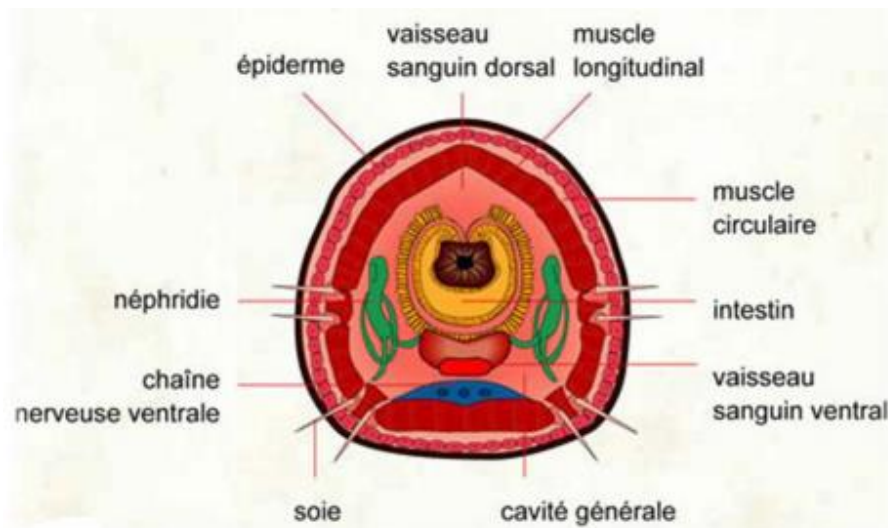


Figure 6: Coupe anatomie interne transversale du ver de terre (Carion, 2012).

2-1-3- Reproduction

Les lombrics sont hermaphrodites, ils possèdent aussi bien des organes mâles que des organes femelles. La reproduction nécessite néanmoins l'accouplement de deux individus. L'autofécondation a été rarement observée. Les vers prêts à s'accoupler gagnent la surface du sol durant la nuit ou au crépuscule pour chercher un partenaire (Strässle, 2011). Les vers se reproduisent 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 *in* Kemassi, 2015). Après l'accouplement les vers se séparent et le clitellum de chaque ver secrète un tube muqueux, puis un cocon que le ver fait glisser vers l'avant. Les deux ovaires, émettent des ovules libérés dans le cocon par les orifices génitaux femelles. Lorsque le cocon passe devant les orifices des réceptacles séminaux, le sperme libéré fertilise les ovules. La fécondation s'opère alors dans le cocon, c'est une fécondation externe, pendant la croissance embryonnaire, le cocon protège les œufs et contient les réserves nutritives. Quand les embryons ont consommé toute la matière nutritive, ils occupent la totalité du cocon et sont prêts à sortir par une des extrémités, les petits sortent de leurs cocons après une période de 3 semaines à 5 mois environ.

2-2- Catégories écologiques

Les travaux de Bouché (1971) et de Lavelle (1981) ont permis de regrouper les différentes espèces de vers en trois catégories principales : les espèces épigées, anéciques, et endogées.

- Les **épigés** : (Bouché, 1977 ; Lee, 1985) sont de petite taille (10 à 30 mm) et vivent généralement au niveau de la litière et dans les matières organiques en décomposition. On les trouvera également dans les excréments des grands herbivores ou dans le bois humides en cours de décomposition. Ces espèces sont localisées en surface et sont donc particulièrement sensibles à la prédation, aux variations climatiques et aux facteurs anthropiques tels que le labour des horizons de surface et l'usage de produits phytosanitaires. Les vers de terre épigés jouent un rôle important dans le recyclage de la matière organique.
- Les **anéciques** : (Bouché, 1977) sont des individus de taille moyenne à géante, dans le cas des espèces méditerranéennes, (10 à 110 cm) vivant dans des galeries verticales à subverticales plus ou moins ramifiées et s'ouvrant en surface. Au cours de l'ingestion du sol et de l'enfouissement de la matière organique, ils assurent un mélange intime de la matière organique et de la fraction minérale des différents horizons du sol. Ces espèces, localisées sur toute la hauteur du profil, disposent d'une forte musculature leur permettant de s'adapter à des compacités de sol relativement élevées et de résister aux pressions anthropiques connues en sols cultivés.
- Les **endogés** : (Bouché, 1977) sont de taille variable (1 à 20 cm). Ils représentent 20 à 50% de la biomasse des terres fertiles et vivent en permanence dans le sol où ils creusent des galeries d'orientation quelconque. Ces vers se nourrissent de terre plus ou moins riche en matière organique et se déplacent donc beaucoup pour satisfaire leurs besoins alimentaires. Lavelle, (1981) précise cette classification en fonction de la richesse en matière organique du sol qu'ils ingèrent. Il existe trois sous-catégories d'endogés : poly-, méso-, et oligo-humiques. Les endogés qui ingèrent le sol le plus pauvre en matière organique sont des oligo-humiques. Ils ont été couramment observés près des racines.

Cette classification a été réalisée sur des critères physiologiques, morphologiques et écologiques (répartition selon la profondeur du sol, l'alimentation, la pression des prédateurs, la mobilité superficielle, la taille, la longévité et la résistance à la sécheresse). Cette

classification a également été basée sur les stratégies "r" et "K" proposées par Mac Arthur et Wilson (1967) :

- la stratégie r correspond à une production précoce d'un grand nombre de jeunes et à une mortalité élevée. Il s'agit d'une adaptation à des habitats perturbés.
- la stratégie K est basée sur une durée de vie plus longue, et une reproduction rare et tardive. Les conditions de vie sont plus favorables avec des approvisionnements réguliers en ressources et des habitats peu perturbés.

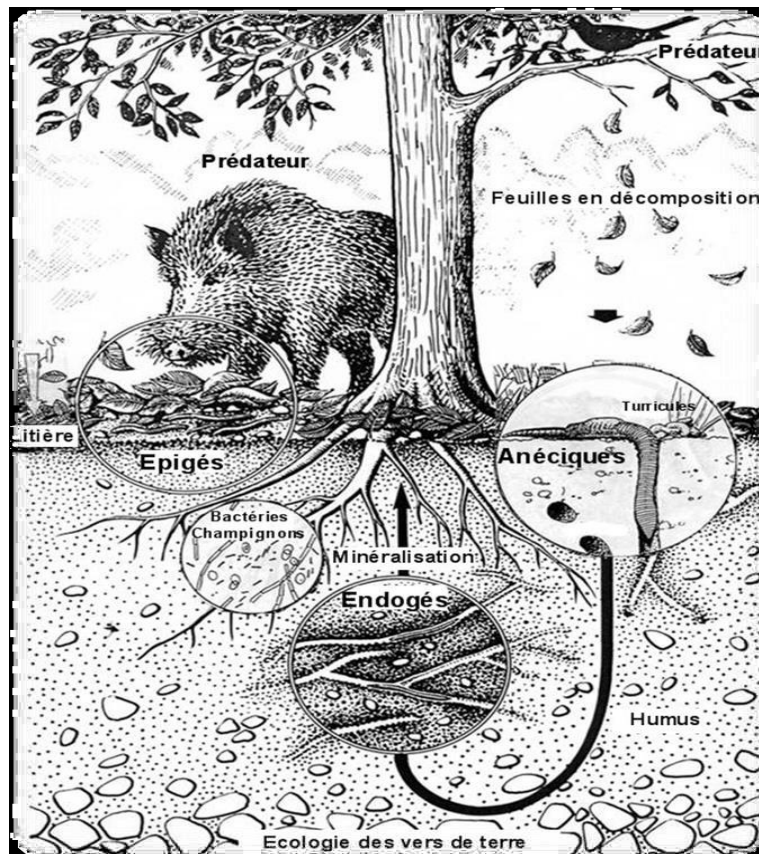


Figure 7 : les trois catégories écologiques de vers de terre (INRA,2013).

2-3- Cycle de vie et stratégies de survie

D'une façon générale, l'éclosion des cocons donne un à plusieurs vers de petites tailles, c'est le stade « juvénile ». Ces vers juvéniles vont progressivement acquérir des caractères sexuels secondaires externes liés à l'accouplement comme le puberculum ou les pores sexuels ; ils seront alors au « stade sub-adulte ». Le clitellum, organe lié au processus de ponte, va ensuite se former et permet au ver de devenir sexuellement mature pour pouvoir se reproduire à son tour, ils seront cette fois-ci au stade « adulte ». Le temps de maturation et la durée de vie des vers de terre varient selon l'espèce, le biotope et des conditions dans lesquelles ils vivent (RAZAFINDRAKOTO, 2013).

Chacune des catégories écologiques possède une stratégie de survie différente (tableau 3). Les épigés ont une durée de vie très courte (moins de six mois), un développement rapide, ils présentent une forte prolificité et passent les périodes défavorables sous forme de cocon. A l'inverse, endogés et anéciques, bien moins prolifiques ont un temps de génération plus long (surtout les anéciques), et une durée de vie beaucoup plus importante (jusqu'à dix ans). Ces derniers lorsque les conditions sont difficiles s'enfoncent dans le sol et rentrent en diapause ou en quiescence. Globalement, le printemps correspond à la période de ponte et l'automne au développement des juvéniles (Pelosi et al., 2009).

Tableau 3: Stratégie de survie des différentes catégories ecologiques (Cluzeau D.,com.pers.)

Categorie s	Nombre de cocons / mois	Nombre d'embryons / cocons	Nombre de descend Ants / mois	Temps pour produire un cocon (jours)	Durée du développement embryonnaire (semaines)	Durée de la phase imature (semaines)	Temps de génération (mois)	Saisons défavorable	Espérance de vie
Épigés	4 à 8	2 à 4	8 à 32	5 à 7	3 à 4	3 à 5	2 à 2.5	Cocons	< 6 mois
Endogés	1	1.1	1 à 1.1	30	4 à 8	3 à 6	8 à 15	Quiescence	5 à 10 ans
Anécique s	1	1	1	30	5 à 12	3 à 12	9 à 24	Diapause	8 à 10 ans

2-4- Rôle des vers de terre dans le sol

Les vers de terre sont appelés les « ingénieurs de l'écosystème » (Jones et al., 1994). Ce concept s'applique particulièrement bien aux lombriciens qui modifient les composantes physiques (*via* leurs effets sur la porosité et l'agrégation du sol) et organiques (*via* leurs effets sur la minéralisation) dans un sens qui améliore les conditions d'alimentation des cultures.

Selon Albain (2002) et Peres (2003), les principaux rôles des vers de terre dans le sol sont :

- *Aération, drainage et résistance à l'érosion du sol* (fertilité physique) :

Les galeries creusées par les vers constituent des voies préférentielles d'écoulement des eaux, ce qui favorise le drainage et limite la déstructuration du sol. De plus, la stabilité structurale du sol est renforcée en surface par le dépôt de déjections « turricules » dont la composition physique et chimique assure une forte cohésion particulaire. Les pores permettent aussi une bonne diffusion des gaz au sein du sol et assurent leur disponibilité pour la faune et la flore.

- *Enrichissement en éléments essentiels et biodisponibilité* (fertilité chimique) :

Les produits issus de la métabolisation de la MO sont en grande partie excrétés sous forme de mucus, d'urine ou de fèces. Ces émissions constituent des microsites particuliers, à la surface du sol et au sein même des galeries, qui présentent un enrichissement en carbone, en azote et autres nutriments (phosphate, potassium, magnésium, ammonium, etc.) directement assimilables par les racines des végétaux.

- *Induction de l'activité des micro-organismes* (fertilité biologique) :

Ces structures micrositiques représentent aussi une source nutritive pour les communautés microbiennes qui s'y développent et favorisent ainsi le développement des micro-écosystèmes localisés.

2-5- Bioindication de la qualité des sols

En plus de leurs rôles dans le sol, les vers de terre sont de bons candidats pour la détermination de la qualité des sols (Drobne, 1997, Cortet et al., 1999, Lanno et al., 2004, Van Zwieten et al., 2004, Eijsackers et al., 2005, Snyman et al., 2009). Dans le sol, ces organismes invertébrés sont en contact direct et constant avec les différents constituants du sol. Ils peuvent être contaminés par des éléments exogènes suite à une exposition cutanée ou par ingestion (Vijver et al., 2003). La surface externe est très vascularisée, ce qui permet une entrée directe des contaminants présents dans le milieu. Son mode alimentaire fournit également une autre porte d'entrée de ces éléments *via* l'ingestion de particules de sol (Lanno et al., 2004). 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* les chaînes alimentaires (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 le sol (Ireland, 1983). La reproduction du ver de terre peut aussi être altérée par la présence d'un stress dans son environnement (Morgan et al., 1999). Tous ces

critères font des vers de terre de bon bioindicateurs de la contamination des écosystèmes terrestres (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, des HAPs (Edwards et Bohlen, 1992; Booth et al., 2000) et des explosifs (Robidoux et al., 2005).

Selon Bouché (1972), Bachelier (1978) et Lee (1985), les nombreux avantages permettant l'utilisation des vers de terre dans la bioindication et la biosurveillance de la qualité des sols sont :

- *Une bonne représentativité* : ils vivent en permanence dans le sol et constituent la partie la plus importante (60 à 80 % en biomasse). Toutes les fonctions vitales, telles que l'alimentation, la respiration, la reproduction et l'excrétion se produisent dans le sol, à l'exception de vers épigés, qui vivent à la surface du sol (dans la litière).
- *Une large répartition géographique* : ils colonisent tous les sols et sous différents climats. Une grande partie des espèces est cosmopolite, permet la constitution d'une vaste base de données et la comparaison d'études réalisées sur différents sites, au niveau local comme international.
- *Une intégration rapide des variations des conditions de milieu* : ces organismes peuvent réagir directement aux polluants. Leur grande sensibilité aux facteurs environnementaux et la très grande spécificité de certaines espèces dans leurs préférences et tolérances écologiques renseigne sur un grand nombre de paramètres physico-chimiques des sols. De plus, leurs mouvements (horizontal et vertical) dans le sol permettent d'obtenir, à la différence des analyses physicochimiques, une mesure intégrée dans le temps des variations de la qualité du milieu.
- *Des facilités d'échantillonnage et de conservation des prélèvements* : ils ont une constitution corporelle relativement constante. Leur durée de vie est assez longue (jusqu'à 10 ans). *In situ*, ils sont disponibles presque toute l'année. Leur taille et leur masse facilitent leur capture sur le terrain et sont assez robustes pour être élevés au laboratoire et subir des manipulations. Dans le cas où il y a absence de vers autochtones dans le sol, l'apport de vers allochtones se fait sans aucun impact sur ceux-ci. Cependant, les vers allochtones reflètent mieux les changements de qualité des sols qui composent leur environnement que les espèces exotiques *a priori* plus compétitives.

Tous ces critères font par conséquent des vers de terre d'excellent bio-intégrateurs de la qualité des milieux édaphiques. Ils peuvent donc être utilisés lors de travaux en laboratoire que lors d'expérimentations *in situ*. Sur le terrain, on utilise des mésocosmes afin de permettre aux vers d'évoluer dans les milieux naturels tout en étant récupérables à la fin de l'expérience pour des analyses (Robidoux et al. 2004b, Robidoux et al. 2005). Au laboratoire, ils constituent une bonne alternative à l'utilisation de mammifères dans les études de toxicité. (El-Hadef El-Okki,2016)

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1- Matériel utilisé

Dans le cadre des expérimentations réalisées, nous avons utilisé le matériel suivant :

1-1- Matériel biologique

Le taxon *Aporrectodea trapezoides* Dugès, 1826 a été utilisé pour les différents tests. Il fait partie de la famille des Lumbricidae (Rafinesque-Schmaltz, 1815) :

Règne : Animalia

Embranchement : Annelidae

Classe : Oligochaeta

Sous-Classe : Diplotesticulata

Super-Ordre : Megadrili

Ordre : Opisthopora

Sous-Ordre : Lumbricina

Famille : Lumbricidae

Genre : *Aporrectodea*

Espèce : *A. trapezoides* (Dugès, 1826)



Figure 8 : Le taxon *A. trapezoides* (Dugès 1826).

Ce taxon appartient à la catégorie des endogés, endogés « anécique » selon (Bouché, 1984), endogés polyhumique selon James (2000) et épi-endogés selon Winsome *et al.*, (2006) et Blakemore (2008). Il est rencontré dans les 15 premiers centimètres du sol (près de la surface).

A. trapezoides est une espèce de taille moyenne à grande, 45 à 160 mm de longueur et 0,5 à 3,5 g de biomasse pour les vers adultes (El-Hadef El-Okki, 2016). Selon Bouché (1972), cette espèce présente un caractère eubiotique peuplant les milieux dont le C/N < 13. Elle est rencontrée dans les jardins, les champs cultivés, les forêts, les sols de divers types, les rives de cours d'eau, et occasionnellement les sols sableux dans les oasis (Blakemore, 2008). En effet, cette espèce est raisonnablement tolérante à la sécheresse (Fernandez, 2010). Son aire de répartition originaire correspond au Paléarctique, est actuellement distribué à travers les cinq continents (espèce cosmopolite). Son introduction est due à la diffusion de pratiques agricoles européennes et l'utilisation généralisée de ce ver de terre comme appâts pour la pêche (Blakemore, 2008). En 1948, Omodeo décrit déjà ce taxon comme le ver le plus commun dans le monde.

Au niveau méditerranéen, ce taxon domine le peuplement lombriciens à la fois en biomasse et en nombre d'individus (Omodeo *et al.*, 2003). En plus, il est souvent le seul représentant des vers de terre dans ces sols en raison de sa capacité à s'adapter à des conditions environnementales extrêmes (Fernández, 2012). En Algérie, *ce taxon* est aussi le plus abondant et parfois même constitue le seul représentant de cette faune dans le sol (El-Hadef El-Okki, 2016).

Les vers du taxon *A. trapezoides* ont été récoltés dans la même région que les sols (commune de Didouche Mourad). Ils ont été maintenus en vie dans des bacs en plastiques jusqu'à leur utilisation. Avant chaque test, les vers adultes (présence de clitellum) sont prélevés de leurs bacs. Ils ont été rincés à l'eau distillée, puis égouttés sur un papier filtre. Afin de vider leur tube digestif, les vers ont été placés individuellement dans des boîtes de Pétri munies de papier filtre imbibé d'eau distillée. Les boîtes sont conservées à l'obscurité pendant 24 heures. Après cette période, les vers sont retirés de leurs boîtes et sont aussitôt pesés séparément (biomasse fraîche initiale : B₁). Les vers sont ainsi prêts à intégrer les différentes batteries de tests.

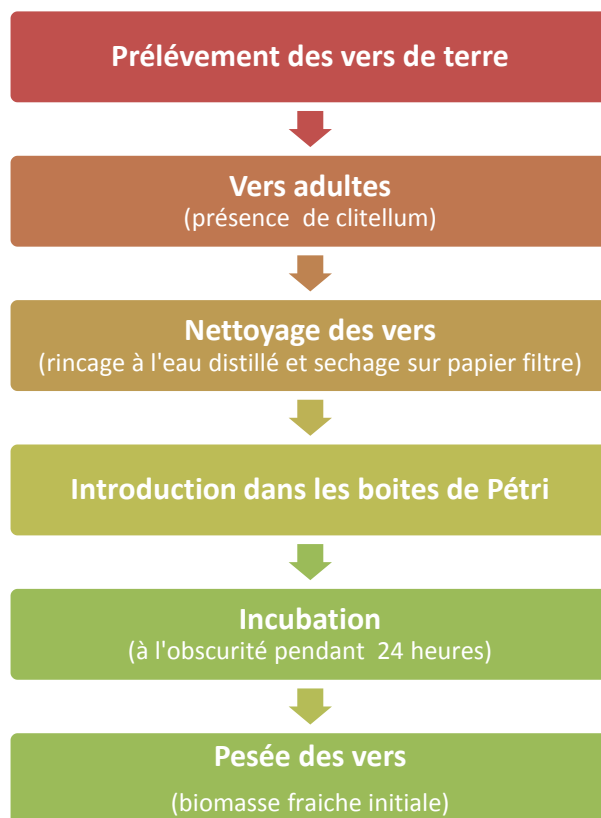


Figure 9: Préparation des vers récoltés pour les différents tests.

1-2- Le composé chimique

Le sulfate de cuivre est un composé chimique ionique. La formule brute du sulfate de cuivre est CuSO_4 , composé d'ions sulfates (SO_4^{2-}) et d'ions cuivre II (Cu^{2+}). Il est souvent commercialisé sous forme anhydre, mais également sous certaines formes hydratées. Sous sa forme anhydre, il est blanc et hygroscopique. Au contact de l'eau, il bleuit. Le sulfate de cuivre est un produit toxique qu'il faut manipuler avec précaution. Il peut causer des graves intoxications mais il est aussi irritant en cas de contact avec la peau.

En agriculture, le sulfate de cuivre est utilisé pour ses propriétés antifongiques. Il entre dans la composition de plusieurs bouillies, dont la plus connue est la bouillie bordelaise. Cette dernière représente un vieux fongicide couramment utilisé pour combattre le mildiou (maladie fongique des vignes). Elle est fabriquée en neutralisant du sulfate de cuivre avec de la chaux. Son fonctionnement réside sur le fait que les ions cuivre présents dans le produit vont bloquer la germination des champignons en altérant les enzymes présents dans leurs spores. Il faut donc utiliser la bouillie bordelaise de manière préventive, avant que la maladie ne se développe. L'application de la bouillie bordelaise se fait directement sur les feuilles des plantes concernées, une à plusieurs fois durant l'année.

Dans cette étude, le sulfate de cuivre est utilisé sous sa forme hydratée liée à cinq (5) molécules d'eau, appelé pentahydrate (fig. 10). La coloration bleue de ce composé est due à la présence d'ions cuivre. Les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 4.



Figure 10 : sulfate de cuivre pentahydraté $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Tableau 4: caractéristiques du sulfate de cuivre pentahydrate.

Nom	Sulfate de cuivre pentahydrate
Formule	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Apparence	Poudre bleue
Masse molaire	$249,6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Température de fusion	110°C
Solubilité	$317 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
Masse volumique	$2,3 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

1-3- Le sol

Pour les différents tests, le sol utilisé est prélevé à la surface (horizon superficiel : 10–30 cm) dans la région de Didouche Mourad. Il s'agit d'un sol naturel non influencé par l'activité humaine. La préparation du sol prélevé est réalisée selon la norme ISO-11464 (ISO., 2006) suivant les cinq étapes illustrées dans la figure 11.

- En premier lieu, les grosses mottes de terre ont été brisées manuellement ;
- Le sol est ensuite séché sur du papier kraft à l'air libre pendant 7 jours ;
- Les petites pierres et les débris végétaux ont été retirés et les agrégats réduits à l'aide d'un mortier ;
- Le sol est tamisé à travers un tamis à mailles de 4 mm afin d'éliminer les gros éléments et les débris végétaux et obtenir ainsi une fraction homogène ;
- Enfin, les sols ont été conservés dans un bac en plastique fermé hermétiquement à la température ambiante jusqu'à leurs utilisations.

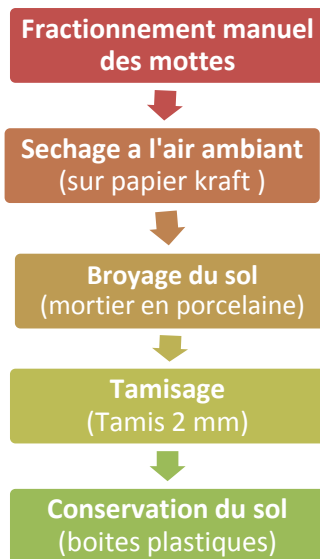


Figure 11 : Préparation des sols pour les tests de toxicité et d'évitement.

Les analyses physicochimiques réalisées sur ce sol sont

- le pH : il est déterminé à l'aide d'un pH-mètre - Nahita 903 (Annexe 1) selon la norme NF X 31-103 (AFNOR, 1998). Le rapport pondéro-volumique sol/eau est de 1/2,5. La prise d'essai est de 10 g de sol.
- La conductivité électrique (CE) : elle est déterminée à l'aide d'un conductimètre - WTW/Multi 3420 (Annexe 1) selon la norme ISO-11265 (ISO., 1994). Le rapport pondéro-volumique sol/eau est de 1/5. La prise d'essai est de 10 g de sol. Le résultat est exprimé en $\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$.
- Le calcaire total (CT) : il est déterminé à l'aide du calcimètre de Bernard (Annexe 1) selon la norme ISO-10963 (ISO, 1995a). La prise d'essai est de 0,5 g de sol. La teneur en calcaire total est exprimée en %.

Selon les résultats obtenus, il s'agit d'un sol à pH neutre ($7,0 \pm 0,1$), non salin ($0,42 \pm 0,01 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$) et modérément calcaire ($5,73 \pm 0,71 \%$).

1-4- Le terreau

Le terreau (support de culture NFU 44 551) est ajouté au sol comme apport nutritif mis à la disposition des vers de terre durant la période des tests. Il est composé d'un mélange de tourbe blonde de sphaigne et de tourbe brune. Il est enrichi en engrais composés NPK (14-10-18). Ce terreau est de provenance des Pays-Bas (Ferm O Feed) commercialisé en Algérie sous le nom « Fertiplus » dont les caractéristiques physico-chimiques sont données dans le tableau suivant :

Tableau 5: Caractéristiques physico-chimiques du terreau Fertiplus de Ferm O Feed.

Paramètres	Valeurs
pH	5,2 à 6,2
Matière sèche	30 à 40 %
Conductivité électrique	10 à 65 mS/m
Capacité de rétention d'eau	500 à 780 ml/l
Matière organique	55 à 90 %

1-5- Les supports

Les supports utilisés (annexe 3) dans les différents tests sont :

- a- *Les pots* en polychlorure de vinyle, de forme cylindrique, de taille moyenne (20 cm d'hauteur et 8 cm de diamètre).
- b- *Les boîtes de pétri* en polystyrène cristal, stérile, de diamètre 90 mm.
- c- *Les containers cylindriques* en acier galvanisé, de 10 cm de hauteur et 28 cm de diamètre. Chaque cylindre est partagé en six compartiments triangulaires reliés à une chambre centrale. L'ensemble est muni de trous dans la base (d'environ 1 cm² de dimension) permettant au vers de terre de circuler librement entre les différents compartiments.

2- Tests de toxicité et d'évitement

Afin de mieux identifier et quantifier l'influence du sulfate de cuivre sur les vers de terre, il est nécessaire de réaliser des expérimentations dans des conditions de laboratoire. L'usage de ces systèmes dits « contrôlés » permet de s'affranchir des variations des conditions biotiques et abiotiques du milieu naturel et de comparer les effets du composé testé sur les individus misent en expérience. Les vers et le sulfate de cuivre constituent alors les seuls facteurs variants entre ces systèmes.

Les tests réalisés comprennent 3 types d'essais : un essai de toxicité aiguë dans le sol (Essai 1), un essai de toxicité par contact sur papier filtre (Essai 2) , et un test d'évitement dans des cylindres compartimentés (Essai 3).

2-1- Tests de toxicité aigue

En fonction du type de support et de la durée, deux tests ont été réalisés :

2-1-1- Test de toxicité aigüe dans le sol

Le test de toxicité dans le sol est basé sur la directive n° 207 de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OECD., 1984). Ce test a pour objectif de déterminer la dose létale médiane (DL_{50}) et l'évaluation de l'effet de la présence du sulfate de cuivre sur la croissance des vers de terre durant la période du test (14 jours). Dans notre cas, le sol artificiel a été remplacé par un sol naturel (Römbke et al., 2006) et le taxon *Eisenia fetida* par *A. trapezoides*.

Dans chaque pot de culture, environ 1 kg du mélange sol-terreau sont préparé avec les proportions respectives 85 % et 15 %. Des quantités croissantes de sulfate de cuivre (sous forme de poudre) ont été bien mélangées au sol. Par la suite, les sols sont ré humidifié avec de l'eau distillée jusqu'à 80 % de leurs capacités maximales de rétention.

Au début du test, les vers adultes d'*A. trapezoides* sont pesés séparément. Ils sont ensuite introduits délicatement dans le sol de façon à obtenir un contact intime avec l'échantillon. Les pots sont ensuite recouverts à l'aide d'un tissu perforé assurant une bonne aération et évitant la fuite des vers de terre. Les pots sont incubés dans les conditions de laboratoire durant 14 jours (durée du test).

Les observations ont été réalisées après 24 heures (J_1), sept jours (J_7) et à la fin du test (quatorze jours, J_{14}). Chaque fois, les pots sont vidés de leur sol et les vers sont séparés délicatement du sol ce qui permet de constater les différents changements morphologiques, comportementaux et aussi de déterminer la mortalité chez les vers testés. Les vers vivants sont pesés ensuite remis dans le sol et ceux morts sont retirés des pots.

Pour ce test, on a utilisé 5 doses croissantes du sulfate de cuivre pentahydrate (1, 10, 100, 1000 et 5000 ppm). Pour chaque dose, 3 répétitions ont été réalisées. En plus du témoin (0 ppm) et de la dose appliquée au champ (6000 g/Ha), on dispose de 21 pots de culture (fig 12) répartis comme suit :

- 3 pots pour le contrôle (témoin),
- 15 pots pour 5 doses croissantes,
- 3 pots pour la dose au champ.

Le nombre total de vers utilisé est de 105 vers, à raison de 5 vers par pot.

Durant l'essai, il faut vérifier occasionnellement si le milieu conserve suffisamment son humidité. S'il y a lieu, il faut réhydrater à l'aide d'une vaporisation d'eau distillée.

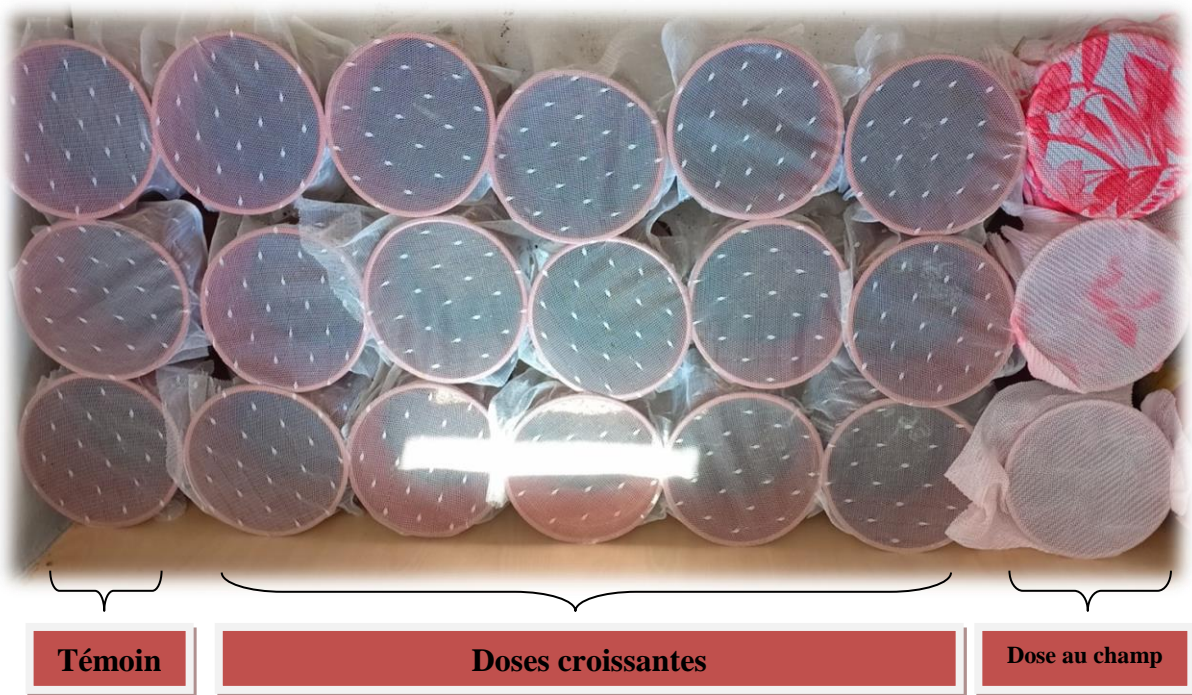
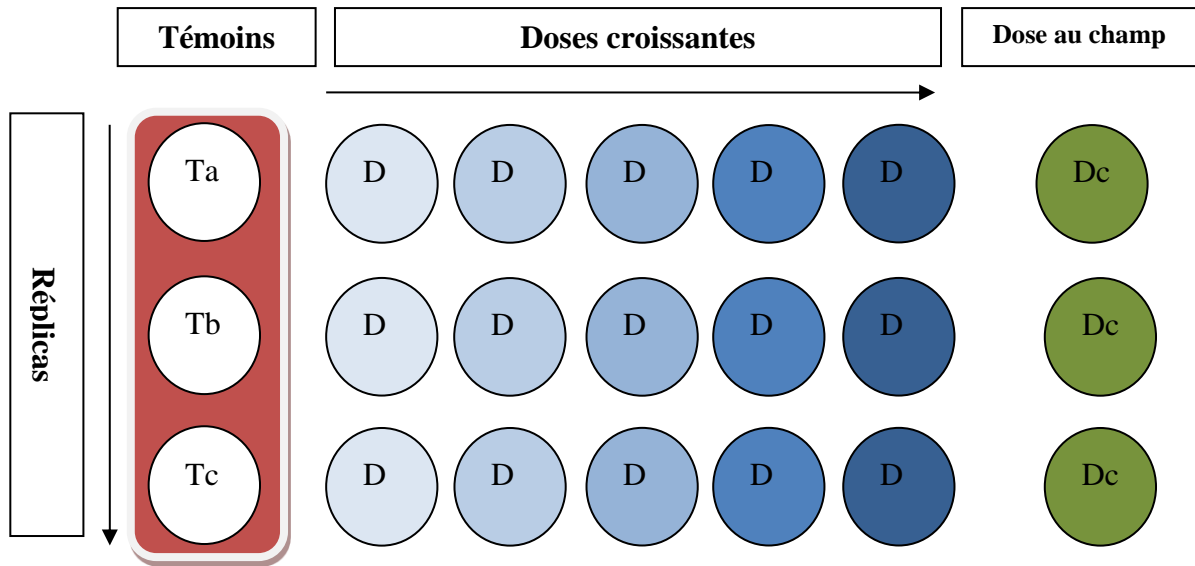


Figure 12 : Plan expérimentale du test de toxicité aiguë dans le sol.

2-1-2- Test de toxicité aigüe sur papier filtre

Le test a été réalisé selon la même référence précédente (OECD., 1984). Il s'agit d'un test de contact dans lequel les vers de terre sont exposés directement au sulfate de cuivre pulvérisé sur un papier filtre. Tel que recommandé par Wang et al. (2012), les flacons ont été remplacés par des boîtes de Pétri (fig. 13). Dans le cas de notre étude, cinq concentrations croissantes ont été utilisées : 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 6 ; 12 mg de Cu/ cm².

Dans les boîtes de Pétri, on place le papier filtre Whatman no 1. Ce papier est traité préalablement avec la solution de la concentration correspondante de sulfate de cuivre puis ré-humidifié avec 2 ml d'eau distillé. Le même volume d'eau distillée est ajouté dans les boîtes servant de témoin (non contaminés). Trois répliques ont été réalisées pour chaque concentration, ce qui fait qu'on a utilisé 18 vers au total. La durée du test était de 48 heures.

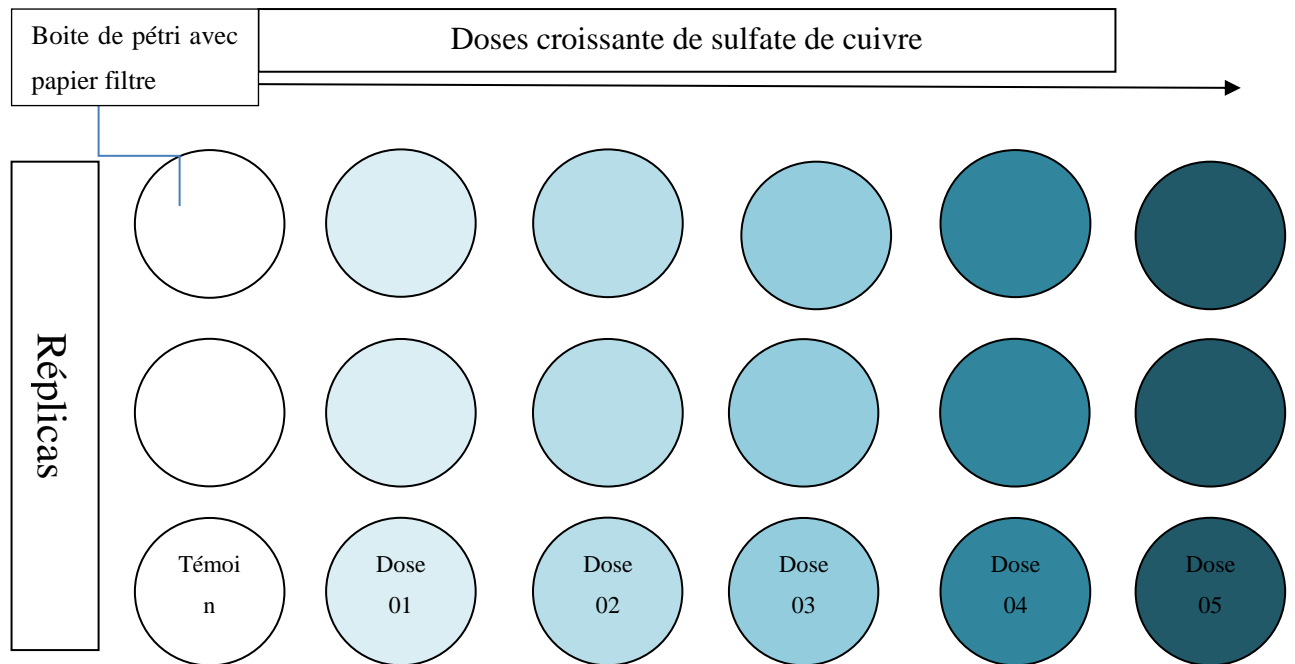


Figure 13 : Plan expérimentale du test de toxicité aigu sur papier filtre.

2-1-3- Mesures et observations

Il s'agit des phénomènes qui sont liés à la toxicité du sulfate de cuivre vis-à-vis du taxon *A. trapezoides* : mortalité, diminution de la biomasse, ainsi que tous les symptômes comportementaux ou pathologiques. Elles ont été effectuées en fonction de la durée du test, *i.e.* au 1^{er} jour, au 7^e jour et au 14^e jour pour le premier test (dans le sol), et après 24 heures et 48 heures pour le second test (sur papier filtre).

2- *la biomasse* : elle correspond au poids des vers à chaque étape d'observation. Comparées à celles enregistrées dans les témoins, elles permettront de déterminer l'effet de l'augmentation des doses du sulfate cuivre sur la biomasse des vers testés.

b- la mortalité : elle est évaluée en testant la réaction des vers à un stimulus mécanique exercé à leur extrémité antérieure (prostomium). Ainsi, le ver est considéré comme mort lorsqu'il ne répond pas à ce stimulus. Les vers morts sont retirés et notés à chaque étape d'observation. Les données de la mortalité enregistrée en fonction des concentrations permettent de déterminer la dose létale médiane (DL₅₀).

3- *les changements* : d'ordre comportementaux ou pathologiques, peuvent être observés chez les vers testés durant les expérimentations, tels : des gonflements anormaux, des gonflements accompagnés de saignement, l'enroulement et des fragmentations, etc.

4- *la dose/concentration létale médiane (DL₅₀ / CL₅₀)* : consigné dans la directive n° 207 de l'OCDE (1984), les données de la mortalité enregistrée en fonction des doses et des concentrations permettent de déterminer la DL₅₀ ou la CL₅₀ et leur intervalle de confiance (à 95 %) à 7 et 14 jours pour le 1^{er} essai (test dans le sol) et à 24 et 48 heures pour le 2^e essai (test sur papier filtre). Les valeurs de la DL₅₀ ou la CL₅₀ sont obtenues par une équation de régression (théorique) en prenant en compte les Probits des mortalités corrigées et la transformation logarithmique des doses/concentrations (Litchfield et Wilcoxon, 1949). Les calculs et les représentations graphiques ont été réalisés en utilisant le logiciel NCSS data analysis, version 2019 (NCSS Statistical Software, USA).

2-2- Test d'évitement

Ce test a été développé en 1996 par Yeardley et al. (1996). En 2008, l'ISO a établi des lignes directrices des tests d'évitement pour un rapide dépistage et l'évaluation de la fonction des sols et de l'influence des contaminants et des produits chimiques sur le comportement des

vers de terre. Le test évalue l'influence des substances chimiques sur le comportement d'évitement des vers de terre (*Eisenia fetida*) exposés pendant 2 jours à un échantillon de sol naturel contaminé ou à des concentrations connues de substance d'essai mélangée à un sol artificiel normalisé ou à un sol naturel.

Pour ce test, on a utilisé des containers comportant 6 chambres séparées les unes des autres par des parois fixes munies d'ouverture d'environ 1 cm à la base afin de permettre aux vers de terre de se déplacer librement entre les compartiments. Les chambres sont intercalées vis-à-vis de la contamination du sol par les considéré (fig. 14). Les cloisons amovibles permettant de séparer les différents compartiments. Pour le cylindre servant de contrôle, l'ensemble des chambres comporte des sols non contaminés.

Pour le sulfate de cuivre, les mêmes doses de sulfate de cuivre (c'est-à-dire 1, 10, 100, 1000 et 5000 ppm) que le test de toxicité dans le sol sont utilisées dans le test d'évitement.

Les vers adultes d'*A. trapezoides* sont introduits individuellement à partir de la chambre centrale du cylindre à raison de 6 vers par cylindre. Le nombre total de vers utilisé dans ce test est de 36 vers. Ensuite, les cloisons entre les 6 compartiments ont été retirées et le couvercle a été placé au-dessus du cylindre pour éviter la fuite des vers. Les cylindres sont placés dans un endroit bien aéré à température ambiante 22 ± 2 °C. Après 48h, les couvercles sont retirés et les cloisons amovibles ont été remises afin d'éviter le mouvement des vers de terre entre les compartiments une nouvelle fois. Chaque compartiment est vidé séparément et les vers sont séparés manuellement du substrat.

A la fin du test, différentes mesures et observations ont été effectuées :

- 5- *le dénombrement des vers* : il consiste à compter les vers dans chaque compartiment séparément. Si un vers est coupé par la partition (cloison amovible) et séparé entre deux compartiments, on note 0,5 pour l'un et 0,5 pour l'autre compartiment.
- 6- *les changements* : les différents changements observables sont notés individuellement.
- 7- *la concentration efficace médiane (CE₅₀)* : elle correspond à une adaptation de la méthodologie standard pour le calcul de la CE₅₀ après 48 heures d'expérimentation. Sa valeur est calculée aussi par la méthode des Probits. Les données brutes (évitement) sont initialement transformées selon l'équation suivante :

$$E\% = \frac{N_{NC} - N_C}{N_T} * 100$$

Où : E : évitement ;
N_C : nombre de vers dans le sol contaminé ;
N_{NC} : nombre de vers dans le sol non contaminé ;
N_T : nombre total de vers introduit dans le bac (6vers).

Après transformation des résultats obtenus, cette analyse a été réalisée en utilisant le logiciel NCSS data analysis, version 2019 (NCSS Statistical Software, USA).

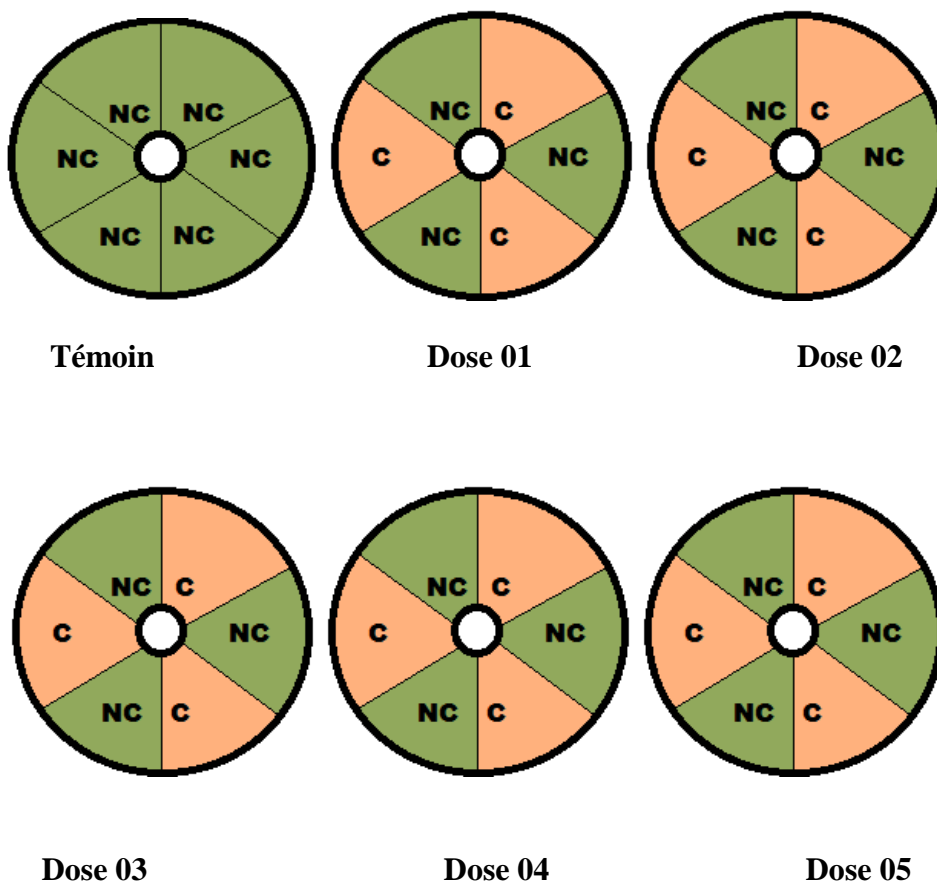
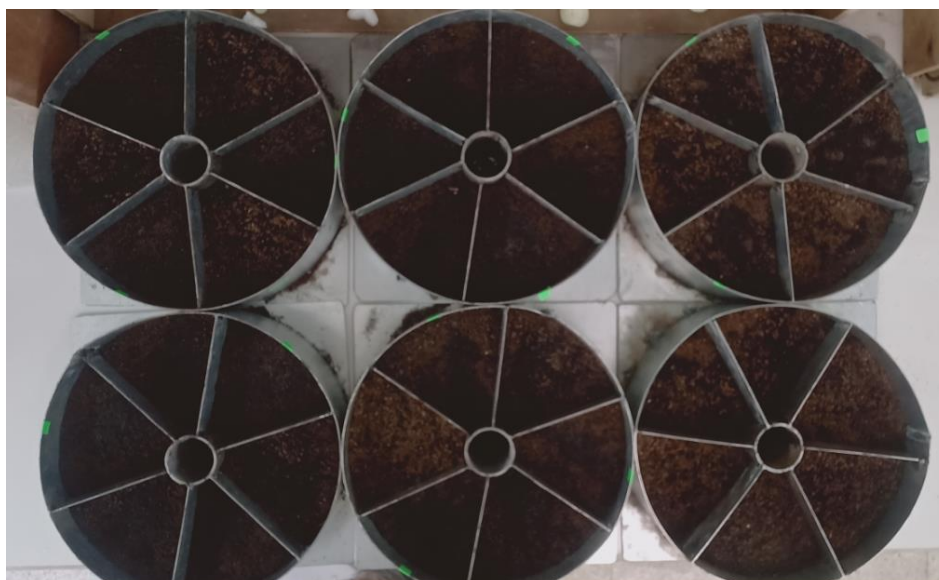


Figure 14 : Plan expérimentale du test d'évitement dans les cylindres compartimentés

Chapitre 3

Résultats et discussion

8- Résultats des tests de toxicité aigue

9- Tests de toxicité dans le sol

10- Taux de mortalité

Après introduction des vers dans les milieux d'expérimentation préalablement préparé par mélange manuelle de différentes doses de sulfate de cuivre au sol, on procède au dénombrement de la mortalité chez le taxon *A. trapezoides* à des intervalles de 1, 7 et 14 jours. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Résultats de la mortalité enregistrée chez vers testés.

	Doses	N	1 ^e jour	7 ^e jour	14 ^e jour	Mortalité cumulée	
						Nombre	%
[C ₀]	0 ppm	15	0	0	0	0	0
[C ₁]	1 ppm	15	0	0	2	2	13,33
[C ₂]	10 ppm	15	0	2	3	5	33,33
[C ₃]	100 ppm	15	0	2	3	5	33,33
[C ₄]	1000 ppm	15	0	1	13	14	93,33
[C ₅]	5000 ppm	15	0	15	0	15	100

Après 24 heures, d'essai, nous n'avons pas enregistré de mortalité chez les vers testés. Cependant, dès le 7^e jour, elle est enregistrée chez les vers exposés aux doses allant de 10 à 5000 ppm de cuivre. Pour la dose 5000 ppm, la mortalité était maximale, tous les vers sont morts. Après 14 jours, nous avons enregistré une mortalité (2 vers) chez les vers exposés à la plus faible dose soit 1 ppm. Pour les autres doses, le nombre de vers morts a augmenté jusqu'à atteindre le nombre de 13 vers pour la dose 1000 ppm. A la fin du test, le nombre de vers morts semblent augmenter avec de l'augmentation des doses (tableau 6).

Concernant les vers exposés à la dose au champ (6000g de Cu/ha), nous n'avons pas enregistré de mortalité durant les 14 jours du test.

Afin de mieux apprécier cette mortalité, une transformation logarithmique a été réalisée sur les doses du cuivre (fig. 15). La projection des résultats obtenus montre une

augmentation significative de la mortalité chez les vers testés en fonction des doses de cuivre auxquelles ils sont exposés.

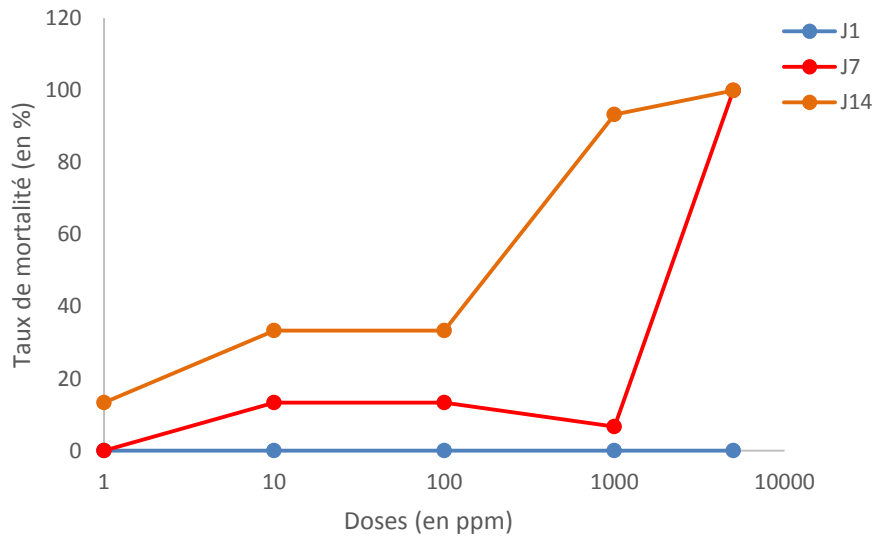


Figure 15 : Taux de mortalité chez les vers en fonction des doses de sulfate de cuivre.

11- Détermination de la DL₅₀

La DL₅₀ a été déterminé au 7^e et 14^e jour d'expérimentation en utilisant le logiciel NCSS version 2019. Pour cela, les valeurs de la mortalité observée ont été corrigées par la méthode des probits. Les doses létales sont déterminées à partir des droites de régression issues de la projection des données en fonction des doses de sulfate de cuivre (fig. 16).

L'analyse réalisée a permis de déterminer les valeurs des DL₅₀ pour le taxon *A. trapezoides*, qui sont de l'ordre de 2348,67 ppm de Cu ($\log CL_{50} = 3,371$; $r^2 = 0,612$) au 7^e jour et l'ordre de 171,35 ppm ($\log CL_{50} = 2,234$; $r^2 = 0,872$) à la fin du test. Les intervalles de confiance (95 %) sont compris respectivement entre 26,5 à 989,4 ppm et 890,1 à 4676,3 ppm.

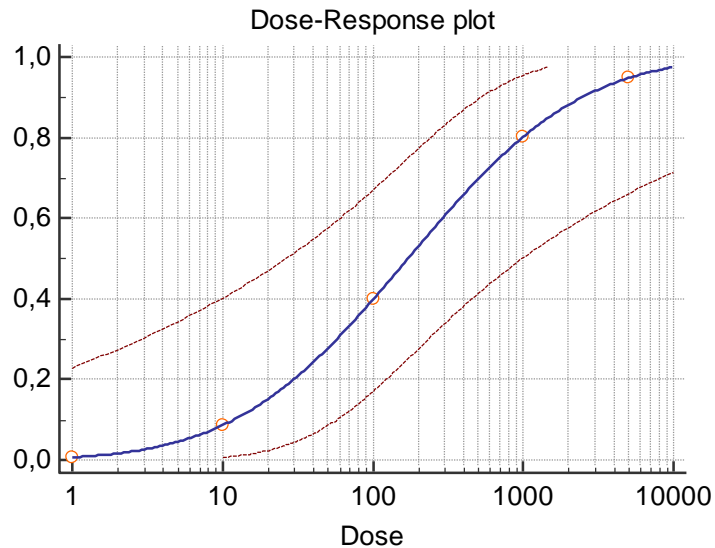


Figure 16 : Courbe des probabilités de mortalités enregistrées à la fin du test en fonction des doses de cuivre.

12- Effet du sulfate de cuivre sur les biomasses

Selon la figure 17, la biomasse lombricienne semblent diminuer pour l'ensemble des doses de sulfate de cuivre même pour le témoin. Aucune différence significative n'a été décelée ($p > 0,05$). Cette diminution semble beaucoup plus être liée à la durée du test. En effet, l'analyse de variance effectuée révèle un effet temps très significative.

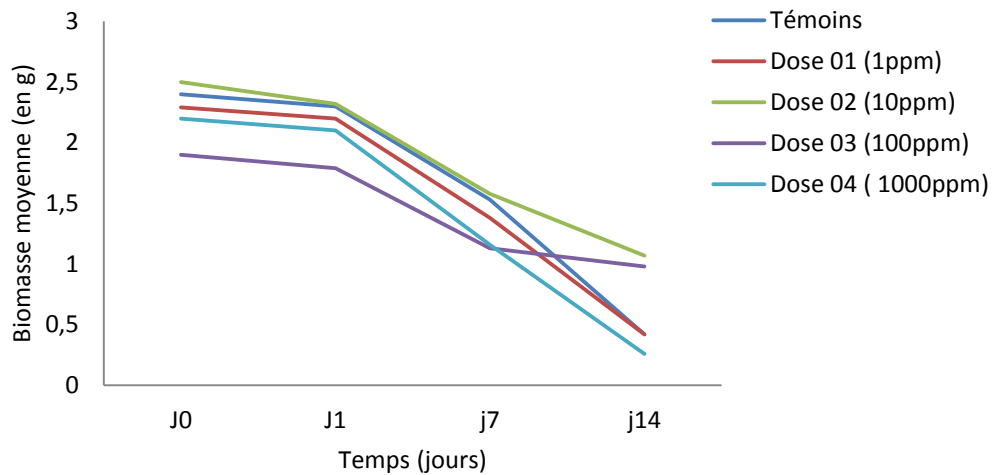


Figure 17 : Evolution des biomasses individuelles moyennes des vers durant la période d'expérience (14 jours).

1-1-4- Observations du comportement des vers

Lors des manipulations, différents comportements des vers vis-à-vis des différentes doses appliquées ont été observés (annexe 4).

Pour les plus faibles doses (1 et 10 ppm de Cu), on a enregistré seulement un ralentissement de l'activité des vers au début du test par la suite ils ont repris leur rythme d'activité normal.

A partir de la concentration de 100 ppm de Cu, les vers deviennent mous et réagissent difficilement au stimulus mécanique. Nous enregistrons également des fractionnements et une modification de la coloration de l'épiderme des vers de terre qui deviennent alors rougeâtre avec l'apparition de gonflements à la fin du test.

Pour les concentrations les plus élevées, 1000 et 5000 ppm de Cu, les réactions des vers étaient instantanées dès leur contact avec le sol. Ils se mettent en boule et sécrètent du mucus avant de s'enfoncer dans le sol. Les mêmes symptômes que ceux observés chez les vers de la dose 100 ppm (modification de la couleur, fragmentation, apparition de gonflements et saignements) sont observables à partir du premier jour (24 heures après). Ces symptômes s'accroissent de plus en plus avec le temps. Les vers exposés à la dose 5000 ppm n'arrivent pas à supporter cette dose et meurent au 7^e jour. Pour la dose 1000 ppm, seul un seul ver a survécu à la fin du test mais il était très faible et présentait différents symptômes (des saignements et des lésions).

Les vers exposés à la dose au champ ne présentaient aucun changement comportemental ou physiologique durant toute la période du test (14 jours).

13- Test de toxicité sur papier filtre

1-2-1- Mortalité

Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau 7. On observe une réaction rapide due à un contact direct avec sulfate de cuivre et ceci dès les premiers moments pour les concentrations les plus élevées (6 et 12 mg de Cu.cm⁻²). Par conséquent, la mortalité était maximale pour ces concentrations à la fin du test. Pour la dose de 1 mg de Cu.cm⁻², la mortalité est supérieure à 50 %. Pour les autres doses, nous n'avons pas enregistré de mortalité durant les 48 heures.

Tableau 7 : Résultats de la mortalité enregistrée chez vers testés.

Concentrations (mg de Cu.cm ⁻²)	Nombre de vers testés	Mortalité	Taux de mortalité (%)
Témoin	3	0	0
0,25	3	0	0
0,5	3	0	0
1	3	2	66,67
6	3	3	100
12	3	3	100

1-2-2- Détermination de la CL₅₀

La détermination de la CL₅₀ est réalisée de la même manière que la DL₅₀ du test de toxicité dans le sol. Ainsi, la CL₅₀ après 48 heures d'incubation est de 0,95 mg de Cu.cm⁻² (log CL₅₀ = -0,021 ; r² = 0,907) (fig. 18).

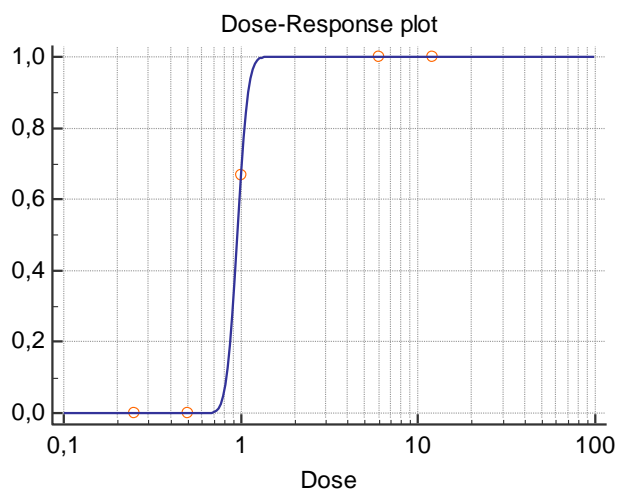


Figure 18 : Courbe des probabilités de mortalités enregistrées à la fin du test.

1-2-3- Observations du comportement des vers

Lors des différentes manipulations, on remarque différents symptômes chez les vers testés (fig. 19). Il s'agit de réponses sur le plan morphologique (apparition de gonflements et de fragmentation), physiologique (sécrétion de mucus et saignement) et comportementales (raidissement et baisse de l'activité). Pour la 2^e dose, nous avons observé une sécrétion

anormale de mucus suite à l'introduction des vers dans les boites de pétri au même temps que des mouvements d'agitation intense. Pour les doses 3 et 4, on note l'apparition de gonflements et des saignements ainsi qu'un ralentissement de l'activité des vers testés. Les vers introduits dans les boites de pétri contenant la plus forte dose ont réagi de manière brusque dès le premier contact avec le sulfate de cuivre en produisant des mouvements d'agitation pendant quelques minutes, suivi d'un raidissement total de leurs corps et enfin un arrêt définitif de leur mouvement.

2-Résultats du test d'évitement

Dans cet essai, les vers d'*A. trapezoides* (au nombre de 6 par cylindre) sont placés dans la chambre centrale du cylindre. Ces vers peuvent migrer vers n'importe quel compartiment (contaminé ou non contaminé) à travers les orifices situés à la base de celle-ci. Après 48 heures, on procède au dénombrement de vers par compartiment.

D'après les résultats du tableau 8, on peut constater que les sols contenant les doses les plus élevées en Cu ont été évités par les vers testés. Le nombre de vers dans les compartiments non contaminés est plus grand que dans les sols contaminés, pour les doses 100 et 1000 ppm. Pour la dose 5000 ppm, nous avons dénombré seulement une partie du vers dans les compartiments contaminés par le sulfate de cuivre.

Pour les doses 1 et 10 ppm, le nombre de vers est plus important dans le sol contaminé que dans le sol non contaminé, ce qui montre que les vers peuvent supporter ces teneurs de cuivre dans le sol.

Pour la concentration efficace médiane (CE_{50}), elle calculée par la méthode des probits en utilisant le logiciel NCSS (version 2019). Après analyse, la CE_{50} est de l'ordre de 91,004 ppm.

Durant toute la période du test (48 heures), nous n'avons pas enregistré de mortalité chez l'ensemble des vers. Aucun changement comportemental ou physiologique n'a été observé chez les vers testés.

Tableau 8 : Résultats du dénombrement des vers dans les cylindres.

Doses	Compartiments	
	Contaminés France	Non Contaminés (NC)
0 ppm	0	6
1 ppm	6	0
10 ppm	5	1
100 ppm	1,5	4,5
1000 ppm	1	5
5000 ppm	0,5	5,5

14- Discussion

Pour l'essai de toxicité aiguë, la DL₅₀ dans le sol était de 171,35 ppm de Cu après 14 jours alors que la CL₅₀ par contact direct était de 0,95 mg de Cu.cm⁻². La comparaison des deux résultats montre clairement que l'exposition dans l'essai sur papier filtre est plus toxique pour le taxon testé que l'exposition dans le sol. Des résultats semblables ont été enregistrés pour d'autres taxons lombriciens (Callahan et al., 1985 et Neuhauser et al., 1985). Cependant, le critère de contact n'a pas de valeur prédictive de la toxicité dans le sol.

Selon leur CL₅₀, et en référence à la classification de Roberts et Doroug (1984), le Cuivre s'avère très toxique pour le taxon *A.trapezoides*.

Le cuivre dans le sol est plus toxique pour les vers de terre que les autres ETMs. Il peut être toxique, voir mortel, pour les vers de terre, à partir de 300 ppm pour *Eisenia fetida* (Song et al., 2002) et 200 ppm pour *Lumbriculus variegatus* (O'Gara et al., 2004). Cette toxicité est due en partie à l'incapacité de la plupart des tissus mous de synthétiser des ligands se liant à cet élément (Morgan et Morgan, 1990). Pour *Eisenia fetida*, Bednarska et al. (2017) ont démontré le cuivre diminuait les niveaux d'AchE à partir d'une concentration de 200 ppm de Cu dans le sol. Une telle diminution pourrait avoir des effets néfastes sur plusieurs comportements du ver de terre, tels que la locomotion, la coordination et la croissance. Une liste des altérations physiologiques générales induites par une exposition au cuivre comprend : des perturbations de l'équilibre osmotique, des anomalies métaboliques, le ralentissement de la fréquence cardiaque (O'Gara et al., 2004).

Selon Neuhauser et al. (1985), van Gestel et al. (1992) et Spurgeon et al. (1994), les vers sont plus sensibles au Cu, ce qui est le cas du taxon lombricien testé. Les vers exposés à cet élément ont montré des signes de toxicité dès les premières minutes d'exposition. Ces signes sont d'ordre morphologique (sécrétion de mucus, gonflement, lésion et saignement) ou comportemental (mouvement rapide, enroulement). Les vers mis en contact direct avec le sulfate de cuivre (test sur papier filtre) montrent des mouvements accompagnés de sécrétions

de mucus jaunâtre, un mélange hétérogène de coelomocytes, protéines, sels et fluide cœlomique. Cette sécrétion était dépendante de la concentration de l'élément métallique dans le milieu (Beeby, 1991). Elle représente donc une barrière qui protège l'épiderme contre les dommages du fait que le mucus servira à chélater cet élément (Heredia et al., 2008 ; Muangphra et Goorneratne, 2011 ; Rodriguez et al., 2013). Selon Morgan et al. (2004), la sécrétion du mucus est une réponse adaptative des vers de terre pour la détoxification. Le saignement observé dans la partie antérieure de leur corps peut être lié au fait que les paires de cœurs se trouvent dans cette région. Pour des concentrations plus élevées, des rétractions dans quelques régions du soma apparaissent surtout la partie postclitellienne. Ces rétractions sont parfois suivies d'autotomie de ces régions (Bouché, 1972). Cette dernière est considérée aussi comme un autre mécanisme de détoxification chez les vers de terre (Vidal et Horne, 2003). Selon ces auteurs, les vers peuvent accumuler les ETMs dans leurs parties caudales qui seront éliminées ultérieurement par le processus d'autotomie, suivi d'une régénération de la partie sectionnée. Ces adaptations physiologiques sont observées avec plusieurs ETMs, y compris le Cu (Beeby, 1991 et Weltje, 1998). Ces différentes réponses ne sont pas spécifiques pour ces deux éléments. Des réponses similaires ont été rapportés pour d'autres ETMs (Beeby, 1991 ; Weltje, 1998 ; Labrot et al., 1999 ; Lucan-Bouché et al., 1999 ; Leveque et al., 2013 ; Giska et al., 2014 ; El-Hadef El-Okki, 2016).

Pour le comportement d'évitement chez le taxon *A. trapezoides*, il est observable à partir de la dose 100 ppm où les vers ont presque tous migrés vers le compartiment non contaminé. L'évitement a permis à ces vers de mieux s'adapter aux doses plus élevées des sols. En effet, cet aspect comportemental permet aux vers de mieux s'adapter à la réalité du terrain. Il est bien connu que les vers de terre peuvent éviter les couches hautement contaminés (Eijsackers, 1987) et que la variabilité spatiale de la contamination affecte l'accumulation des ETMs d'une manière complexe (Marinussen et van der Zee, 1996). Cette adaptation comportementale est un trait phénotypique qui permet la survie des vers de terre dans des environnements changeants, surtout ceux influencés par les activités anthropiques.

Conclusion

Conclusion

Le présent travail avait comme objectif d'évaluer la toxicité du cuivre vis-à-vis du taxon *A. trapezoides*. Pour cela, on a effectué différents tests de toxicité et d'évitement dans des conditions de laboratoire.

Les résultats obtenus lors des différents tests indiquent que l'estimation de la toxicité du cuivre sous sa forme de sulfate de cuivre est apparemment différente selon les méthodes utilisées. Le test de toxicité aiguë dans le sol a révélé une DL₅₀ de l'ordre de 171,35 ppm de Cu après 14 jours (durée du test). Pour l'essai de toxicité par contact direct sur papier filtre, la CL₅₀ a été estimée à 0,95 mg de Cu . cm⁻² après 48 h d'exposition. En revanche, le comportement d'évitement n'a été observable qu'à partir de la dose de 100 ppm, pour laquelle la plupart des vers ont migré vers les compartiments non contaminés des cylindres.

D'après la CL₅₀, le Cu s'avère très toxique pour ce taxon lombricien. En effet, dès les premiers instants de contact avec les doses élevées, les vers réagissent rapidement par des signes comportementaux (mouvements brusques et enroulement) par la suite ils ont montré des signes morphologique (sécrétions de mucus jaunâtre, gonflements, lésions, saignements). Ainsi, la contamination des sols par cet élément peut avoir des conséquences néfastes et conduire à une élimination totale des communautés lombriciennes dans le sol.

Par ailleurs, nous n'avons enregistré une diminution considérable de la biomasse des vers testés durant le test de toxicité dans le sol. Cette perte de poids semble être un précieux indicateur de stress physiologique, liée au degré d'intoxication et le temps d'exposition ce qui explique la difficulté de locomotion.

En perspectives, il serait préférable pour une meilleure appréciation de l'effet du cuivre sur les vers de ce taxon de :

- Tester d'autres forme du cuivre (hydroxyde de cuivre, oxyde cuivreux, oxychlorure de cuivre, carbonate de cuivre, etc.) ;
- Augmenter la durée des tests afin de déterminer la toxicité du cuivre à long terme (effets sur la croissance et la reproduction) ;
- Enfin, Réaliser des coupes histologiques afin de déterminer les effets du Cu sur les tissus et les organes des vers testés.

Références bibliographique

- Alloway, B. (1995). Heavy metals in soils. 2e edn. Blackie Academic & Professional, London.
- BACHELIER G, 1963-la vie animale dans le sol O.R.S.T.O.M.PARIS, 273P.
- BACHELIER G., 1978- La faune des sols son écologie et son action. O.R.S.T.O.M, Paris, 400 p
- Bachelier G., 1978. La faune des Sols, son Ecologie et son Action. ORSTOM., Paris, 391 p. ISBN :2709905302
- Baize, D. (1997). Teneurs totales en elements traces metalliques dans les sols : France.
- BAZRI K E, 2015 – étude de la biodiversité des lombriciens et leurs relations avec les propriétés du sol dans différents étages bioclimatiques, dans l’est algérien, Th. Doc. Univ. Constantine1, Constantine, 170 p.
- Beeby A. 1991. Toxic Metal Uptake and Essential Metal Regulation in Terrestrial Invertebrates. In Newman MC. McIntoch AW. (eds.): Metal Ecotoxicology: Concepts
- Blakemore R.J. 2008. Cosmopolitan Earthworms – an Eco-Taxonomic Guide to the
- Blakemore R.J., 2008. Cosmopolitan Earthworms – an Eco-Taxonomic Guide to the Species (3rd Ed.).VermEcology, Yokohama (Japan), 757 p. CD-ROM
- Bouché MB. 1984. Ecotoxicologie des lombriciens. II. Surveillance de la contamination des milieux. Acta Oecologica/Oecologia Applicata, 5 : 291-301.
- Bouché MB., 1972. Lombriciens de France. Ecologie et systématique. Annales de Zoologie-écologie animale, INRA. Paris (France), 671 p. ISBN-13 : 978-2853400282
- Calais : Une approche multiscalaire. Thèse de Doctorat. Université Paris VI (France),198 p.
- Callahan CA., Russell LK., Peterson SA., 1985. A comparison of three earthworm bioassay procedures for the assessment of environmental samples containing hazardous wastes. Biology and Fertility of Soils, 1: 195–200. DOI: 10.1007/BF00257637
- CARION F J, 2012 –Un peu de bio, vers la terre.5p.
- Centre National de la Recherche Scientifique-CNRS. 2005. Colloque en agroenvironnement « des outils à notre échelle », 23 février 2005, « Les ouvriers du
- chemicals in soil for earthworms. Ecotoxicology and Environmental Safety, 57, 39-47.
- communities in a contaminated floodplain area: Linking biomarker, community and

- Cooke AS., Greig-Smith PW., Jones SA., 1992. Consequences for Vertebrate Wildlife of Toxic Residues in Earthworm Prey. In Greig-Smith PW., Becker H., Edwards PJ., Heimbach F. (eds.): *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept Ltd., Andover (UK). Pp. 109–115. ISBN-13 : 978-0946707409
- Detailed Review Paper (DRP) on Molluscs Life-Cycle Toxicity Testing. OECD Series on Testing and Assessment. No. 121, p. 182.
- Edwards CA., Bohlen PJ., 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. 3rd Ed., Chapman & Hall, London (UK), 426 p. ISBN-13: 978-0-412-56160-3
- Eijsackers H., 1987. The Impact of Heavy Metals on Terrestrial Ecosystems: Biological Adaptation through Behavioural and Physiological Avoidance. In Ravera O. (ed.): *Ecological Assessment of Environmental Degradation, Pollution and Recovery*. Elsevier Science, Amsterdam (The Netherlands), pp. 245–259. ISBN-13: 978-0-444-87361-9
- El Hadeff El Okki M. 2016. Etude des relations lumbricidae-éléments traces métalliques en conditions naturelles et contrôlées. Cas de l'espèce *aporrectodea trapezoides*.
- functional responses. *Environmental Pollution*, 157 : 895–903. DOI :
- Heredia RB., Dueñas S., Castillo L., Ventura JJ., Silva Briano M., Posadas del Rio F., Rodríguez M.G., 2008. Autofluorescence as a tool to study mucus secretion in *Eisenia foetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 151: 407–414. DOI : 10.1016/j.cbpa.2007.01.726
- HERGER P., 2003- *Regenwürm*. Zentrum für angewandte Ökologie Schattweid, NaturMuseum Luzern, Wolhusen. 49 p.
- Hopkin SP., 1989. *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*. Elsevier Applied Science, Barking (UK), 366 p. ISBN: 1-85166-312-6 in Soils. EPA/540/S-92/018. Technology Innovative Office, Office of Emergency
- INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques). 2010. Fiches de données toxicologiques et environnementales. Arsenic et ses dérivés inorganiques. 2010, 124p.
- Institut national de la recherche agronomique, Paris.
- Ireland MP., 1983. Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworms. In J.E. Satchell (ed.): *Earthworm ecology from Darwin to vermiculture*. Chapman & Hall, London (UK), pp.247–265. DOI : 10.1007/978-94-009-5965-1_21

- James SW., 2000. Earthworms (Annelida: Oligochaeta) of the Columbia River basin assessment area. General Technical Report PNW-GTR-491. Forest Service, USDA. (USA). 13p.
- Kabata Pendias A., 2010. Trace elements in soils and plants. 3rd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, 432 p.
- Kabata-Pendias A., Pendias H., 1992. Trace elements in soils and plants. 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, 365p.
- Korsman C., Reinecke SA. 2009. Effects of metal pollution on earthworm
- Lanno R., wells J., Conder J., Bradham K., Basta N., 2004. The bioavailability of
- LAVELLE P and SPAIN AV., 2001- Soil Ecology. Kluwer Academic Publishers..
- Lee K., 1985. Earthworms : their Ecology and Relationships with Soils and Land Use. Academic press, Sydney (Australia), 411 p. ISBN: 0-12-440860-5
- Marinussen MPJC., van der Zee SEATM., 1996. Conceptual approach to estimating the effect of home-range size on the exposure of organisms to spatially variable soil contamination. Ecological Modelling 87: 83–89. DOI: 10.1016/0304-3800(94)00207-X
- Michaud A., 2007. Interraction entre biodisponibilité , phytotoxicité du cuivre et nutrition en fer de graminées- mécanismes physiologiques et rhizosphériques –[thèse doctorat], Montpelmier , Ecole doctorale, Systèmes intégrés en Biologie , Agronomie , geosciences , Hydro sciences et Environnement (SIBAGHE) 12-p
- Morgan AJ., Stürzenbaum SR., Winters C., Grime GW., Aziz NA., Kille P., 2004. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. Ecotoxicology and Environmental Safety, 57: 11–19. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2003.08.022
- Morgan JE., Morgan AJ., 1990. The distribution of cadmium, copper, lead, zinc and calcium in the tissues of the earthworm *Lumbricus rubellus* sampled from one uncontaminated and four polluted soils. Oecologia, 84: 559–566. DOI: 10.1007/BF00328174
- Muangphra P., Gooneratne R., 2011. Comparative genotoxicity of cadmium and lead in earthworm coelomocytes. Applied and Environmental Soil Science, 2011: 1-7. DOI: 10.1155/2011/218929
- Nahmani J. 2003. Impact des métaux sur la structure et le rôle fonctionnel des communautés de macro-invertébrés et de microorganismes des sols du Nord-Pas-de-

- Navel A , 2011. Distribution ,speciation et transfert du cuivre dans le sol sous vigne ; role de la structuration spatiale et du statut oraganique. [Thèse de doctorat],Grenoble ,Université de Grenoble , 29-34p
- Neuhauser EF., Cukic ZV., Malecki MR., Loehr RC., Durkin PR., 1995. Bioconcentration and biokinetics of heavy metals in the earthworm. *Environmental Pollution*, 89: 293–301. DOI:10.1016/0269-7491(94)00072-L
- NF ISO 10693. 1995. Qualité du sol – Détermination de la teneur en carbonate Méthode volumétrique. AFNOR Normalisation. 8 p.
- NF X 31-103. 1988. Détermination du Ph dans l'eau. 5 p.
- OECD. (Organization for Economical and Cooperative Development), 1984. Guideline for Testing of Chemicals, n° 207: Earthworm Acute Toxicity. OECD., Paris (France). 9 p. DOI:10.1787/9789264070042 –en
- OECD. 1984. Organization for Economical and Cooperative Development-Guideline for Testing of Chemicals, n° 207: Earthworm Acute Toxicity. OECD.,Paris (France). 9 p. DOI: 10.1787/9789264070042 –en
- OECD. 2003. Environmental Indicators, Development , Measurement and Use,
- OECD. 2004. Guidelines for the Testing of Chemicals : Earthworm reproduction test
- OECD. 2011. Organisation for Economic Cooperation and Development. Paris-
- Omodeo P., Rota E., Baha M., 2003. The megadrile fauna (Annelida: Oligochaeta) of Maghreb: a biogeographical and ecological characterization. *Pedobiologia*, 47: 458-465. DOI: 10.1078/0031-4056-00213
- PELOSI. C, 2008- Modélisation de la dynamique d'une population de vers de terre lumbricusterrestris au champ contribution à l'étude de l'impact de systèmes de culture sur les communautés lombriciennes. N°decommande1619,Th. Doc., Ecole doctoral. ABIES. Paris.141 p.
- RAZAFINDRAKOTO M, 2012-Etude des Annélides Oligochètes de Madagascar : Taxonomie, Distribution et Ecologie. Th. Doc. Univ D'ANTANANARIVO.174p.
- RAZAFINDRAKUTO S D, 2013- Etude des interactions plante- vers de terre (Dichogaster Saliens dans les culture de Riz et de l'éleusine. Mémoire Magister Univ privée à vocation professionnalisant 87p.
- Roberts BL., Dorough HW., 1984. Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3: 67–78. DOI: 10.1002/etc.5620030109

- Rodriguez M.G., Rivera BH., Ventura-Juárez J., Muñoz-Ortega MH., 2013. Cadmium toxicity evaluation in the earthworm *Eisenia foetida*: Behavior and histopathological effects. *Trends in Comparative Biochemistry & Physiology*, 17: 81–92.
- Römbke J., Sousa JP., Schouten T., Riepert F., 2006. Monitoring of soil organisms: a set of standardized field methods proposed by ISO. *European Journal of Soil Biology*, 42: S61-S64. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.016
- Spurgeon DJ., Hopkin SP., Jones DT., 1994. Effects of cadmium, lead, and zinc on growth and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impacts of pointsource metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 84: 123–130. DOI : 10.1016/0269-7491(94)90094-9
- SSDS. 1993. Soil Survey Division Staff- Soil Survey Manual. USDA Handbk, n° 18
- Sumner, M. (2000). Handbook of soil science. CRC Press, Boca Raton Fla.
- USEPA. 1992. United States Environmental Protection Agency- Behavior of Metals
- Van Gestel CAM., Dirven-Van Breemen EM., Baerselman R., Emans HJB., Janssen JAM., Postuma R., Van Vlie PJM., 1992. Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different chemicals in standardized toxicity tests using the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 23 : 206–220. DOI : 10.1016/0147-6513(92)90059-C
- Van Gestel CAM., Koolhaas JE., Hamers T., van Hoppe M., van Roover M.,
- Vidal DE., Horne AJ., 2003. Mercury toxicity in the aquatic oligochaete *Sparganophilus pearsei* II: autotomy as a novel form of protection. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45: 462–467. DOI: 10.1007/s00244-003-2119-5
- VIGOT M et CLUZEAU D, 2014- Les vers de terre. Chambre d’Agriculture de la Vienne. Vienne. 10p.
- Wang Y., Wu S., Chen L., Wu C., Yu R., Wang Q., Zhao X., 2012. Toxicity assessment of pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 88: 484–491. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.02.086
- Winsome T., Epstein L., Hendrix PF., Horwath WR., 2006. Competitive interactions between native and exotic earthworm species as influenced by habitat quality in a California grassland. *Applied Soil Ecology*, 32: 38–53. DOI: 10.1016/j.apsoil.2005.01.008

- Yeadley RB., Gast LC., Lazorchak JM., 1996. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environmental toxicology and chemistry*, 15: 1532–1537. DOI: 10.1002/etc.5620150915

Annexes

Annexe 01

Appareillage utilisé dans les analyses physicochimiques du sol utilisé dans les tests



Ph-mètre



Conductimètre



Calcimètre de Bernard

Annexe 02

Grilles d'évaluation des analyses physicochimiques du sol utilisé dans les tests (SSDS. Soil Survey Division Staff, 1993).

Grille du Ph

Classe	Ph
Fortement acide	<5
Acide	5,0 – 6,0
Légèrement acide	6.0 – 6.6
Neutre	6.6 – 7.4
Légèrement alcalin	7.4 -7.8
Alcalin	>7.8

Grille de la salinité des sols en fonction de la CE

Classe	CE (Ms/m)
0 Non-salin	0-2
1 Salinité très faible	2-4
2 Salinité faible	4-8
3 Salinité modéré	8-16
4 Salinité élevé	>16

Grille du calcaire total

Classe	Taux de CT
Non calcaire	≤ 1 %
Peu calcaire	1 % - 5 %
Modérément calcaire	5 % - 25 %
Fortement calcaire	25 % - 50 %
Très fortement calcaire	50 % - 80 %
Excessivement calcaire	> 80 %

Annexe 03

Les supports utilisés dans les différents tests



Les pots en polychlorure de vinyle.



Les boîtes de pétri



Les containers cylindriques

Annexe 04

Modifications morphologique et physiologique observe lors des tests de toxicité (secretion de mucus , modification de la couleur de l'épiderme , apparition de gonflement , saignement ,fragmentation)



Secretion de mucus



Apparition de gonflements



Modification de la couleur de l'épiderme



Saignement et fractionnement



Saignement et fractionnement



Fractionnement

**Contribution à l'évaluation de la toxicité du cuivre sur *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) :
Tests de toxicité aiguë et d'évitement.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie fondamentale et appliqué

Ce travail a été effectué dans le but d'évaluer la toxicité du cuivre vis-à-vis du taxon lombricien *A. trapezoides*. Pour cela nous nous sommes proposés d'effectuer deux tests de toxicité aiguë l'un dans le sol et l'autre sur papier filtre dans le but de déterminer la DL50 et la CL50 de cet élément ainsi qu'un test d'évitement afin d'identifier le seuil au quel le comportement d'évitement apparaît pour le taxon étudié, tout cela dans des conditions de laboratoire.

Les résultats obtenus lors de nos tests et en référence à la CL50 le cuivre se révéla comme très toxique pour le taxon *A. trapezoides*, d'autre part pour le test d'évitement il apparaît que le comportement de vers de terre vis-à-vis du cuivre se manifeste à une concentration de 100ppm et que pour les doses inférieures à celle-ci les vers de terre arrivent à résister à la concentration des sols.

Une diminution de la biomasse a également été enregistrée durant le test de toxicité dans les sols, semblant ainsi indiquer un stress physiologique lié à la concentration du contaminant à la durée de l'exposition.

Mots clés : *A. trapezoides*, Cuivre, Test de toxicité aiguë, Test d'évitement

Laboratoire de recherche : Biologie et Environnement

Jury d'évaluation :

Président du jury : SAHLIL

MCA-FSNV

Rapporteur : EL-HADEF EL-OKKIM

MCB-FSNV

Examineur : TOUATIL

MCA-FSNV

Date de soutenance : 18/07/2019