



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi -Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la vie

Département : Biologie des Êtres Vivants

Laboratoire Eau et Environnement



كلية العلوم الدقيقة والعلوم الطبيعية والبيئة  
FSES NV  
FACULTE DES SCIENCES EXACTES  
ET DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT LMD

Spécialité : BIOLOGIE ANIMALE

Option : Physiologie Animale Appliquée à la Santé et l'Environnement

Thème

**Evaluation des risques écotoxicologiques des engrais chimiques (NPKs et TSP) sur une espèce bioindicatrice de pollution, «*Aporrectodea caliginosa* »: croissance, composition biochimique et biomarqueurs du stress environnemental.**

Présentée par : Mme HALAIMIA Samira

Membres de Jury :

Pr. TINE-DJEBBAR Fouzia	U. Larbi Tébessi-Tébessa	Présidente
Pr. TINE Samir	U. Larbi Tébessi-Tébessa	Directeur de Thèse
Pr. SOLTANI Noureddine	U. Badji Mokhtar-Annaba	Examineur
Pr. AYAD-LOUCIF Wahida	U. Badji Mokhtar-Annaba	Examinatrice
Dr. BOUDJABI Sonia	U. Larbi Tébessi-Tébessa	Examinatrice
Dr. MEKAHLIA Med El Nacer	U. Larbi Tébessi-Tébessa	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

# Remerciements

Tous d'abord, Je remercie **Dieu**, le Tout-Puissant, qui m'a donné la force et le courage pour poursuivre mes études.

J'adresse mes vifs remerciements aussi à **Monsieur Noureddine SOLTANI** (Professeur au Département de Biologie et Directeur du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Université d'Annaba) pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de me faire l'honneur de juger ce travail. Je lui adresse mes sincères remerciements ainsi que ma profonde gratitude.

J'exprime ma profonde gratitude et mes plus sincères remerciements à mon directeur de thèse **Monsieur TINE Samir** (Professeur au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa) qui a bien voulu accepter de diriger ce travail. Je le remercie extrêmement ; pour ses conseils, ses remarques, ainsi que pour son encouragement.

Mes profonds remerciements vont aussi à l'ensemble du jury qui a accepté, sans réserve aucune, d'évaluer ce travail.

J'exprime mes profonds remerciements à **Madame Fouzia TINE** (Professeur au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa) pour l'aide qu'elle m'a apporté, pour sa disponibilité, sa patience et ses qualités humaines qui m'ont été très précieuses, grâce à elle j'ai pu compléter mon travail. Je tiens aussi à la remercier pour la dimension humaine qu'elle instaure dans sa relation avec ses étudiants.

Mes plus vifs remerciements et toute ma considération à **Madame Wahida AYAD-LOUCIF** (Professeur à l'Université d'Annaba) qui m'a fait l'honneur et qui a bien voulu accepter d'être membre de ce jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie énormément **Madame BOUDJEBI Sonia** (Maître de conférences au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa) qui a bien voulu accepter d'être membre de ce même jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie également **Monsieur MEKAHLIA Mouhamed El Nacer** (Maître de conférences au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa) pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie tous ceux qui m'ont soutenue et encouragée dans la réalisation de ce modeste travail.

# *Dédicace*

*Aux êtres les plus chers à mon cœur,*

*A ma mère, Sa présence, ses encouragements et ses prières sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.*

*A mon mari, Akram AISSAOUI pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général.*

*A mes petits anges Inel et Iouen.*

*A mon beau père Sidi et ma belle-mère.*

*A mes chères sœurs et mes chers frères*

*A mes neveux et nièces*

*A toute ma famille*

*A tous mes amis*

*A tous ceux que j'aime ...*

*Je dédie ce travail*

*Samira*

# *TABLE DES MATIÈRES*

## TABLE DES MATIERES

Titres	Pages
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>01</b>
<b>II. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>05</b>
2.1. Présentation de la zone d'étude	05
2.2. Analyses pédologiques	06
2.2.1. Texture	06
2.2.2. pH	06
2.2.3. Conductivité électrique	07
2.2.4. Matière organique	08
2.2.5. Calcaire total	08
2.3. Présentation de l'espèce <i>Aporrectodea caliginosa</i> (Savigny, 1826)	09
2.3.1. Cycle de vie	10
2.3.2. Critères d'identification	11
2.4. Collecte et technique d'élevage	13
2.5. Préparation des vers de terre	13
2.6. Présentation des engrais chimiques	14
2.6.1. Azote phosphaté potassique sulfaté NPKs (15.15.15)	14
2.6.2. Triple superphosphate TSP (46% de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	14
2.7. Traitement et essais toxicologiques	15
2.8. Prélèvement des échantillons	16
2.9. Suivi de la croissance	17
2.10. Dosage des biomarqueurs du stress oxydatif	17
2.10.1. Dosage des glutathions S-transférases (GSTs)	18
2.10.2. Dosage du glutathion (GSH)	18
2.10.3. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)	19
2.10.4. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)	20
2.11. Extraction et dosage des métabolites	21
2.11.1. Dosage des protéines totales	21
2.11.2. Dosage des glucides totaux	22
2.11.3. Dosage des lipides totaux	22
2.12. Etude histologique	23
2.12.1. Fixation	23
2.12.2. Inclusion	23
2.12.3. Enrobage et confection des coupes histologiques	24
2.12.4. Coloration	25
2.12.5. Montage et observation microscopique	26
2.13. Analyse des résidus par Spectrométrie de Fluorescence des rayons X (FRX)	27
2.14. Analyses statistiques	29
<b>III. RESULTATS</b>	<b>31</b>
3.1. Effet des engrais chimiques sur les biomarqueurs physiologiques des vers de terre	31
3.1.1. Effet sur la mortalité des juvéniles	31
3.1.1.1. Effet du NPK	31

<b>3.1.1.2. Effet du TSP</b>	<b>31</b>
<b>3.1.2. Effet des engrais chimiques sur la croissance des vers de terre</b>	<b>32</b>
<b>3.1.2.1. Effet sur la croissance des adultes</b>	<b>32</b>
<b>3.1.2.2. Effet sur la croissance des juvéniles</b>	<b>36</b>
<b>3.2. Effet des engrais chimiques sur les biomarqueurs du stress oxydatif</b>	<b>40</b>
<b>3.2.1. Activité spécifique des GSTs chez les adultes et les juvéniles</b>	<b>40</b>
<b>3.2.2. Taux du GSH chez les adultes et les juvéniles</b>	<b>44</b>
<b>3.2.3. Activité de la GPx chez les adultes et les juvéniles</b>	<b>48</b>
<b>3.2.4. Activité de la LDH chez les adultes et les juvéniles</b>	<b>52</b>
<b>3.3. Effet des engrais chimiques sur la composition biochimique des vers de terre</b>	<b>55</b>
<b>3.3.1. Effet sur le taux de protéines totales chez les adultes et les juvéniles</b>	<b>55</b>
<b>3.3.2. Effet sur le taux de glucides totaux chez les adultes et les juvéniles</b>	<b>59</b>
<b>3.3.3. Effet sur le taux de lipides totaux chez les adultes et les juvéniles</b>	<b>63</b>
<b>3.4. Bioaccumulation des engrais chimiques dans les tissus des vers de terre adultes</b>	<b>67</b>
<b>3.5. Effet des engrais sur la structure histologique des adultes</b>	<b>70</b>
<b>IV. DISCUSSION</b>	<b>77</b>
<b>4.1. Effet des engrais chimiques sur les biomarqueurs</b>	<b>77</b>
<b>4.1.1. Effet sur les biomarqueurs physiologiques</b>	<b>78</b>
<b>4.1.1.1. Mortalité</b>	<b>78</b>
<b>4.1.1.2. Croissance</b>	<b>80</b>
<b>4.1.2. Effet sur les biomarqueurs du stress oxydatif</b>	<b>82</b>
<b>4.1.2.1. Effet sur l'activité des GSTs</b>	<b>84</b>
<b>4.1.2.2. Effet sur le taux du GSH</b>	<b>86</b>
<b>4.1.2.3. Effet sur l'activité de la GPx</b>	<b>88</b>
<b>4.1.2.4. Effet sur l'activité de la LDH</b>	<b>89</b>
<b>4.2. Effet des engrais chimiques sur la composition biochimique</b>	<b>90</b>
<b>4.3. Bioaccumulation des engrais</b>	<b>94</b>
<b>4.4. Effet des engrais sur la structure histologique</b>	<b>97</b>
<b>V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>102</b>
<b>VI. RESUMES</b>	<b>104</b>
<b>VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>107</b>
<b>VIII. ANNEXES</b>	<b>136</b>
<b>PRODUCTION SCIENTIFIQUE</b>	<b>136</b>

# *LISTE DES TABLEAUX*

## LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titres	Pages
<b>Tableau 1</b>	Classes des sols selon la texture (Gauchers, 1968).	<b>06</b>
<b>Tableau 2</b>	Classes des sols selon leur statut acido-basique (Baize, 2000).	<b>07</b>
<b>Tableau 3</b>	Classes de salinité en fonction de la conductivité électrique de l'extrait aqueux (Mathieu, 2003).	<b>07</b>
<b>Tableau 4</b>	Classification des sols d'après leur teneur en matière organique (Solter, 1981 in Hamdi-Ourfella & Soltani, 2016).	<b>08</b>
<b>Tableau 5</b>	Normes d'interprétation du taux du calcaire du sol (Baize, 2000).	<b>09</b>
<b>Tableau 6</b>	Les propriétés physiques et chimiques du sol.	<b>09</b>
<b>Tableau 7</b>	Dosage des protéines totales chez les juvéniles et les adultes d' <i>A. caliginosa</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	<b>21</b>
<b>Tableau 8</b>	Dosage des glucides totaux chez les juvéniles et les adultes d' <i>A. caliginosa</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	<b>22</b>
<b>Tableau 9</b>	Dosage des lipides totaux chez les juvéniles et les adultes d' <i>A. caliginosa</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	<b>22</b>
<b>Tableau 10</b>	Toxicité du NPK appliqué à différentes doses sur les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> .	<b>31</b>
<b>Tableau 11</b>	Toxicité du TSP appliqué à différentes doses sur les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> .	<b>31</b>
<b>Tableau 12</b>	Classement par ordre croissant du taux d'inhibition de la croissance (%), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>34</b>
<b>Tableau 13</b>	Classement par ordre croissant du taux d'inhibition de la croissance (%), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>34</b>
<b>Tableau 14</b>	Classement par ordre décroissant du taux de la croissance spécifique (%), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>35</b>
<b>Tableau 15</b>	Classement par ordre décroissant du taux de la croissance spécifique (%), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>35</b>
<b>Tableau 16</b>	Classement par ordre croissant du taux d'inhibition de la croissance (%), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>38</b>
<b>Tableau 17</b>	Classement par ordre croissant du taux d'inhibition de la croissance (%), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>38</b>
<b>Tableau 18</b>	Classement par ordre décroissant du taux de la croissance spécifique (%), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>39</b>
<b>Tableau 19</b>	Classement par ordre décroissant du taux de la croissance spécifique (%), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>40</b>

<b>Tableau 20</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>42</b>
<b>Tableau 21</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>43</b>
<b>Tableau 22</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>43</b>
<b>Tableau 23</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>44</b>
<b>Tableau 24</b>	Classement par ordre décroissant du taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>47</b>
<b>Tableau 25</b>	Classement par ordre décroissant du taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>47</b>
<b>Tableau 26</b>	Classement par ordre décroissant du taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>48</b>
<b>Tableau 27</b>	Classement par ordre décroissant du taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>48</b>
<b>Tableau 28</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>50</b>
<b>Tableau 29</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>51</b>
<b>Tableau 30</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>51</b>
<b>Tableau 31</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>52</b>
<b>Tableau 32</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>54</b>
<b>Tableau 33</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>54</b>
<b>Tableau 34</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>55</b>
<b>Tableau 35</b>	Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/$	<b>55</b>

	mg de protéines), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	
<b>Tableau 36</b>	Classement par ordre décroissant du taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>58</b>
<b>Tableau 37</b>	Classement par ordre décroissant du taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>58</b>
<b>Tableau 38</b>	Classement par ordre décroissant du taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>59</b>
<b>Tableau 39</b>	Classement par ordre décroissant du taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>59</b>
<b>Tableau 40</b>	Classement par ordre décroissant du taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>62</b>
<b>Tableau 41</b>	Classement par ordre décroissant du taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>62</b>
<b>Tableau 42</b>	Classement par ordre décroissant du taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>63</b>
<b>Tableau 43</b>	Classement par ordre décroissant du taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>63</b>
<b>Tableau 44</b>	Classement par ordre décroissant du taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.	<b>66</b>
<b>Tableau 45</b>	Classement par ordre décroissant du taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>66</b>
<b>Tableau 46</b>	Classement par ordre décroissant du taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>67</b>
<b>Tableau 47</b>	Classement par ordre décroissant du taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> , après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.	<b>67</b>
<b>Tableau 48</b>	Pourcentages massiques des éléments et de leurs oxydes dans les tissus des adultes témoins et traités d' <i>A. caliginosa</i> , après 1 mois de traitement par l'engrais NPK.	<b>68</b>
<b>Tableau 49</b>	Pourcentages massiques des éléments et de leurs oxydes dans les tissus des adultes témoins et traités d' <i>A. caliginosa</i> , après 1 mois de traitement par l'engrais TSP.	<b>69</b>

# *LISTE DES FIGURES*

## LISTE DES FIGURES

Figures	Titres	Pages
Figure 1	Présentation de la zone d'étude, El Mardja à Tébessa.	05
Figure 2	Mesure du pH. <b>A</b> : Mélange du sol-eau après homogénéisation. <b>B</b> : pH mètre (Photos personnelles).	07
Figure 3	Des creusets contiennent le sol calciné dans un four à moufle (Photos personnelles).	08
Figure 4	Dégagement gazeux (CO <sub>2</sub> ) sous forme d'effervescence (Photo personnelle).	09
Figure 5	Espèce <i>Aporrectodea caliginosa</i> <b>A</b> : cocon (×10), <b>B</b> : éclosion du cocon, <b>C</b> : ver juvénile, <b>D</b> : ver sub-adulte, <b>E</b> : ver adulte (Photos personnelles).	11
Figure 6	Cycle de vie de l'espèce <i>A. caliginosa</i> dans les conditions du laboratoire (15°C, 60-70% capacité de rétention d'eau du sol (loameux)) (Bart <i>et al.</i> , 2018).	11
Figure 7	Critères d'identification de l'espèce <i>A. caliginosa</i> (Bouché, 1972) (Photo personnelle).	12
Figure 8	Caractères externes observables chez <i>A. caliginosa</i> (Bouché, 1972) (Photo personnelle).	12
Figure 9	Echantillonnage manuel des vers de terre (Photos personnelles).	13
Figure 10	Vidange du tube digestif des vers de terre. <b>A</b> : Mettre les lombrics dans les boîtes de Pétri, <b>B</b> : Vidange digestif, <b>C</b> : Lavage (Photos personnelles).	14
Figure 11	Engrais NPKs (15.15.15) (Photos personnelles).	14
Figure 12	Engrais TSP (46% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (Photos personnelles).	15
Figure 13	Préparation des engrais pour le traitement. <b>A</b> : Broyage manuel, <b>B</b> : NPK et TSP sous forme de poudre, <b>C</b> : Ajout du traitement au sol (Photos personnelles).	16
Figure 14	Fixation par le formol (10%) (Photos personnelles).	23
Figure 15	<b>A</b> : Placement des échantillons dans les cassettes. <b>B</b> : Panier d'automate. <b>C</b> : Déshydratation et inclusion des échantillons dans l'automate (Photos personnelles).	24
Figure 16	Enrobage et confection des coupes histologiques. <b>A</b> : Enrobage, ( <b>B</b> , <b>C</b> ): Refroidissement, <b>D</b> : Coupe par microtome, ( <b>E</b> , <b>F</b> ): Collage des lames, ( <b>G</b> , <b>H</b> ) : Deshydratation des coupes histologiques (Photos personnelles).	25
Figure 17	Coloration des coupes histologiques. <b>A</b> : Hydratation par l'alcool absolu, <b>B</b> : Bain d'hématoxyline, <b>C</b> : Bain d'éosine (Photos personnelles).	26
Figure 18	Montage et observation microscopique. <b>A</b> : Déshydratation, <b>B</b> : Montage des lames et lamelles, <b>C</b> : Lames prêtes pour observation, <b>D</b> : Observation par microscope optique (Photos personnelles).	26
Figure 19	Schéma récapitulatif de la technique FRX (Photos personnelles).	28
Figure 20	Schéma récapitulatif du protocole expérimental (Photos personnelles).	30
Figure 21	Effet du NPK (D1 et D2) sur l'inhibition de la croissance (%) ( <b>A</b> ) et sur le taux de la croissance spécifique (%) ( <b>B</b> ) chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i>	32

	(m ± SEM, n = 5 répétitions, chacune contenant 10 individus) : test HSD de Tukey.	
<b>Figure 22</b>	Effet du TSP (D1 et D2) sur l'inhibition de la croissance (%) ( <b>A</b> ) et sur le taux de la croissance spécifique (%) ( <b>B</b> ) chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n = 5 répétitions, chacune contenant 10 individus) : test HSD de Tukey.	<b>33</b>
<b>Figure 23</b>	Effet du NPK (D1 et D2) sur l'inhibition de la croissance (%) ( <b>A</b> ) et sur le taux de la croissance spécifique (%) ( <b>B</b> ) chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n = 5 répétitions, chacune contenant 10 individus) : test HSD de Tukey.	<b>36</b>
<b>Figure 24</b>	Effet du TSP (D1 et D2) sur l'inhibition de la croissance (%) ( <b>A</b> ) et sur le taux de la croissance spécifique (%) ( <b>B</b> ) chez les juvéniles d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n = 5 répétitions, chacune contenant 10 individus) : test HSD de Tukey.	<b>37</b>
<b>Figure 25</b>	Effet du NPK (D1 et D2) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n=3 pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>41</b>
<b>Figure 26</b>	Effet du TSP (D1 et D2) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n=3 pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>41</b>
<b>Figure 27</b>	Effet du NPK (D1 et D2) sur le taux du GSH (µM/mg de protéines) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n=3 pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>45</b>
<b>Figure 28</b>	Effet du TSP (D1 et D2) sur le taux du GSH (µM/mg de protéines) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n=3 pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>46</b>
<b>Figure 29</b>	Effet du NPK (D1 et D2) sur l'activité spécifique de la GPx (µM/min/mg de protéines) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n=3 pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>49</b>
<b>Figure 30</b>	Effet du TSP (D1 et D2) sur l'activité spécifique de la GPx (µM/min/mg de protéines) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n=3 pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>50</b>
<b>Figure 31</b>	Effet du NPK (D1 et D2) sur l'activité spécifique de la LDH (µM/min/mg de protéines) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n=3 pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>52</b>
<b>Figure 32</b>	Effet du TSP (D1 et D2) sur l'activité spécifique de la LDH (µM/min/mg de protéines) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n=3 pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>53</b>
<b>Figure 33</b>	Effet du NPK (D1 et D2) sur le taux de protéines (µg/mg de poids frais) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> (m ± SEM, n=3 pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>56</b>

<b>Figure 34</b>	Effet du TSP (D1 et D2) sur le taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> ( $m \pm \text{SEM}$ , $n=3$ pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>57</b>
<b>Figure 35</b>	Effet du NPK (D1 et D2) sur le taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> ( $m \pm \text{SEM}$ , $n=3$ pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>60</b>
<b>Figure 36</b>	Effet du TSP (D1 et D2) sur le taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> ( $m \pm \text{SEM}$ , $n=3$ pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>61</b>
<b>Figure 37</b>	Effets du NPK (D1 et D2) sur le taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> ( $m \pm \text{SEM}$ , $n=3$ pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey.	<b>64</b>
<b>Figure 38</b>	Effets du TSP (D1 et D2) sur le taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) chez les adultes ( <b>A</b> ) et les juvéniles ( <b>B</b> ) d' <i>A. caliginosa</i> ( $m \pm \text{SEM}$ , $n=3$ pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : test HSD de Tukey	<b>65</b>
<b>Figure 39</b>	Coupes histologiques longitudinales du tégument (partie antérieure) d' <i>A. caliginosa</i> . C : cuticule, EP : épithélium, LB : lame basale, MC : muscle circulaire, ML : muscle longitudinal. A : Témoins, B : NPK, C : TSP,	<b>72</b>
<b>Figure 40</b>	Coupes histologiques longitudinales du tégument (partie moyenne) d' <i>A. caliginosa</i> : C : cuticule, EP : épithélium, LB : lame basale, MC : muscle circulaire, ML : muscle longitudinal. A : Témoins, B : NPK, C : TSP.	<b>73</b>
<b>Figure 41</b>	Coupes histologiques longitudinales du tégument (partie postérieure) d' <i>A. caliginosa</i> : C : cuticule, EP : épithélium, LB : lame basale, MC : muscle circulaire, ML : muscle longitudinal. A : Témoins, B : NPK, C : TSP.	<b>74</b>
<b>Figure 42</b>	Coupes histologiques longitudinales de la paroi intestinale (partie moyenne) d' <i>A. caliginosa</i> : EP : épithélium, MC : muscle circulaire, ML : muscle longitudinal. CH : cellule chlorogène. A : Témoins, B : NPK, C : TSP.	<b>75</b>
<b>Figure 43</b>	Coupes histologiques longitudinales de la paroi intestinale (partie postérieure) d' <i>A. caliginosa</i> : EP : épithélium, MC : muscle circulaire, ML : muscle longitudinal, CH : cellule chlorogène. A : Témoins, B : NPK, C : TSP.	<b>76</b>

# *INTRODUCTION*

## I. INTRODUCTION

Les méthodes de fertilisation chimique, la génétique appliquée, la mécanisation de l'agriculture et le développement des techniques phytosanitaires ont tous augmenté la production agricole (Prisa, 2019). La sécurité alimentaire mondiale actuelle et future exige la nécessité d'intensifier la production agricole afin de répondre aux besoins demandés par la population mondiale croissante (Godfrey *et al.*, 2010). En Algérie, ces deux dernières décennies, le secteur agricole a été le moteur de la croissance économique du pays, qui représente près de 13 % de la population active (Bessaoud *et al.*, 2019).

Les pesticides et les engrais sont maintenant utilisés en plus grande quantité comparativement au passé afin d'accroître le rendement des cultures (Băcanu *et al.*, 2019). La gestion intensive du sol affecte ses caractéristiques physiques, chimiques et biologiques en particulier les microorganismes bénéfiques non ciblés et les vers de terre (Stanley & Preetha, 2016). Ces pratiques conventionnelles conduisent au lessivage des nutriments, à la dégradation du sol et à la pollution de l'eau (Sheibani & Ahangar, 2013 ; Davydov *et al.*, 2018).

La consommation mondiale des trois principaux engrais nutritifs, l'azote, le phosphore et le potassium atteignait 186,67 millions de tonnes en 2016, avec une hausse de 2,4 % enregistré en 2020 (FAO, 2017). Il est très important de comprendre comment parvenir à une agriculture durable en connaissant l'impact de divers contaminants dans le sol ainsi que des différentes pratiques agricoles sur les écosystèmes du sol (Fonte *et al.*, 2009). Il est également important de prévenir la contamination du sol par les pesticides et les substances toxiques (métaux lourds, radionucléides) contenu dans les engrais (Davydov *et al.*, 2018).

Les engrais peuvent être considérés comme un élément indispensable de l'agriculture moderne qui est devenue capitalistique, chimique et technologique. Bien qu'il soit réussi dans une large mesure à suivre le rythme de la demande alimentaire croissante, cela pose des problèmes économiques, environnementaux et sociaux (Prashar & Shah, 2016). L'un des résultats les plus critiques de cette technologie et de cette agriculture est la dégradation de l'environnement en particulier, le sol étant la partie la plus fondamentale des terres cultivées qui ont été gravement touchées (Prashar & Shah, 2016), ce qui affecte les organismes ciblés ainsi que les organismes non ciblés comme les vers de terre. En revanche, la fertilisation est une méthode pour améliorer la fertilité du sol et le rendement des cultures dans le monde entier, mais l'utilisation de produits chimiques et les engrais organiques facilitent la

coapplication involontaire et l'augmentation des métaux lourds dans le sol (Zhao *et al.*, 2018). Il a été documenté que les engrais à base de NPK utilisés pour fournir les macronutriments et les micronutriments destinés aux cultures agricoles contiennent des substances toxiques métaux tels que pb, Cd, Cu et Mn (Milinović *et al.*, 2008).

Les vers de terre constituent plus de 80 % de la biomasse des invertébrés dans la plupart des agroécosystèmes du monde (Yasmin & D'Souza, 2010) et contribuent à un certain nombre de propriétés du sol, telles que la décomposition de la matière organique et son incorporation dans le sol, la structuration, l'aération et le drainage du sol (Edwards, 1981), la porosité, la rétention de l'eau, l'échange cationique et la capacité tampon du pH (Lal, 2004). En raison de leur rôle bénéfique dans l'agroécosystème, les vers de terre sont utilisés comme espèces indicatrices pour surveiller l'impact des polluants, les changements dans la structure du sol et les pratiques agricoles (Tiwari *et al.*, 2016). Les vers de terre, en tant qu'organisme invertébré caractéristique dans un système de sol, jouent un rôle écologique essentiel dans l'évaluation de l'impact de la contamination de l'environnement et de l'écotoxicité (Liu *et al.*, 2019 ; Richardson *et al.*, 2020).

Un certain nombre d'études ont révélé les effets positifs des engrais chimiques sur les vers de terre et leurs populations (Curry *et al.*, 2008) et peu de chercheurs ont souligné leurs effets négatifs (Bhattacharya & Sahu, 2014 ; Shruthi *et al.*, 2017). Des effets bénéfiques (Callaham *et al.*, 2003) et nocifs (Marhan & Scheu, 2005) des engrais inorganiques sur les populations de vers de terre ont été signalés dans différents agroécosystèmes. Certains engrais minéraux ont une influence sur les vers de terre par modification du pH du sol qu'ils entraînent ; ce sont notamment les sulfates d'ammonium et de potassium et le phosphate d'ammonium (Bachelier, 1963). Plusieurs études ont été menées sur la toxicité des engrais en utilisant des vers de terre comme animal d'essai par la méthode de contact avec le papier (Abbiramy & Ross, 2013a, b ; Bhattacharya & Sahu, 2015, 2016). Mais très peu d'études ont été menées pour tester leur toxicité dans le sol contaminé.

Parmi les vers de terre vivants dans le sol fousseurs profonds, pertinents pour leur contribution bénéfique à l'amélioration des propriétés physico-chimiques du sol dans les agroécosystèmes ; l'espèce anécique *Lumbricus terrestris* et les espèces endogées *Aporrectodea caliginosa* et *Allolobophora chlorotica* (Solé, 2020). Cependant, la littérature disponible jusqu'à présent est presque exclusivement centrée sur l'espèce épigée, *Eisenia* (OCED, 1984). La plupart des tests standardisés d'écotoxicité ont été effectués sur des

espèces épigées principalement *E. fetida* ou *E. andrei* (Dittbrenner *et al.*, 2010). Malgré que le ver de terre le plus sensible est *Lumbricus* suivie par *A. caliginosa* (Ma & Bodt, 1993).

Les vers de terre sont touchés à tous les niveaux de l'organisme ; changement du comportement individuel, perturbation du métabolisme et des activités enzymatiques, augmentation de la mortalité individuelle, réduction de la fertilité, retard de croissance et de reproduction (Pelosi *et al.*, 2014). Cependant, leur diversité, leur densité et leur biomasse sont fortement influencées par la gestion des sols (Gill & Garg, 2014 ; Kherbouche *et al.*, 2012). Plusieurs études ont été menées sur l'impact toxique de certains pesticides sur les organismes du sol, en particulier les vers de terre (Köhler & Triebkorn 2013 ; Jouni, 2018 ; Pelosi *et al.*, 2021 ; Bouazdia, 2020) bien que peu de recherches ont été effectuées sur la toxicité de différents engrais sur les vers de terre dans le sol (Abbiramy *et al.*, 2013c ; Yahyaabadi *et al.*, 2018).

En Algérie, peu d'étude ont été réalisées sur la communauté des vers de terre, leur écologie, leur réponses aux variations du sol et aux pratiques agricoles (Baha & Berra, 2001 ; Omodeo *et al.*, 2003). Les études ont été basées sur la taxonomie (Zeriri *et al.*, 2013 ; Brazi *et al.*, 2013 ; El-Okki, 2014 ; Ababsa *et al.*, 2017 ; Bouazdia & Habes, 2017 ; Zerrouki *et al.*, 2019), et l'écotoxicologie (Zeriri *et al.*, 2012 ; Mekahlia *et al.*, 2016 ; Bennour *et al.*, 2020 ; Bouazdia, 2020).

L'objectif de ce travail est de savoir « **Est ce que les engrais chimiques NPKs et TSP administrés au sol pour fournir les nutriments aux plantes et augmenter les récoltes agricoles peuvent affecter les vers de terre, organismes bénéfiques pour le sol et espèces non visées ?** ».

*La première partie* est consacrée à l'évaluation de la toxicité des engrais NPK et TSP sur les juvéniles de l'espèce, *Aporrectodea caliginosa*, l'espèce la plus abondante dans la région de Tébessa (Bouazdia & Habes, 2017).

*La deuxième partie* envisage les effets du NPKs et TSP sur la croissance des adultes et des juvéniles après différentes périodes de traitement (0, 1, 2, 3 et 4 semaines) ; en calculant le taux d'inhibition de la croissance et le taux de la croissance pour un intervalle spécifique pour mettre en évidence les gains et les pertes du poids engendrés suite aux traitements.

**La troisième partie** examine les effets des deux doses (D1 et D2) de ces engrais sur les biomarqueurs enzymatiques : les glutathion S-transférases (GSTs), la glutathion peroxydase (GPx), la lactate déshydrogénase (LDH) et non enzymatique : le glutathion (GSH), durant différentes périodes (0, 1, 2, 3 et 4 semaines) après traitement des adultes et des juvéniles. Cette partie permet de mettre en évidence l'intensité du mécanisme de détoxification ainsi que le stress oxydatif.

**La quatrième partie** vise à évaluer les effets des deux doses (D1 et D2) de ces engrais chimiques, sur la composition biochimique (glucides, lipides et protéines) des adultes et des juvéniles après différentes périodes de traitement (0, 1, 2, 3 et 4 semaines). Cette étape met en évidence le métabolisme général de l'espèce *Aporrectodea caliginosa* face au traitement.

Dans **la cinquième partie**, on a analysé la bioaccumulation des engrais inorganiques NPKs et TSP dans les tissus des adultes d'*A. caliginosa* traités par spectrométrie de fluorescence X (FRX).

Concernant **la sixième partie**, on a évalué les effets de ces engrais chimiques à une seule dose (D2= dose recommandée/2) sur l'histologie des vers de terre adultes pour envisager les pathologies et les dommages structuraux engendrés par les engrais chimiques NPKs et TSP.

La **dernière partie**, consiste à effectuer une analyse pédologique pour savoir les caractéristiques physiques et chimiques du sol utilisé dans les expérimentations.

*MATERIEL ET  
METHODES*

## II. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Présentation de la zone d'étude

Le site choisi pour la réalisation de ce travail est un champ qui se trouve dans la cité d'El Mardja ( $35^{\circ}25'N$ ,  $8^{\circ}10'E$  ; Altitude : 830 m a.s.l.) situé à 4,5 km à l'est de la ville de Tébessa (Fig. 1). La wilaya de Tébessa fait partie du grand ensemble régional des hauts plateaux Est de l'Algérie ; avec une superficie de l'ordre de 14 227 km<sup>2</sup> et une altitude de 960 m au-dessus du niveau de la mer, s'étendant entre  $34,75^{\circ}$  et  $36^{\circ}$  de latitude Nord,  $8,5^{\circ}$  et  $7,25^{\circ}$  de longitude Est. Elle se caractérise par un climat semi-aride avec un hiver assez froid et faiblement neigeux. Le choix de ce site se justifie par son accessibilité, par la présence effective et abondante des espèces d'annélides oligochètes, et par l'absence d'activité agricole et de gestion intensive.

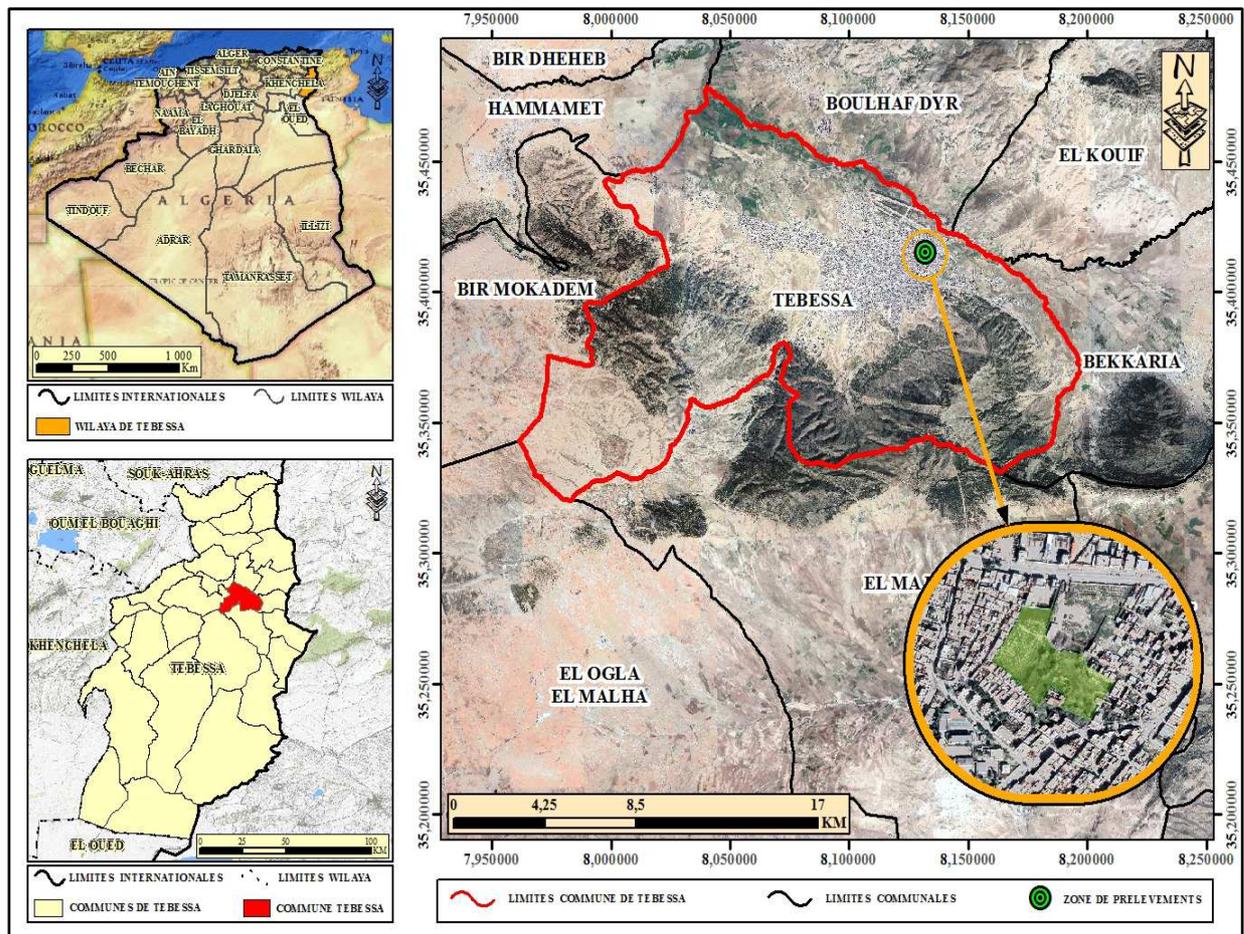


Figure 1. Présentation de la zone d'étude, El Mardja à Tébessa.

## 2.2. Analyses pédologiques

Les échantillons de sol prélevés sur terrain ont été séchés à l'air pendant 15 jours et tamisés à l'aide d'un tamis à maille ronde de 2 mm pour extraire les débris végétaux et les cailloux. La fraction inférieure à 2 mm servira à la réalisation de l'ensemble des analyses pédologiques. Dans le but de déterminer la nature du sol et afin d'évaluer sa qualité, quelques paramètres ont été déterminés : la texture, le pH, la conductivité électrique, le calcaire total et le taux de la matière organique.

### 2.2.1. Texture

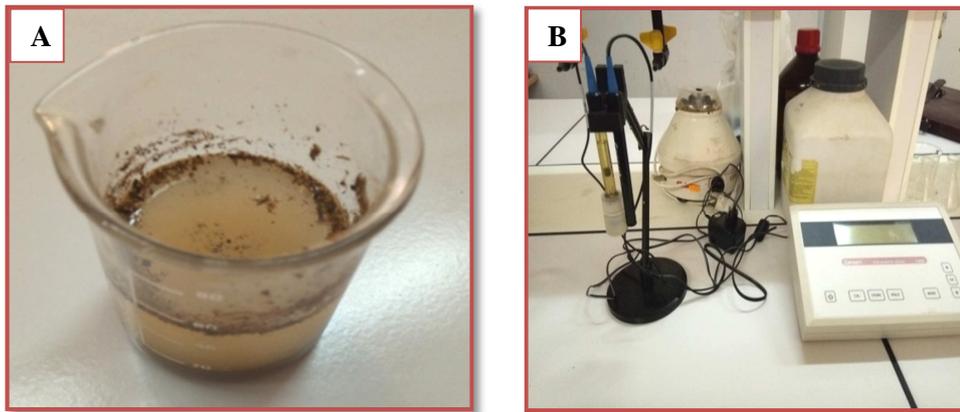
La texture d'un échantillon de sol est déterminée par la saturation en eau (méthode indirecte). Les échantillons sont séchés à l'étuve à 105°C pendant une nuit, soit environ 15 heures. La différence entre le poids avant et après séchage exprime la teneur en eau de l'échantillon initial. Six classes ont été retenues pour la description de la texture des sols (Gauchers, 1968) (Tableau 1).

**Tableau 1.** Classes des sols selon la texture (Gauchers, 1968).

12%	Sol sablonneux
12-24%	Sablo-limoneux
24-37,5%	Limono-sableux
37,5-45%	Limono-argileux
45-75%	Argilo-limoneux
>75%	Argileux

### 2.2.2. pH

Le pH représente la concentration des ions hydrogènes dans une solution. Cette mesure est importante, car elle permet de définir l'état d'acidité ou d'alcalinité (ou statut acido-basique) du sol. Le pH du sol est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Fig. 2). La classification des sols est faite selon le statut acido-basique (Tableau 2).



**Figure 2.** Mesure du pH.  
**A :** Mélange du sol-eau après homogénéisation. **B :** pH mètre  
 (Photos personnelles).

**Tableau 2.** Classes des sols selon leur statut acido-basique (Baize, 2000).

pH	Interprétation
<3,5	Hyper acide
3,5-4,2	Très acide
4,2-5,0	Acide
5,0-6,5	Peu acide
6,5-7,5	Neutre
7,5-8,7	Basique
>8,7	Très basique

### 2.2.3. Conductivité électrique

La conductivité électrique du sol détermine son degré de salinité. Elle permet d'obtenir rapidement la teneur globale en sels dissous ; elle est mesurée à l'aide d'un conductimètre, exprimé en  $\mu\text{S}/\text{cm}$  dont le rapport de terre/liquide est de : 1/5. La classification du sol en fonction de la conductivité électrique est présentée dans le Tableau 3.

**Tableau 3.** Classes de salinité en fonction de la conductivité électrique de l'extrait aqueux (Mathieu, 2003).

$\text{Mmhos. cm}^{-1}$ $\text{dS. m}^{-1}$	0,6	1	2	3	4
$\text{CE}_{1/5}$	Non salé	Légèrement salé	Salé	Très salé	Extrêmement salé

### 2.2.4. Matière organique

La détermination de la matière organique s'effectue par incinération (perte au feu ou perte par calcination). On place les échantillons pendant 16 heures dans un four à moufle à 375 °C (Fig. 3). La perte de poids, après calcination, nous permet de mesurer directement la matière organique dans le sol. La classification des sols d'après leur teneur en matière organique est présentée dans le Tableau 4.



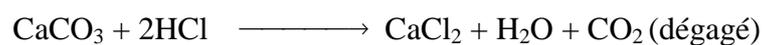
**Figure 3.** Des creusets contiennent le sol calciné dans un four à moufle (Photos personnelles).

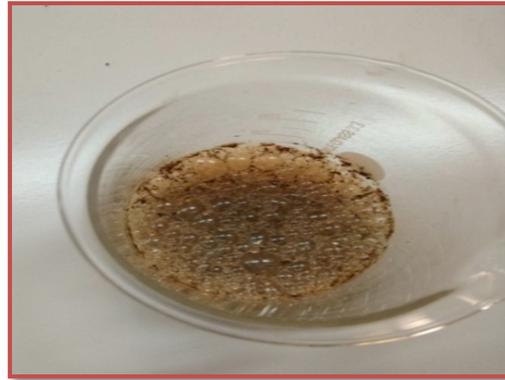
**Tableau 4.** Classification des sols d'après leur teneur en matière organique (Solter, 1981 in Hamdi-Ourfella & Soltani, 2016).

% de la matière organique	Interprétation
<1	Extrêmement faible
1-1,5	Très faible
1,5-2,5	Faible
2,5-3,5	Moyen
3,5-4,5	Moyennement élevé
4,5-5	Elevée
>5	Très élevé

### 2.2.5. Calcaire total

Son principe repose sur la décomposition du carbonate de calcium  $\text{Ca}^+$  ( $\text{CaCO}_3$ ) par l'acide chlorhydrique et la mesure du volume de  $\text{CO}_2$  obtenu.





**Figure 4.** Dégagement gazeux (CO<sub>2</sub>) sous forme d'effervescence (Photo personnelle).

**Tableau 5.** Normes d'interprétation du taux du calcaire du sol (Baize, 2000).

Teneur en CaCO <sub>3</sub> (%)	Interprétation
<1%	Horizon non calcaire
1-5%	Horizon peu calcaire
5-25%	Horizon modérément calcaire
25-50%	Horizon fortement calcaire
50-80%	Horizon très fortement calcaire
>80%	Horizon excessivement calcaire

Les résultats des analyses du sol réalisées au niveau du laboratoire sont mentionnés dans le Tableau 6. Le sol est argileux, basique non salé riche en matière organique (très élevée).

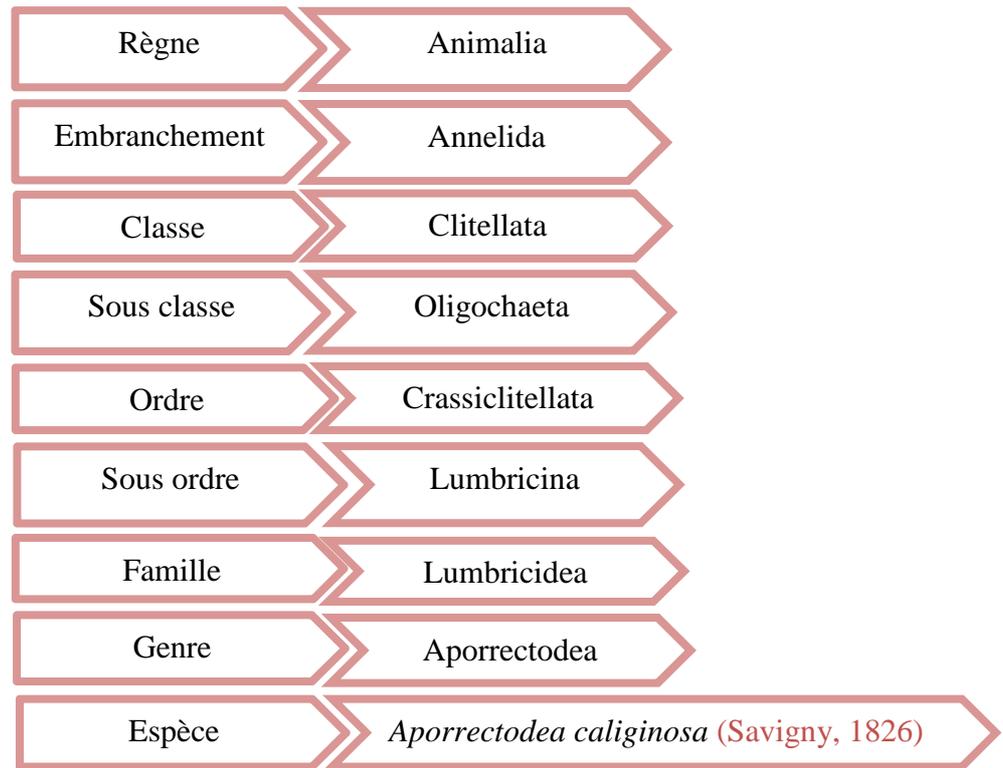
**Tableau 6.** Les propriétés physiques et chimiques du sol.

Propriétés	Résultats
Texture	Sol argileux
pH	8,68 ± 0,01
Conductivité électrique	335,5 ± 3,5 μsm/cm
Matière organique	11,86 ± 0,4%
CaCO <sub>3</sub>	24,25 ± 0,75%

### 2.3. Présentation de l'espèce *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826)

*Aporrectodea caliginosa* appartient à la catégorie écologique des endogés, sa forme est cylindrique avec aplatissement caudal, son épithélium est souple avec mucus normal. Cet animal se caractérise par l'absence de la pigmentation cutanée (Bouché, 1972). Selon l'Observatoire Participatif des Vers de Terre (OPVT), *A. caliginosa* est une espèce géophage, elle se nourrit essentiellement de particules organiques fines et de matières organiques humifiées du sol.

La position systématique du ver de terre, *A. caliginosa* (Savigny, 1826) est la suivante :

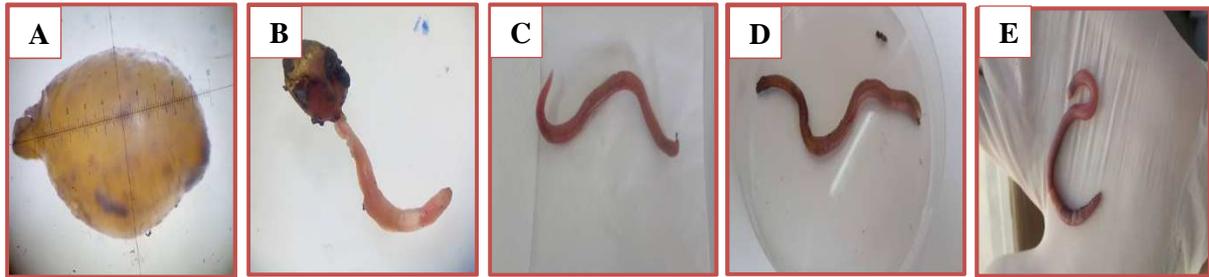


### 2.3.1. Cycle de vie

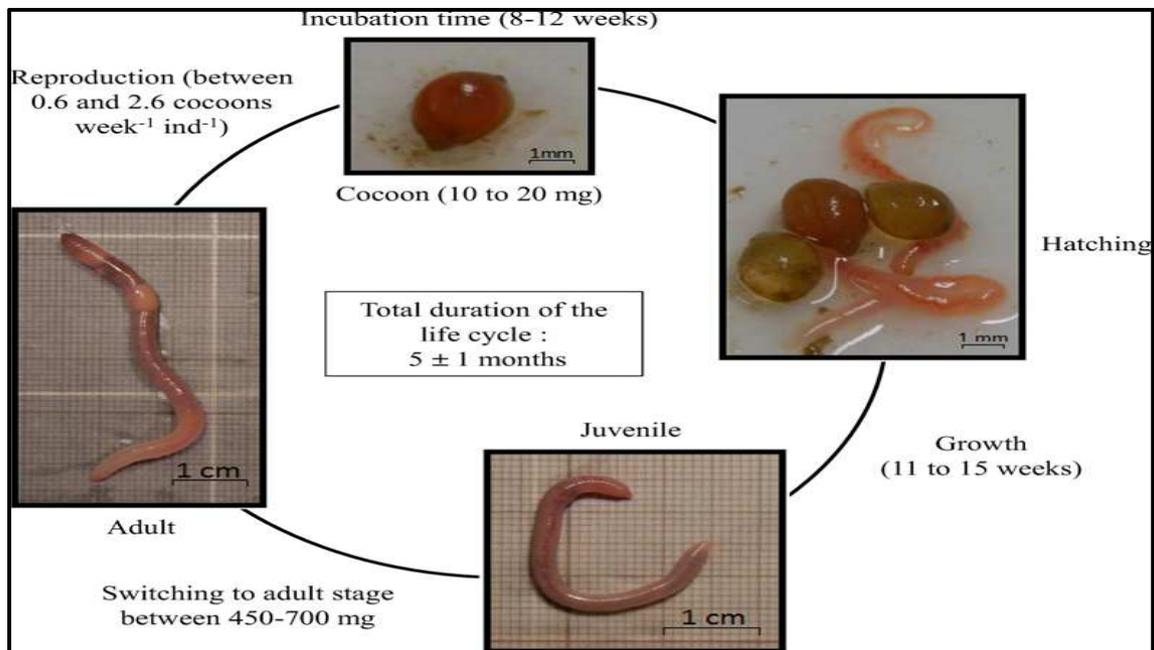
Le cycle biologique des vers de terre comprend généralement quatre phases : cocon, juvénile, sub-adulte et adulte (Fig. 5). Le ver de terre *A. caliginosa* a un cycle de vie qui varie de 4 et 6 mois (Bart *et al.*, 2018) (Fig. 6). Cet animal est hermaphrodite, sa reproduction est obligatoirement bilatérale (besoin d'un partenaire pour se reproduire). Le clitellum permet aux partenaires de rester collés l'un à l'autre. Ils échangent leurs semences mâles et libèrent de petits cocons via le clitellum (Morin, 2004). *A. caliginosa* peut produire entre 0,6 et 2,6 cocons par semaine à 15°C (Lowe & Butt, 2005). Un ou plusieurs vers immatures, appelés juvéniles, éclosent quelques temps plus tard. La durée d'incubation est entre 8 à 12 semaines (Bart *et al.*, 2018).

Le ver juvénile va progressivement acquérir des caractères sexuels secondaires externes liés à l'accouplement comme le puberculum tuberculeux ou les pores sexuels ; il sera alors au stade sub-adulte. Un clitellum, organe lié au processus de ponte, va ensuite se former et permettre au ver de devenir sexuellement mature pour pouvoir se reproduire à son tour ; le ver est alors adulte. Le temps de maturation varie beaucoup entre espèces et dépend des conditions du

milieu (température, humidité, nourriture). [Boström & Lofs \(1996\)](#) rapportent qu'un juvénile d'*A. caliginosa* devient mature en 3 à 6 semaines.



**Figure 5.** Espèce *Aporrectodea caliginosa*  
 A : cocon (×10), B : éclosion du cocon, C : ver juvénile, D : ver sub-adulte, E : ver adulte  
 (Photos personnelles).

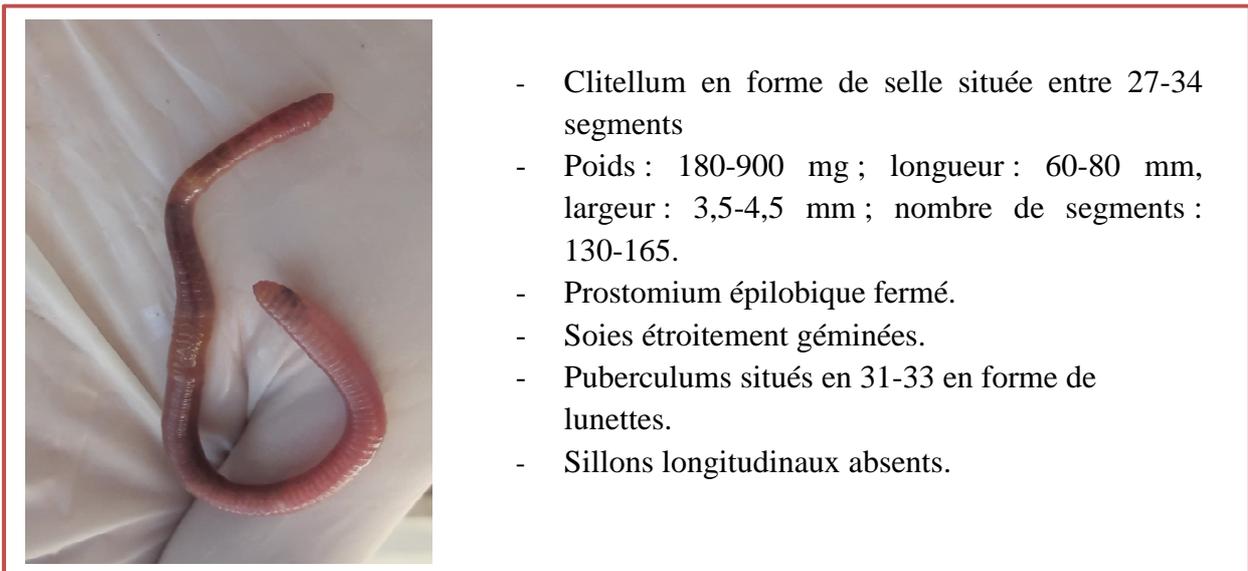


**Figure 6.** Cycle de vie de l'espèce *A. caliginosa* en conditions du laboratoire (15°C, 60-70% capacité de rétention d'eau du sol (loameux) ([Bart et al., 2018](#)).

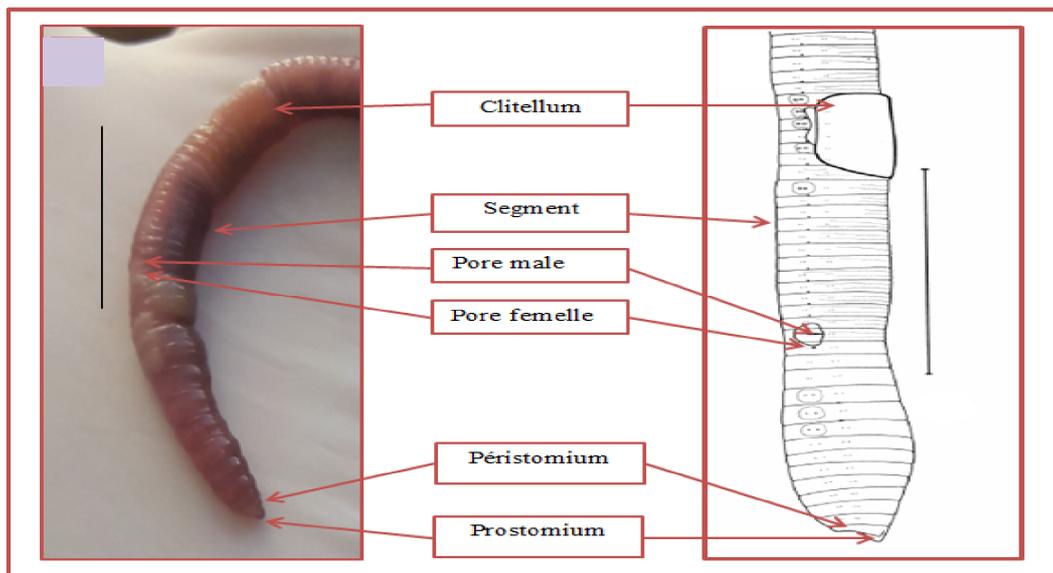
### 2.3.2. Critères d'identification

L'identification a été effectuée selon la clé de [Bouché \(1972\)](#), basée sur des critères morphologiques variables selon les espèces ; d'où l'intérêt de sélectionner des vers adultes. Le clitellum qui est un renflement dorsal des métamères est un critère primordial pour l'identification. En effet, sa couleur et son positionnement sur le corps du lombric ainsi que sa forme (annulaire ou en selle), sont propres à chaque espèce. Sur sa face ventrale, on peut observer plus au moins distinctement un puberculum de formes différentes selon les espèces. La position des pores mâles est également un bon critère d'identification, et dans une moindre

mesure la position des tumescences génitales qui ne sont pas aussi facilement observables que les organes mâles. La couleur et la forme du corps renseignent sur les catégories écologiques des vers observés. La forme du prostomium (qui précède le péristomium, premier segment corporel) peut être épilobique, zygalobique ou tanylobique. Le pygidium est sous forme arrondie ou aplatie. Enfin, la disposition des soies est également notée, celles-ci peuvent suivre une distribution en paire rapprochées, éloignées ou séparées (Figs. 7, 8).



**Figure 7.** Critères d'identification de l'espèce, *A. caliginosa* (Bouché, 1972) (Photo personnelle).



**Figure 8.** Caractères externes observables chez *A. caliginosa* (Bouché, 1972) (Photo personnelle).

## 2. 4. Collecte et technique d'élevage

L'échantillonnage a été réalisé au mois de Septembre 2017, selon une méthode physique (Fig. 9), qui consiste à creuser les premières 40 cm du sol où s'effectue la recherche et la récolte manuelle des vers de terre (Bouché, 1972).

Une fois au laboratoire, les vers de terre sont triés en trois classes d'âge (juvéniles, sub-adultes et adultes) sur la base de la taille et de la présence ou de l'absence de papille génitale et de clitellum (Bhattacharya & Sahu, 2016). Ils sont considérés comme subadultes s'ils ont une tubercula pubertatis complète mais pas de clitellum et adultes s'ils ont un clitellum (Sims & Gerard, 1999). Ils sont considérés comme juvéniles s'ils n'ont ni tubercula pubertatis ni clitellum (Pelosi, 2008).

Ensuite, les vers de terre sont élevés dans des bacs en plastique (40 cm de largeur et 50 cm de longueur), où ils se nourrissent de la bouse de vache, ces déjections doivent être séchées à l'air, finement broyées avant l'emploi.



Figure 9. Echantillonnage manuel des vers de terre (Photos personnelles).

## 2.5. Préparation des vers de terre

Après une semaine d'adaptation aux conditions du laboratoire et selon les recommandations de l'organisation de coopération et de développement économique (OCED, 2016), des groupes de dix vers juveniles et adultes ont été nettoyés avec de l'eau déionisée, puis déplacés dans des boîtes de Pétri sur du papier filtre humide à l'obscurité pendant 24 h pour vider leur contenu digestif (Fig. 10 A, B). Ensuite, les vers de terre sont lavés avec de l'eau déionisée et essuyés (Fig. 10 C), puis déposés pendant quelque temps sur un papier absorbant pour éponger l'excès d'eau, avant d'être pesés individuellement et répartis d'une façon homogène dans des lots expérimentaux.



**Figure 10.** Vidange du tube digestif des vers de terre  
**A :** Mettre les lombrics dans les boîtes de Pétri, **B :** Vidange digestif, **C :** Lavage.  
 (Photos personnelles).

## 2.6. Présentation des engrais chimiques

### 2.6.1. Azote phosphaté potassique sulfaté NPKs (15.15.15)

L'engrais Azoté-Phosphaté-Potassique Sulfaté (Fig. 11), engrais ternaire, contient 15% d'azote (N), 15% d'anhydride phosphorique (P) et 15% d'oxyde de potassium (K). C'est un engrais polyvalent bien équilibré et économique, utilisé pour toutes les cultures au moment du semis. Il s'adapte à tous types de sols. Cet engrais universel contient également du soufre (8%) et des oligoéléments : Bore (45 ppm), fer (1723 ppm), manganèse (30 ppm), zinc (156 ppm) et cuivre (2 ppm).



**Figure 11.** Engrais NPKs (15.15.15) (Photos personnelles).

### 2.6.2. Triple superphosphate TSP (46% de $P_2O_5$ )

Engrais utilisé pour la céréaliculture et les légumes secs. Leur utilisation est avant le semis selon les besoins en  $P_2O_5$  (Fig. 12), il contient des oligo-éléments : Bore (61 ppm), fer (3638 ppm), manganèse (114 ppm), zinc (170 ppm) et cuivre (5 ppm).



**Figure 12.** Engrais TSP (46%  $P_2O_5$ ) (Photos personnelles).

## 2.7. Traitement et essais toxicologiques

Deux engrais à large spectre ont été utilisés, le NPK et le TSP. Ils ont été fournis par la Direction des Services Agricoles de Tébessa (DSA). Ces produits sous forme de granules, ont subi un broyage manuel à l'aide d'un mortier pour obtenir une poudre fine (Fig. 13). Différentes doses des deux engrais (400, 500, 600 et 1200 mg) ont été ajoutées à la surface du sol puis mélangées soigneusement avec suffisamment d'eau pour assurer un mélange homogène. Après une demi-heure ; et pour éviter une exposition directe (par contact) aux produits chimiques testés, les vers de terre ont été introduits dans les terrariums. Pour les lots témoins, de l'eau distillée a été utilisée. Le choix des doses a été fait selon les études de [Shruthi et al. \(2017\)](#) et sur la base du taux de mortalité élevé observé après traitement à la dose agricole recommandée (RAD correspondant à la  $DL_{90}$ ). Le test a été réalisé avec quatre répétitions contenant chacune 10 vers de terre par dose. Le contrôle de la vitalité des individus d'*A. calliginosa* au cours des essais est effectué chaque semaine et la méthode de probit de Finney a été suivie pour calculer les doses létales :  $DL_{25}$ ,  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$ . Les individus morts sont évacués des enceintes d'essai.

Les vers de terre sont considérés comme morts s'ils présentaient l'un des états suivants : disparition, sans mouvement et sans réponse à un stimulus tactile défini ([Zheng et al., 2016](#)). Une fois, les doses létales sont déterminées, elles ont été appliquées selon le protocole cité ci-dessus. Les vers de terre ont été pesés à l'aide d'une balance de précision (RADWAG, 0,000mg), puis répartis sur les 5 lots comme suit :

- Lot 1 : Lot témoin (Sol+ Eau), composé de cinq terrariums
- Lot 2 : Lot traité avec la Dose 1 du NPK, composé de cinq terrariums
- Lot 3 : Lot traité avec la Dose 2 du NPK, composé de cinq terrariums
- Lot 4 : Lot traité avec la Dose 1 du TSP, composé de cinq terrariums

- Lot 5 : Lot traité avec la Dose 2 du TSP, composé de cinq terrariums

Chaque lot, à son tour, est réparti en cinq groupes de 10 individus, chacun est maintenu dans un terrarium (20×10×7 cm) contenant 500 gr de sol. La nourriture est fournie une fois par semaine au cours des quatre semaines de l'essai expérimental. 50 ml d'eau distillée est ajouté chaque jour.



**Figure 13.** Préparation des engrais pour le traitement

**A :** Broyage manuel, **B :** NPK et TSP sous forme de poudre, **C :** Ajout du traitement au sol  
(Photos personnelles).

## 2.8. Prélèvement des échantillons

Chaque semaine de traitement, les vers de terre sont nettoyés avec de l'eau déionisée, puis pesés et placés dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre humidifié, dans l'obscurité pendant 24 h ; pour vider leur tube digestif.

Pour évaluer l'effet des engrais, l'expérience est menée durant 4 semaines sous les conditions de laboratoire. Les vers de terre ont été prélevés de chaque lot pour étudier les effets du traitement sur les biomarqueurs du stress oxydatif, la composition biochimique, la croissance, et sur la structure histopathologique des vers de terre. L'analyse des résidus par la spectrométrie de fluorescence à rayons X (FRX) a été également réalisée.

## 2.9. Suivi de la croissance

Une fois les doses létales ( $DL_{25}$  et  $DL_{50}$ ) sont calculées, elles ont été appliquées dans des boîtes en plastique. Un lot témoin est réalisé en parallèle. Pendant la période d'essai, les vers de terre ont été séparés du substrat d'essai et nettoyés avec de l'eau déminéralisée et éponnés avec du papier filtre. Le suivi de la croissance pondérale des vers juvéniles et des adultes est effectué à l'aide d'une balance de précision chaque semaine pendant 4 semaines. Cinq répétitions ont été réalisées pour chaque dose, chacune contenant 10 individus.

Le poids des vers de terre pour chaque série au cours de diverses périodes d'exposition est utilisé pour calculer le taux de la croissance et le taux d'inhibition de la croissance selon *Shi et al. (2007)* :

$$IC (\%) = (P_0 - P_t/P_0) \times 100$$

**IC** est l'inhibition de la croissance pour le groupe de dose n,

**P<sub>0</sub>** est le poids au jour 0

**P<sub>t</sub>** est le poids après t jours d'exposition.

Le taux de la croissance pour un intervalle spécifique (TCS) a été calculé par la formule suivante :

$$TCS_n = (\ln P_j - \ln P_i) / (t_j - t_i)$$

**TCS<sub>n</sub>** est le taux de croissance spécifique pour un intervalle spécifique pour le groupe de dose n du jour i au jour j (*OECD, 2006*).

**P<sub>i</sub>** est le poids au jour i

**P<sub>j</sub>** est le poids après j jours d'exposition

## 2.10. Dosage des biomarqueurs du stress oxydatif

Après chaque période de traitement (1, 2, 3 et 4 semaines), les vers de terre sont mis à jeûn pendant 24 heures. Des fragments de chair (50 mg) ont été prélevés de la même région abdominale de chaque individu juvénile et adulte pour servir aux différents dosages. L'activité spécifique des glutathion S-transférases (GSTs), glutathion peroxydase (GPx), lactate déshydrogénase (LDH) et le taux du glutathion (GSH) ont été déterminés chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* témoins et traités (Dose 1 et Dose 2) des engrais (NPK, TSP). Les protéines totales des échantillons ont été dosées selon la méthode de *Bradford (1976)*, pour pouvoir calculer le taux du glutathion et l'activité spécifique de chaque enzyme. Trois répétitions pour chaque essai ont été réalisées.

### 2.10.1. Dosage des glutathion S-transférases (GSTs)

La détermination de l'activité des glutathion S-transférases (GSTs) est réalisée selon la méthode de *Habig et al. (1974)* basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un

substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur, le glutathion (GSH) et mesurée à une longueur d'onde de 340 nm dans un spectrophotomètre.

Les juvéniles et les adultes témoins et traités (DL<sub>25</sub> et DL<sub>50</sub>) prélevés à différentes périodes après traitement, sont pesés puis broyés dans 1ml de tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH 6). L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé (13000 trs/min à 2°C pendant 30 min), le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage consiste à faire réagir 200 µl de surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM) /GSH (5 mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0,1M, pH 6)]. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 50mg de fragment de chair avec une série témoin. La lecture des absorbances est effectuée toutes les 1 mn pendant 5 minutes contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do/mn}{9,6} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

**X** : millimoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (mM/min/mg de protéines).

**ΔDo** : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

**9,6** : coefficient d'extinction molaire du CDNB (mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**Vt** : volume total dans la cuve : 1,4 ml [0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

**Vs** : volume du surnageant dans la cuve : 0,2 ml.

**mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg.

### 2.10.2. Dosage du glutathion (GSH)

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de [Weckberker & Cory \(1988\)](#), dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5-mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion.

Le dosage a été effectué après homogénéisation des fragments des juvéniles et des adultes témoins et traités prélevés au cours des périodes d'exposition dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M [7,448g EDTA, 1000 ml eau distillée]. Afin de protéger les groupements thiols du glutathion, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0,25 % [0,25g ASS, 100 ml eau distillée] où 0,2 ml de l'ASS sont additionnés à 0,8 ml d'homogénat. Le mélange après agitation est

plongé dans un bain de glace pendant 15 mn, puis centrifugé à 10000 trs/mn pendant 5 mn. Une fraction aliquote de 500 µl de l'homogénat est ajoutée à 1 ml du tampon tris/ EDTA (0,02 M, pH 9,6) [63,04 g tris, 7,4448 g EDTA, 1000 ml eau distillée] et 0,025 ml de DTNB (0,01 M) [3,96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu]. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 50 mg de fragments avec une série témoin. La lecture des absorbances est faite à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc où les 500 µl de surnageant sont remplacés par 500µl d'eau distillée. Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$X = \frac{Do}{13,1} \times \frac{Vd}{Vh} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{ mg de protéines}$$

**X** : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM / mg de protéines).

**Do** : densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

**13,1** : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH) (mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

**Vd** : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1 ml [0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat].

**Vh** : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0,8 ml.

**Vt** : volume total dans la cuve : 1,525 ml [0,5 ml surnageant + 1 ml tris / EDTA + 0,025 ml DTNB].

**Vs** : volume du surnageant dans la cuve : 0,5 ml.

**mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg.

### 2.10.3. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la glutathion peroxydase est mesurée selon la méthode de **Flohe & Gunzler, (1984)**. Cette activité a été exprimée en µmol de GSH/min/mg de protéine. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) comme substrat en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en GSSG sous l'influence de la GSH-Px.

Dans un tube sec, 200µl de surnageant est additionné à 400 µl de GSH à 0,1 mM (réaction enzymatique) et 200µl de KNaHPO<sub>4</sub> à 0,067 M (tampon d'extraction pH 7,8). Pour le blanc, le tube contient 400 µl de GSH et 200µl de KNaHPO<sub>4</sub> (réaction non enzymatique). Après une incubation au bain marie à 25°C pendant 5 min, on ajoute 200µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,3mM) pour initier la réaction ; puis 1ml de TCA (1%) est additionné pour arrêter la réaction. Le mélange mis dans de la glace pendant 30 min est centrifugé pendant 10 min à 3000 tr/min et 480 µl de surnageant récupéré est placé dans une cuve ; à laquelle on ajoute 2,2 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,32 M) et 0,32 ml de DTNB (1mM). La densité optique est lue à 412 nm après 5 min. L'essai est

conduit avec 3 répétitions comportant chacune 50mg de fragments des juvéniles et des adultes d'*A. calliginosa*.

La détermination de l'activité de la GPx se fait de la façon suivante :

$$Q = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0,04}{\text{DO étalon}}$$

$$\text{Activité de la GPx } (\mu\text{M GSH}/\text{min}/\text{mg protéines}) = \frac{Q}{\text{mg protéines}}$$

**Q** : Quantité du GSH disparu (oxydé).

**DO échantillon** : Densité optique de l'échantillon.

**DO étalon** : Densité optique de l'étalon.

**0,04** : Concentration du substrat (GSH)

#### 2.10.4. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)

Le dosage de ce biomarqueur a été mené selon la méthode de Hill & Levi (1954) ; basée sur la mesure continue de la vitesse d'oxydation du NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduite) épuisé dans la réaction par la transformation réversible du pyruvate en lactate.

Des fragments du corps (50 mg) des vers de terre témoins et traités (DL<sub>25</sub> et DL<sub>50</sub>) ont été homogénéisés dans 1 ml de Tris/HCl (0,1 M, pH 7,2). L'homogénat a été centrifugé (3000 trs/min pendant 5 min), et le surnageant récupéré est utilisé comme source d'enzyme. Le dosage a été réalisé avec 50 µl de surnageant ajoutés à 675 µl de tampon substrat (0,2 M, pH 10) et 50 µl de la solution NAD. La lecture des absorbances a été effectuée toutes les minutes pendant 5 min à 340 nm. Le dosage a été effectué avec 3 répétitions par traitement.

L'activité spécifique de la LDH est exprimée en µM/min/mg de protéine selon la formule suivante :

$$\text{LDH} = \frac{\delta\text{DO}}{6,22 \times 10^3} \times \frac{V_t}{V_s} / \text{CO}$$

**δDO** : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat.

**6,22x 10<sup>3</sup> M** : coefficient d'extinction molaire du NADH (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**Vt** : volume total de la cuve (775 µl) (50 µl de surnageant + 675 µl de tampon substrat + 50 µl de solution coenzyme NAD).

**V<sub>s</sub>** : volume de surnageant dans la cuve (50 µl).

**CO** : concentration de l'homogénat en protéines (mg/ml).

## 2.11. Extraction et dosage des métabolites

Des fragments de chair des juvéniles et des adultes témoins et traités (DL<sub>25</sub> et DL<sub>50</sub>) ont été prélevés chaque semaine et conservées dans 1 ml de TCA (acide trichloroacétique) à 20%. L'extraction des principaux constituants biochimiques (protéines, glucides et lipides) a été réalisée selon le procédé de [Shibko \*et al.\* \(1966\)](#). Après homogénéisation aux ultrasons, puis centrifugation (5000 tours/min à 4°C pendant 10 min), le surnageant I obtenu, servira pour le dosage des glucides totaux selon la méthode de [Duchateau & Florkin \(1959\)](#). Au culot I, on ajoute 1 ml de mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 trs/min, 10 mn), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides ([Goldsworthy \*et al.\*, 1972](#)) et le culot II, dissout dans de la soude (0,1 N), servira au dosage des protéines selon [Bradford \(1976\)](#).

### 2.11.1. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de [Bradford \(1976\)](#), dans une fraction aliquote de 100 µl, à laquelle on ajoute 4 ml de réactif du bleu brillant de comassie (BBC) G250 (Merck). La durée de la conservation du réactif est de 2 à 3 semaines à 4 °C. Celui-ci révèle la présence des protéines par une coloration bleue. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (Sigma) (BSA) titrant 1 mg/ml (Tableau 7).

**Tableau 7.** Dosage des protéines totales chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution standard d'albumine (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

### 2.11.2. Dosage des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon [Duchateau & Florkin \(1959\)](#). Cette méthode consiste à additionner 100 µl du surnageant, 4ml du réactif d'anthrone et de chauffer

le mélange à 80°C pendant 10min, une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présente dans l'échantillon. La lecture des absorbances est faite à une longueur d'onde de 620nm. La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de glucose (1mg/ml) (Tableau 8).

**Tableau 8.** Dosage des glucides totaux chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

### 2.11.3. Dosage des lipides totaux

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de [Goldsworthy \*et al.\* \(1972\)](#), en utilisant le réactif sulfophosphanillinique. Le dosage des lipides se fait sur des prises aliquotes de 100 µl des extraits lipidiques ou de gamme étalon auxquelles on évapore totalement le solvant puis on ajoute 1ml d'acide sulfurique concentré, les tubes sont agités, et mis pendant 10 mn dans un bain de sable à 100°C. Après refroidissement, on prend 200 µl de ce mélange auquel on ajoute 2,5 ml de réactif sulfophosphanillinique (Tableau 9). Après 30 mn à l'obscurité, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide orthophosphorique, des complexes roses. La solution mère de lipides est préparée comme suit : on prend 2,5 mg de l'huile de table (tournesol 99% triglycérides) dans un tube eppendorf et on ajoute 1 ml d'éther chloroforme (1V/1V).

**Tableau 9.** Dosage des lipides totaux chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant (éther /chloroforme) (1V/1V)	100	80	60	40	20	0
Quantité de lipides (µg)	0	50	100	150	200	250

## 2.12. Etude histologique

La technique histologique a été réalisée selon [Hould & de Shawinigan. \(1984\)](#), au Centre Hospitalo-Universitaire de Hussein Dey (Hôpital professeur Nefissa Hamoud (ex Parnet) service de Biologie Cellulaire). Elle passe par plusieurs étapes :

### 2.12.1. Fixation

Pour obtenir des coupes histologiques convenables les adultes témoins et traités prélevés doivent subir une fixation immédiate après la vidange du tube digestif, et cela par immersion de l'échantillon dans un grand volume de liquide fixateur, Le liquide fixateur utilisé dans cette étude était le formol 10% (Fig. 14). Cette étape a pour but de préserver la morphologie cellulaire et tissulaire, tout en renforçant la consistance du tissu ([Djoudad-Kadji et al., 2011](#)).



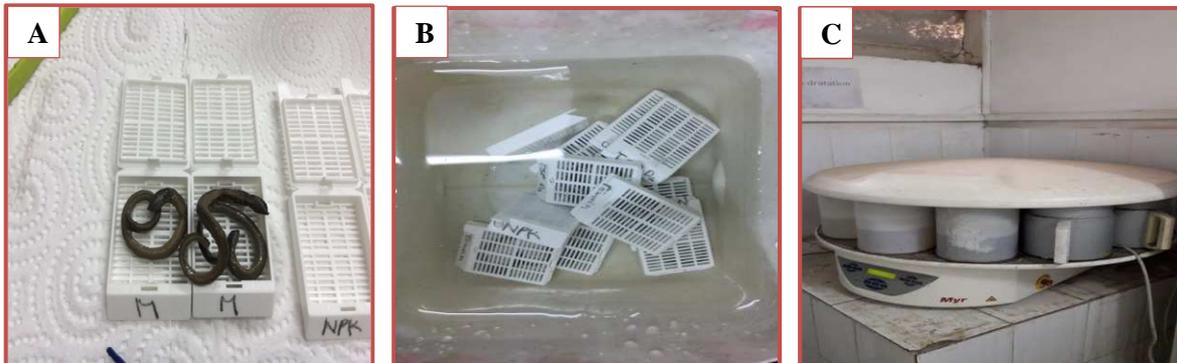
**Figure 14.** Fixation par le formol (10%) (Photos personnelles).

### 2.12.2. Inclusion

Cette étape a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Les échantillons prélevés du formol sont rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée, puis sont placés dans des cassettes histologiques marquées avant d'être mises ensuite dans un panier de l'appareil automate de circulation (Fig. 15), contenant 12 cuves où on a pu réaliser les étapes suivantes :

- **Déshydratation** : a été faite par le passage des échantillons dans 8 cuves d'éthanol de concentration croissante (de 70° à 100°) pour une durée de 45 min chacune. Cette étape permet d'éliminer l'eau des tissus pour les préparer à l'inclusion ([Alturkistani et al., 2016](#)).
- **Clarification** : dure une heure, elle a été effectuée par le passage du panier dans deux bains de xylène. Cette étape élimine toute trace d'éthanol dans l'échantillon ([Alturkistani et al., 2016](#)).

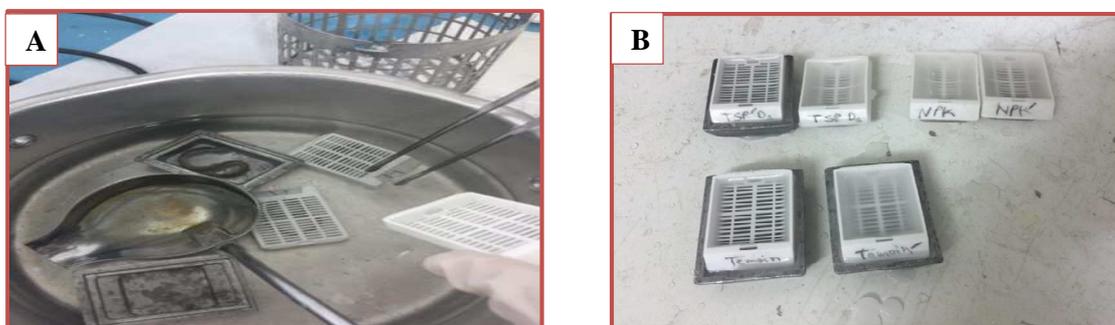
- **Inclusion** : a été faite par immersion des cassettes dans deux bains successifs de paraffine de 1h30 chacun à une température de 56°C.

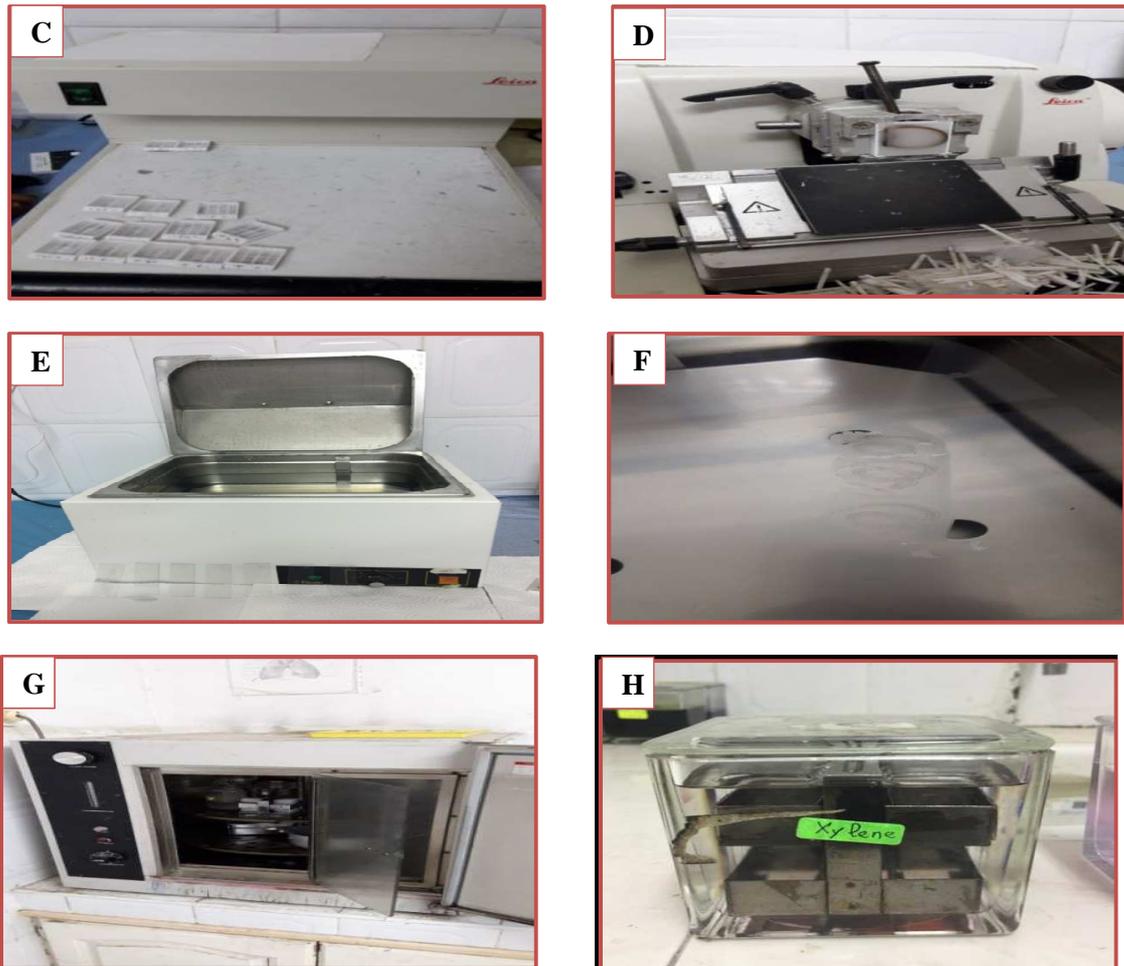


**Figure 15.** A: Placement des échantillons dans les cassettes, B: Panier d'automate, C: Déshydratation et inclusion des échantillons dans l'automate (Photos personnelles).

### 2.12.3. Enrobage et confection des coupes histologiques

Les échantillons ont été mis dans des moules en inox avant de les remplir de paraffine liquide (Fig. 16A). Afin de solidifier la paraffine pour la réalisation des coupes, les moules ont été déposés sur une plaque refroidissante (Fig. 16B, 16C). Enfin, les blocs de paraffine ont été démoulés pour y être placés dans un microtome afin de confectionner des coupes d'environ 3  $\mu\text{m}$  (Fig. 16D). Les coupes histologiques sont collées sur des lames de verre grâce à l'eau albumineuse, puis immergées un court instant dans un bain marie de 60°C (Fig. 16E, 16F). Les lames ont été rangées sur un porte-lame puis placées dans l'étuve pendant une durée de 30 minutes (Fig. 16G), avant d'être immergées dans un solvant (bain de xylène) pendant la même durée de temps afin d'éliminer toute trace de paraffine, et ainsi permettre la pénétration des colorants hydrophiles dans les tissus (Fig. 16H).

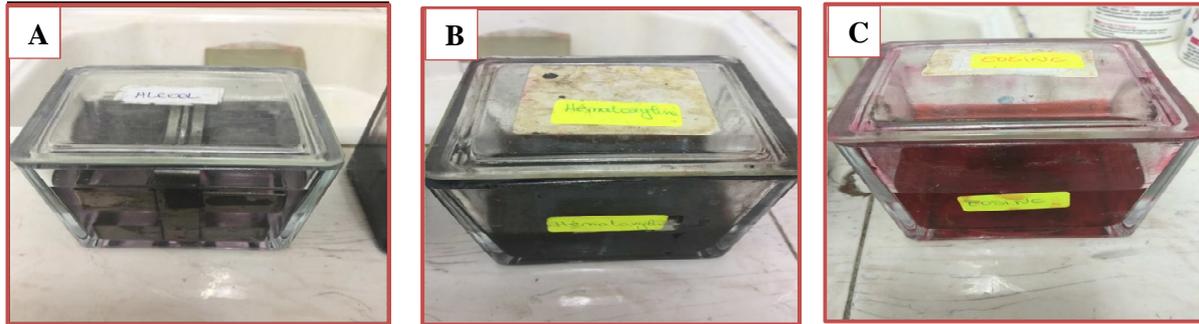




**Figure 16.** Enrobage et confection des coupes histologiques **A:** Enrobage, **(B, C):** Refroidissement, **D:** Coupe par microtome, **(E, F):** Collage des lames, **(G, H) :** Déshydratation des coupes histologiques (Photos personnelles).

#### 2.12.4. Coloration

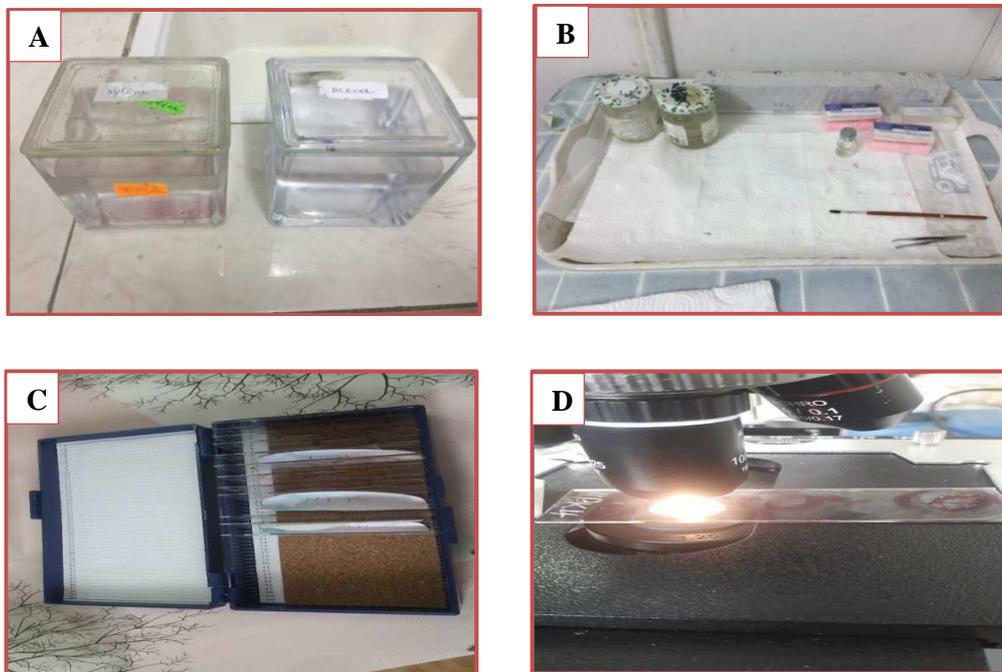
Avant coloration, les coupes histologiques doivent subir une hydratation qui consiste à l'immersion successive des lames dans un bain d'alcool absolu (Fig. 17A) puis dans un bain d'eau pour une durée de 10 min pour chacune. La coloration des lames a été faite par deux colorants qui permettent de mettre en évidence la morphologie cellulaire et tissulaire : l'éosine acide qui colore le cytoplasme basique (acidophile) en rose et l'hématoxyline basique qui colore le noyau acide (basophile) en bleu-violet (Kierszenbaum, 2006). Les lames ont tout d'abord été plongées dans un bain d'hématoxyline pendant 5 minutes, puis rincées à l'eau du robinet. Ensuite, elles ont été plongées dans un bain d'éosine pendant 3 minutes avant d'être rincées (Fig. 17B, 17C).



**Figure 17.** Coloration des coupes histologiques  
**A :** Hydratation par l'alcool absolu, **B :** Bain d'hématoxyline, **C :** Bain d'éosine.  
 (Photos personnelles).

### 2.12.5. Montage et observation microscopique

Après avoir subi une nouvelle déshydratation par l'immersion des lames dans un bain d'éthanol suivi d'un bain contenant un mélange d'éthanol/xylène et pour finir dans deux bains successifs de xylène (Fig. 18A), les lames colorées et les lamelles sont montées en ajoutant quelques gouttes d'Eukit (colle biologique) (Fig. 18B). Les lames et les lamelles ont été par la suite séchées à l'air libre avant d'être observées au microscope optique de type OPTICA AXIOM 7000 équipé d'une caméra permettant la prise d'images avec un logiciel d'imagerie numérique (USB 2.0-camera) (Fig. 18C, 18D).



**Figure 18.** Montage et observation microscopique  
**A :** Déshydratation, **B :** Montage des lames et lamelles, **C :** Lames prêtes pour observation, **D :** Observation par microscope optique (Photos personnelles).

### **2.13. Analyse des résidus par Spectrométrie de Fluorescence des rayons X (FRX)**

La spectrométrie de fluorescence X est une technique d'analyse élémentaire globale permettant d'identifier et de déterminer la plupart des éléments chimiques qui composent un échantillon. Cette technique a été réalisée au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimique (CRAPC) à Bou Smail (Tipaza, Algérie).

Les vers de terre témoins et traités ont été sélectionnés et lyophilisés par un séchoir modèle « CHRIST Alpha 2-4 LSC plus » pendant 50 heures. Une fois ces échantillons sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique " FRITSCH Pulverisette 2 ", on procède à la formation de pastilles de 32 mm avec une pastilleuse "SPECAC". Ensuite, le culot obtenu a été analysé par spectrométrie de fluorescence X (Fig. 19).

#### **Conditions d'analyse**

- **Type d'échantillon** : Oxyde/Poudre.
- **Marge d'analyse** : Béryllium -Uranium.
- **Diamètre** : 30 mm.
- **Temps de mesure** : Normal (un quart d'heure).
- **Équipement** : Spectromètre de Fluorescence des Rayons X « ZSX Primus II de Rigaku ».

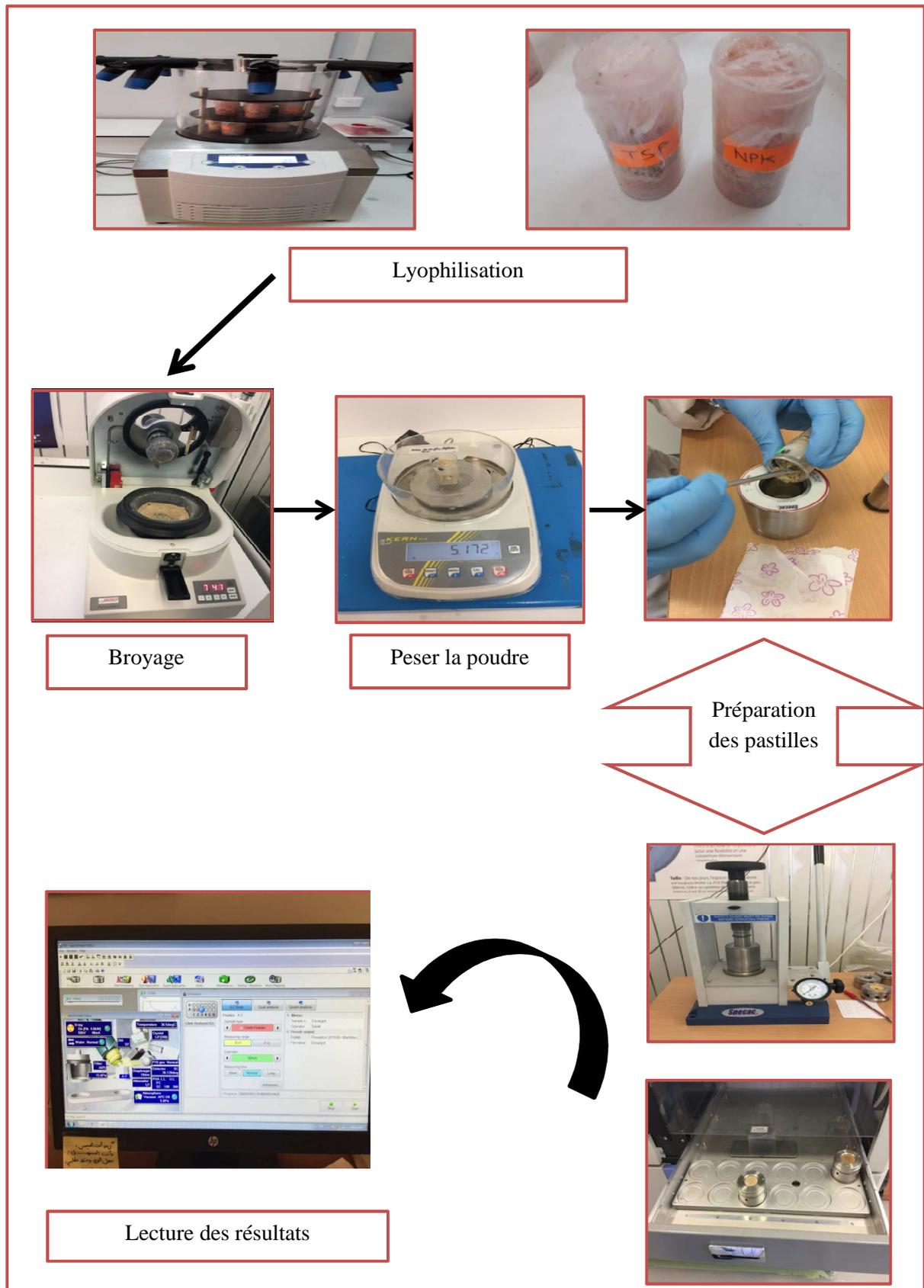


Figure 19. Schéma récapitulatif de la technique FRX (Photos personnelles).

## **2.14. Analyses statistiques**

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  l'écart-moyen (SEM). Les quantités des métabolites (protéines, glucides et lipides) sont déterminées à partir des courbes d'étalonnage dont l'équation de la droite de régression exprime l'absorbance en fonction de la quantité du standard utilisé (albumine, glucose et l'huile de tournesol). L'analyse de la variance à un critère de classification et le test HSD de Tukey ont été utilisés. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel GRAPH PAD PRISM 7.

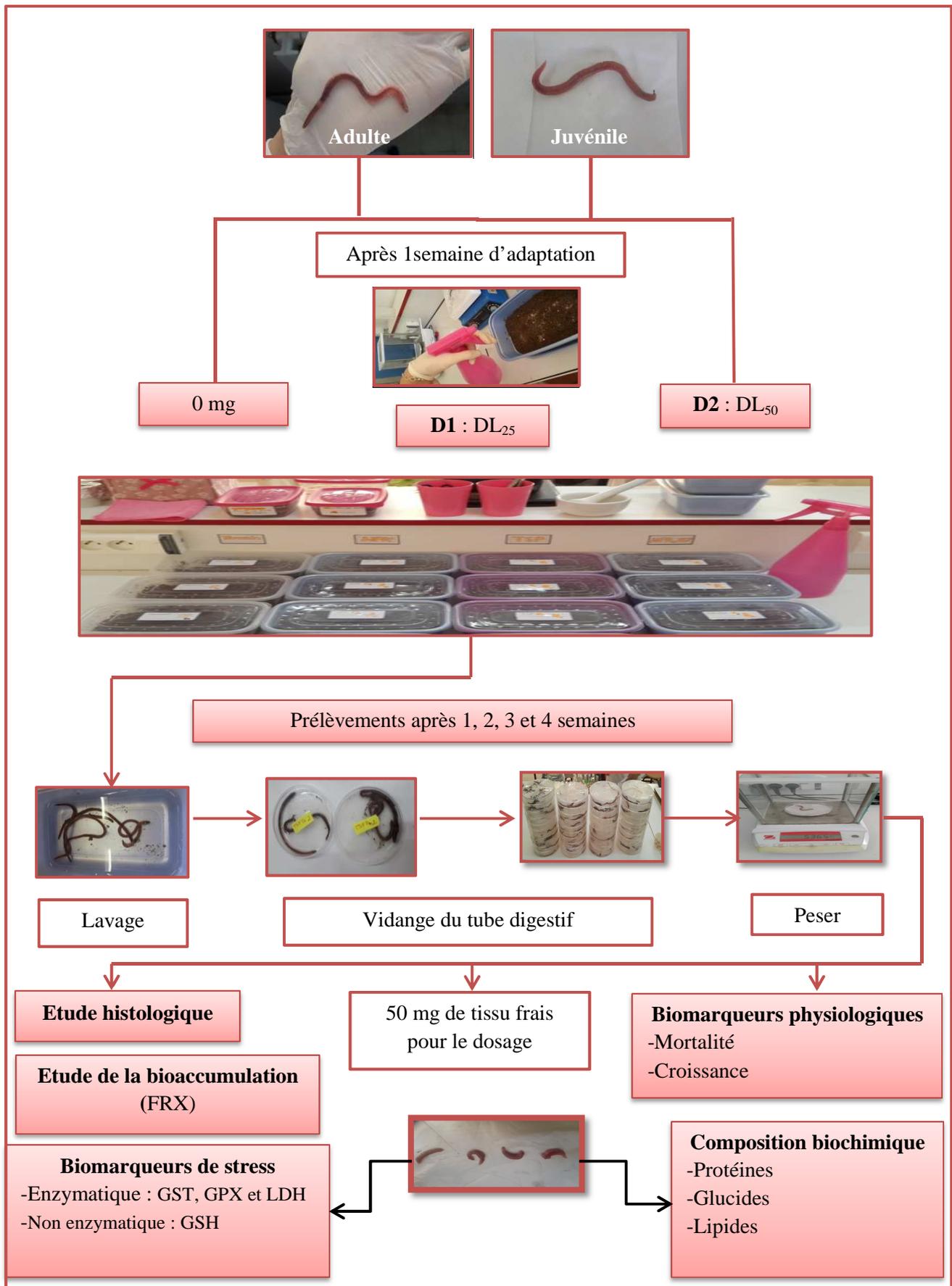


Figure 20. Schéma récapitulatif du protocole expérimental (Photos personnelles).

# *RESULTATS*

### III. RESULTATS

#### 3.1. Effet des engrais chimiques sur les biomarqueurs physiologiques des vers de terre

##### 3.1.1. Effet sur la mortalité des juvéniles

##### 3.1.1.1. Effet du NPK

Différentes doses du NPK : 400, 500, 600 et 1200 mg ont été appliquées sur les vers juvéniles d'*A. calliginosa*. Les mortalités ont été notées à 4 semaines après traitement. Un taux de mortalité de 6 % a été enregistré lorsque les juvéniles ont été exposés à 400 mg de NPK, puis il a augmenté à 24% avec la dose 500 mg, jusqu'à ce qu'il atteigne les 96% après exposition à la dose 1200 mg. Les valeurs des doses létales (DL<sub>25</sub>, DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub>) étaient respectivement de 518,9 ; 644,9 et 996,4 mg (Tableau 10). Aucune mortalité n'a été rapportée chez les séries témoins.

**Tableau 10.** Toxicité du NPK appliqué à différentes doses sur les juvéniles d'*A. calliginosa*.

Doses (mg)	Mortalité (%)	DL <sub>25</sub> (95 % IC)	DL <sub>50</sub> (95 % IC)	DL <sub>90</sub> (95 % IC)	HillSlope	R <sup>2</sup>
400	6,00 ± 4,80 a					
500	24,00 ± 4,80 b	<b>518,9</b>	<b>644,9</b>	<b>996,4</b>	0,507	0,99
600	40,00 ± 4,00 b	(479,1-557,3)	(598,6-710,8)	(801,2-1284)		
1200	96,00 ± 4,80 c					

##### 3.1.1.2. Effet du TSP

Différentes doses du TSP : 400, 500, 600 et 1200 mg ont été appliquées sur les vers juvéniles d'*A. calliginosa*. Les mortalités ont été notées à 4 semaines après traitement. Un taux de mortalité de 8 % a été enregistré lorsque les juvéniles ont été exposés à 400 mg de TSP, puis il a augmenté à 32% avec la dose 500 mg, jusqu'à ce qu'il atteigne les 98% après exposition à la dose 1200 mg. Les valeurs des doses létales (DL<sub>25</sub>, DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub>) étaient respectivement de 482,4 ; 593,1 et 896,4 mg (Tableau 11). Aucune mortalité n'a été rapportée chez les séries témoins.

**Tableau 11.** Toxicité du TSP appliqué à différentes doses sur les juvéniles d'*A. calliginosa*.

Doses (mg)	Mortalité (%)	DL <sub>25</sub> (95 % IC)	DL <sub>50</sub> (95 % IC)	DL <sub>90</sub> (95 % IC)	HillSlope	R <sup>2</sup>
400	8,00 ± 3,20 a					
500	32,00 ± 3,20 b	<b>482,4</b>	<b>593,1</b>	<b>896,4</b>	0,71	0,99
600	50,00 ± 4,00 b	(426,9-528,5)	(548,1-666,5)	(725,6-1272)		
1200	98,00 ± 3,20 c					

### 3.1.2. Effet des engrais chimiques sur la croissance des vers de terre

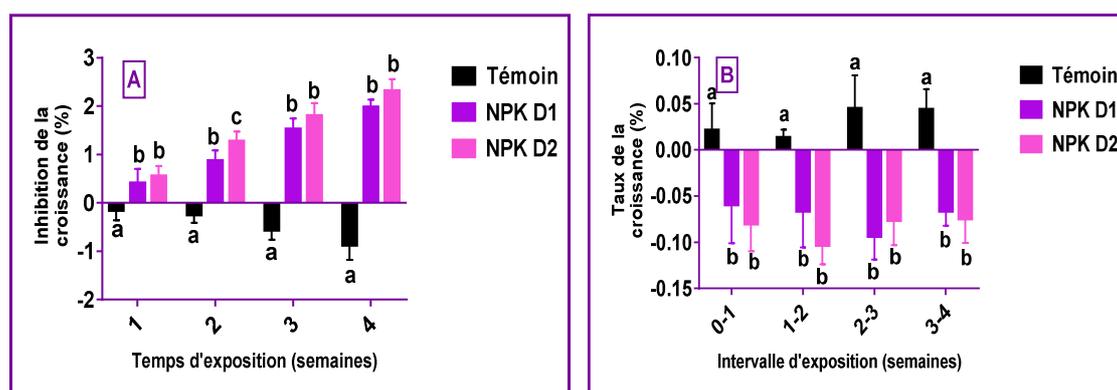
#### 3.1.2.1. Effet sur la croissance des adultes

##### A. Effet du NPK

L'inhibition de la croissance (%) et le taux de la croissance spécifique chez les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le NPK (D1 et D2), sont mentionnés dans la Figure 21 (A et B).

Chez les séries témoins, le taux d'inhibition de la croissance était négatif ce qui signifie que le poids des vers de terre a augmenté au cours des périodes testées. Tandis que le traitement appliqué a provoqué un effet inhibiteur sur la prise de poids chez ces vers au cours de la première ( $F_{2,12}=12,73 : p < 0,0001$ ), la deuxième ( $F_{2,12}=85,92 : p < 0,0001$ ), la troisième ( $F_{2,12}=163,9 : p < 0,0001$ ) et la quatrième semaine ( $F_{2,12}=268 : p < 0,0001$ ). Aucun effet dose n'a été signalé au cours des temps testés (D1 vs D2 : S1 :  $q=1,373$  ; S3 :  $q=2,758$  ; S4 :  $q=3,102$ ) sauf à deux semaines de traitement (D1 vs D2 : S2 :  $p=0,0154$ ).

En ce qui concerne le taux de la croissance, le traitement par cet engrais induit une perte de poids pendant tous les temps d'expositions par rapport aux témoins : 0-1 semaine ( $F_{2,12}=12,71 : p=0,0011$ ), 1-2 semaines ( $F_{2,12}=26,58 : p=0,0003$ ), 2-3 semaines ( $F_{2,12}=33,24 : p < 0,0001$ ) et 3-4 semaines ( $F_{2,12}=46,89 : p < 0,0001$ ). Aucun effet dose n'a été enregistré au cours de tous les temps testés (D1 vs D2 : S1 :  $q=1,375$  ; S2 :  $q=3,204$  ; S3 :  $q=1,33$  ; S4 :  $q=0,8314$ ).



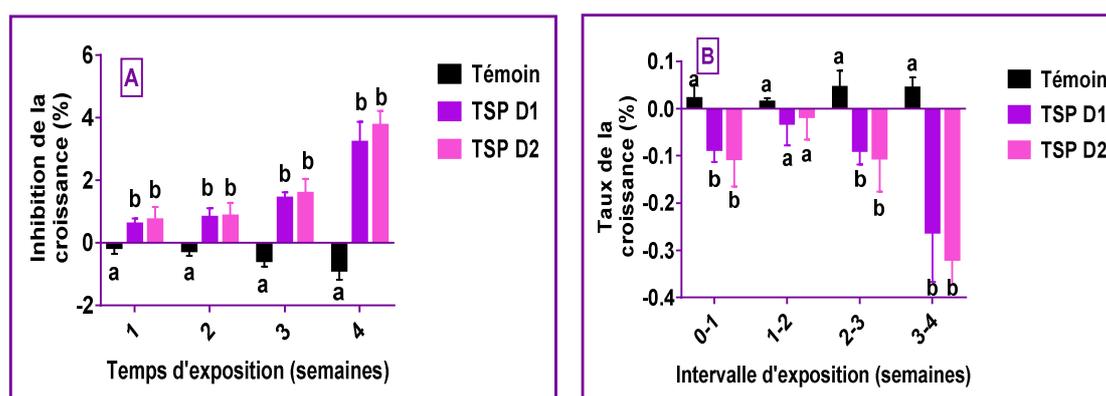
**Figure 21.** Effet du NPK (D1 et D2) sur l'inhibition de la croissance (%) (A) et sur le taux de la croissance spécifique (%) (B) chez les adultes d'*A. caliginosa* ( $m \pm SEM$ ,  $n = 5$  répétitions, chacune contenant 10 individus) : Test HSD de Tukey.

##### B. Effet du TSP

L'inhibition de la croissance (%) et le taux de la croissance spécifique chez les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le TSP (D1 et D2), sont mentionnés dans la figure 22 (A et B).

Le traitement par le TSP a causé une inhibition de la prise de poids au cours de tous les temps testés : semaine 1 ( $F_{2,12}=14,47$  :  $p<0,0001$ ), semaine 2 ( $F_{2,12}= 2075$  :  $p<0,0001$ ), semaine 3 ( $F_{2,12}= 75,94$  :  $p<0,0001$ ) et semaine 4 ( $F_{2,12}= 131,4$  :  $p<0,0001$ ). De plus, le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les deux doses testées et cela à tous les temps étudiés (D1 vs D2 : S1 :  $q=1,085$  ; S2 :  $q=0,2751$  ; S3 :  $q=1,067$  ; S4 :  $q=2,408$ ).

Concernant le taux de la croissance des vers de terre, les résultats révèlent une diminution de la croissance chez les séries traitées avec les deux doses appliquées comparativement aux témoins pendant les périodes : 0-1 semaine ( $F_{2,12}=75,76$  :  $p<0,0001$ ), 2-3 semaines ( $F_{2,12}= 13,5$  :  $p=0,0008$ ) et 3-4 semaines ( $F_{2,12}= 62,01$  :  $p<0,0001$ ). Aucun effet n'a été marqué pendant l'intervalle d'exposition, 1-2 semaines ( $p>0,05$ ). De plus, le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les doses testées et pour tous les temps étudiés (D1 vs D2 : S0-1 :  $q=1,055$  ; S2-3 :  $q=0,7294$  ; S3-4 :  $q=1,843$ ).



**Figure 22.** Effet du TSP (D1 et D2) sur l'inhibition de la croissance (%) (A) et sur le taux de la croissance spécifique (%) (B) chez les adultes d'*A. caliginosa* ( $m \pm SEM$ ,  $n = 5$  répétitions, chacune contenant 10 individus) : Test HSD de Tukey.

### C. Efficacité comparée des traitements sur l'inhibition de la croissance

Le classement par ordre croissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1), réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier 2 groupes de moyennes au cours de la semaine 1 ( $F_{3,16}=21,32$  ;  $p<0,0001$ ), la semaine 2 ( $F_{3,16}=35,52$  ;  $p<0,0001$ ), et la semaine 3 ( $F_{3,16}=170,4$  ;  $p<0,0001$ ), le premier groupe renferme les témoins et le second formé des traités par les deux engrais (NPK et TSP). Par contre, à 4 semaines d'exposition, on a noté trois groupes ( $F_{3,16}=115,5$  ;  $p<0,0001$ ) ; chacun étant constitué d'une série (Tableau 12).

Concernant les traités à la dose 2, le classement relatif à l'inhibition de la croissance (Tableau 13), a permis d'identifier 3 groupes à une semaine ( $F_{3,16}=18,43$  ;  $p<0,0001$ ) et à quatre semaines de traitement ( $F_{3,16}=144,2$  ;  $p<0,0001$ ), chacun étant représenté par une série. Par ailleurs, deux groupes ont été identifiés à 2 ( $F_{3,16}=64,62$  ;  $p<0,0001$ ) et à 3 semaines de traitement ( $F_{3,16}=51,52$  ;  $p<0,0001$ ), un groupe formé des témoins seuls et un second constitué des traités avec les deux engrais (NPK et TSP).

**Tableau 12.** Classement par ordre croissant du taux d'inhibition de la croissance (%), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	-0,151	a	<0,0001
	NPK D1	0,416	b	
	TSP D1	0,602	b	
Semaine 2	Témoins	-0,249	a	<0,0001
	TSP D1	0,819	b	
	NPK D1	0,877	b	
Semaine 3	Témoins	-0,566	a	<0,0001
	TSP D1	1,434	b	
	NPK D1	1,526	b	
Semaine 4	Témoins	-0,878	a	<0,0001
	NPK D1	1,985	b	
	TSP D1	3,223	c	

**Tableau 13.** Classement par ordre croissant du taux d'inhibition de la croissance (%), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	-0,151	a	<0,0001
	NPK D2	0,561	b	
	TSP D2	0,739	c	
Semaine 2	Témoins	-0,249	a	<0,0001
	TSP D2	0,857	b	
	NPK D2	1,279	b	
Semaine 3	Témoins	-0,566	a	<0,0001
	TSP D2	1,581	b	
	NPK D2	1,806	b	
Semaine 4	Témoins	-0,878	a	<0,0001
	NPK D2	2,317	b	
	TSP D2	3,756	c	

#### D. Efficacité comparée des traitements sur le taux de la croissance

Le classement par ordre décroissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1) a permis d'identifier 2 groupes à une semaine ( $F_{3,16}=21,07$  ;  $p<0,0001$ ), à deux semaines ( $F_{3,16}=5,519$  ;  $p=0,0085$ ) et à trois semaines de traitement ( $F_{3,16}=22,98$  ;  $p<0,0001$ ), le premier groupe renferme les témoins et le second constitué des traités par le NPK et le TSP. Par contre

à 4 semaines de traitement ( $F_{3,16}=25,51$  ;  $p<0,0001$ ), 3 groupes sont constatés ; chacun étant constitué d'une série (Tableau 14).

D'après le classement du taux de la croissance spécifique chez les traités à la dose 2, on a pu identifier 2 groupes de moyennes à la semaine 1 ( $F_{3,16}=40,16$  ;  $p<0,0001$ ), la semaine 2 ( $F_{3,16}=10,25$ ,  $p=0,0005$ ) et la semaine 3 ( $F_{3,16}=5,472$  ;  $p=0,0008$ ), un groupe formé des témoins, et un second groupe constitué des traités avec les deux engrais. Par ailleurs, la quatrième semaine ( $F_{3,16}=57,6$  ;  $p=0,0008$ ) affiche trois groupes de moyennes, chacun étant constitué d'une série (Tableau 15).

**Tableau 14.** Classement par ordre décroissant du taux de la croissance spécifique (%), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la dose 1 : test HSD de Tukey.

Intervalle d'exposition	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
0-1	Témoins	0,021	a	<0,0001
	NPK D1	-0,059	b	
	TSP D1	-0,086	b	
1-2	Témoins	0,013	a	0,0085
	TSP D1	-0,031	b	
	NPK D1	-0,066	b	
2-3	Témoins	0,045	a	<0,0001
	TSP D1	-0,088	b	
	NPK D1	-0,093	b	
3-4	Témoins	0,044	a	<0,0001
	NPK D1	-0,066	b	
	TSP D1	-0,261	c	

**Tableau 15.** Classement par ordre décroissant du taux de la croissance spécifique (%), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la dose 2 : test HSD de Tukey.

Intervalle d'exposition	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
0-1	Témoins	0,021	a	<0,0001
	NPK D2	-0,080	b	
	TSP D2	-0,106	b	
1-2	Témoins	0,013	a	0,0005
	NPK D2	-0,010	b	
	TSP D2	-0,017	b	
2-3	Témoins	0,045	a	0,0008
	NPK D2	-0,076	b	
	TSP D2	-0,104	b	
3-4	Témoins	0,044	a	0,0008
	NPK D2	-0,074	b	
	TSP D2	-0,319	c	

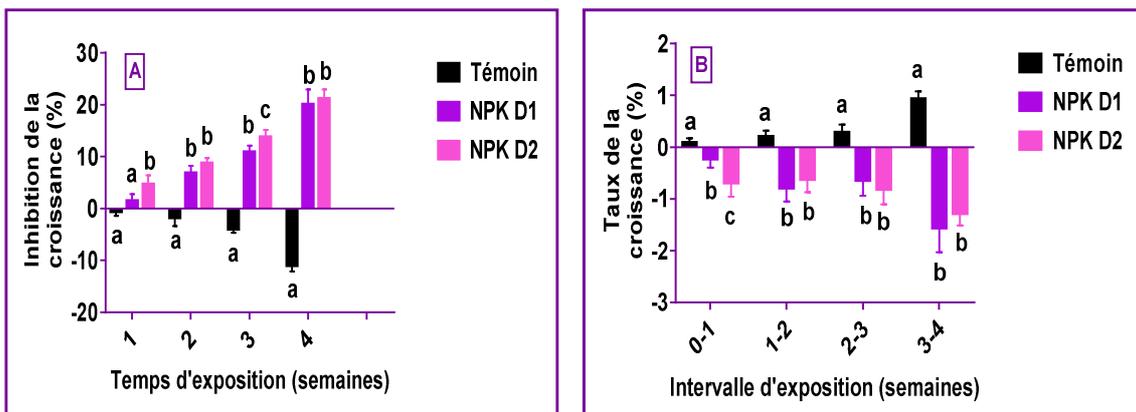
### 3.1.2.2. Effet sur la croissance des juvéniles

#### A. Effet du NPK

L'inhibition de la croissance (%) et le taux de la croissance spécifique chez les juvéniles d'*A. caliginosa* traités avec le NPK (D1 et D2), sont mentionnés dans la figure 23 (A et B).

Le taux d'inhibition de la croissance négatif signifie que le poids des vers de terre a augmenté, et les taux positifs représentent l'inhibition de la croissance. L'application du NPK sur les juvéniles a causé un effet inhibiteur sur la prise de poids à la première (F<sub>2,12</sub>= 21,39 : p < 0,001), la deuxième (F<sub>2,12</sub>= 88,64 : p < 0,0001), la troisième (F<sub>2,12</sub>= 393,3 : p<0,0001) et la quatrième semaine (F<sub>2,12</sub>= 409,3 : p<0,0001), avec un effet dose à une semaine et à trois semaines de traitement (D1 vs D2 : S1 : p=0,0059 ; S3 : p=0,0032 respectivement). Par ailleurs, aucun effet dose n'a été signalé à deux et à quatre semaines de traitement (D1 vs D2 : S2 : q=3,169 ; S4 : q=1,199).

En ce qui concerne le taux de la croissance spécifique, les valeurs positives signifient que le poids des lombrics a augmenté. Tandis que, les taux négatifs représentent l'inhibition de la croissance à des intervalles spécifiques. Le taux de la croissance des vers de terre traités par le NPK était négatif ; le traitement a induit une perte de poids pendant toutes les périodes testées : 0-1 semaine (F<sub>2,12</sub>=22,46 : p<0,0001), 1-2 semaines (F<sub>2,12</sub>= 30,49 : p=0,0003), 2-3 semaines (F<sub>2,12</sub>=26,88 : p<0,0001) et 3-4 semaines (F<sub>2,12</sub>=94,53 : p<0,0001), avec un effet dose seulement à une semaine de traitement (D1 vs D2 : S1 : p=0,0049).



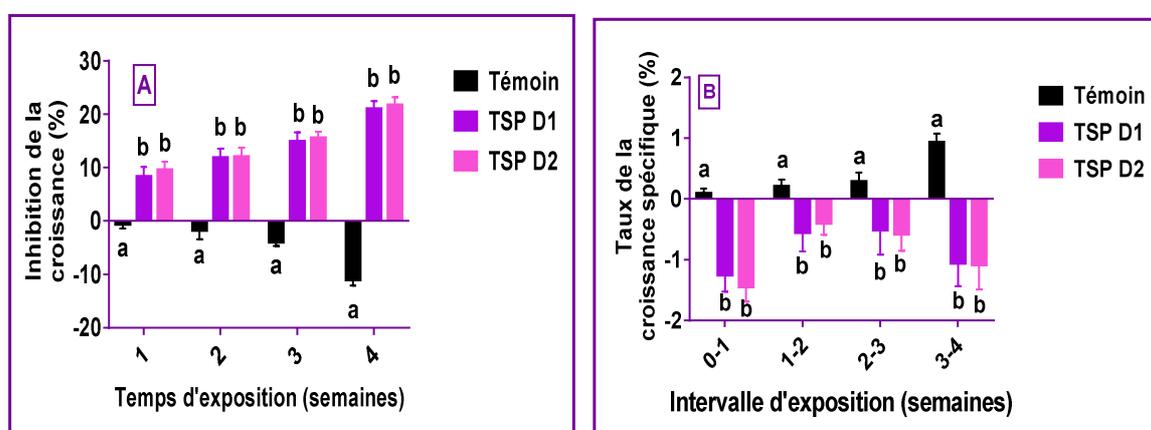
**Figure 23.** Effet du NPK (D1 et D2) sur l'inhibition de la croissance (%) (A) et sur le taux de la croissance spécifique (%) (B) chez les juvéniles d'*A. caliginosa* (m ± SEM, n = 5 répétitions, chacune contenant 10 individus) : Test HSD de Tukey.

## B. Effet du TSP

L'inhibition de la croissance (%) et le taux de la croissance spécifique chez les juvéniles d'*A. caliginosa* traités avec le TSP (D1 et D2), sont mentionnés dans la figure 24 (A et B).

Les résultats de l'inhibition de la croissance révèlent un effet inhibiteur sur la prise de poids à la première ( $F_{2,12}= 77,12 : p<0,0001$ ), la deuxième ( $F_{2,12}= 116 : p<0,0001$ ), la troisième ( $F_{2,12}= 409,3 : p<0,0001$ ) et la quatrième semaine ( $F_{2,12}= 1013 : p<0,0001$ ). Aucun effet dose n'a été signalé au cours des périodes testées (D1 vs D2 : S1 :  $q=1,906$  ; S2 :  $q=0,3053$  ; S3 :  $q=1,118$  ; S4 :  $q=1,211$ ).

Le taux de la croissance des vers de terre traités par les deux doses était négatif ; le traitement a provoqué une perte de poids pendant toutes les périodes testées : 0-1 semaine ( $F_{2,12}=75,76 : p<0,0001$ ), 1-2 semaines ( $F_{2,12}= 16,89 : p=0,0003$ ), 2-3 semaines ( $F_{2,12}= 13,5 : p=0,0008$ ) et 3-4 semaines ( $F_{2,12}= 62,01 : p<0,0001$ ). Le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les doses testées (D1 vs D2 : S1 :  $q=1,91$  ; S2 :  $q=1,567$  ; S3 :  $q=0,5075$  ; S4 :  $q=0,1835$ ).



**Figure 24.** Effet du TSP (D1 et D2) sur l'inhibition de la croissance (%) (A) et sur le taux de la croissance spécifique (%) (B) chez les juvéniles d'*A. caliginosa* ( $m \pm SEM$ ,  $n = 5$  répétitions, chacune contenant 10 individus) : Test HSD de Tukey.

## C. Efficacité comparée des traitements sur l'inhibition de la croissance

Un classement par ordre croissant de l'inhibition de la croissance est mentionné dans le tableau 16. Les résultats du taux d'inhibition de la croissance chez les séries traitées à la Dose 1, mettent en évidence l'existence de deux groupes après une semaine de traitement ( $F_{3,16}=80,47 ; p<0,0001$ ), un groupe formé des témoins et des traités par le NPK et un autre groupe constitué du TSP. Concernant la deuxième ( $F_{3,16}=110,9 ; p<0,0001$ ) et la troisième

semaine ( $F_{3,16}=322,9$  ;  $p<0,0001$ ), trois groupes de moyennes sont constatés ; chacun étant constitué d'une série. Pour la quatrième semaine de traitement ( $F_{3,16}=405,2$  ;  $p<0,0001$ ), 2 groupes sont signalés, les témoins représentent le premier groupe, le NPK et le TSP forment le deuxième groupe.

Concernant les traités par les deux engrais à la Dose 2, le classement croissant relatif à l'inhibition de la croissance (Tableau 17), a permis de mettre en évidence 3 groupes distincts après 1 ( $F_{3,16}=90,11$  ;  $p<0,0001$ ), 2 ( $F_{3,16}=180,3$  ;  $p<0,0001$ ) et 3 semaines de traitement ( $F_{3,16}=513,7$  ;  $p<0,0001$ ), chacun étant constitué d'une série. Tandis qu'à la quatrième semaine ( $F_{3,16}=337,8$  ;  $p<0,0001$ ), on note 2 groupes de moyennes, le premier groupe est formé des témoins seuls, et un second renferme les deux traitements.

**Tableau 16.** Classement par ordre croissant du taux d'inhibition de la croissance (%), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	-0,59	a	<0,0001
	NPK D1	1,57	a	
	TSP D1	8,40	b	
Semaine 2	Témoins	-1,76	a	<0,0001
	NPK D1	6,90	b	
	TSP D1	11,89	c	
Semaine 3	Témoins	-3,98	a	<0,0001
	NPK D1	10,97	b	
	TSP D1	14,99	c	
Semaine 4	Témoins	-11,01	a	<0,0001
	NPK D1	20,14	b	
	TSP D1	21,07	b	

**Tableau 17.** Classement par ordre croissant du taux d'inhibition de la croissance (%), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	-0,59	a	<0,0001
	NPK D1	4,73	b	
	TSP D1	9,61	c	
Semaine 2	Témoins	-1,76	a	<0,0001
	NPK D1	8,80	b	
	TSP D1	12,12	c	
Semaine 3	Témoins	-3,98	a	<0,0001
	NPK D1	13,84	b	
	TSP D1	15,61	c	
Semaine 4	Témoins	-11,01	a	<0,0001
	NPK D1	21,22	b	
	TSP D1	21,37	b	

#### D. Efficacité comparée des traitements sur le taux de la croissance

Le classement par ordre décroissant des valeurs moyennes du taux de la croissance des juvéniles témoins et traités par le NPK et le TSP à la dose 1 réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier 2 groupes de moyennes à une semaine de traitement ( $F_{3,16}=82,68$  ;  $p<0,0001$ ), le premier renferme les témoins et les traités avec le NPK et le second contient les traités par le TSP. Concernant la deuxième ( $F_{3,16}=17,19$  ;  $p<0,0001$ ), la troisième ( $F_{3,16}=11,63$  ;  $p=0,0003$ ) et la quatrième semaine ( $F_{3,16}=51,98$  ;  $p<0,0001$ ), 2 groupes ont été également constatés, le premier groupe formé des témoins seuls, et un second groupe composé des traités par les deux engrais (Tableau 18).

Concernant les témoins et les traités à la Dose 2, ce classement a permis d'identifier 3 groupes à une semaine ( $F_{3,16}=91,79$  ;  $p<0,0001$ ), et trois semaines de traitement ( $F_{3,16}=24,4$  ;  $p<0,0001$ ), chacun étant constitué d'une série. Par contre, à 2 semaines ( $F_{3,16}=29,79$  ;  $p<0,0001$ ), et à quatre semaines ( $F_{3,16}=40,26$  ;  $p<0,0001$ ), deux groupes sont constatés, le premier groupe renferme les témoins seuls, et un second groupe contenant les traités avec le NPK et le TSP (Tableau 19).

**Tableau 18.** Classement par ordre décroissant du taux de la croissance spécifique (%), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Intervalle d'exposition	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
0-1	Témoins	0,091	a	<0,0001
	NPK D1	-0,227	a	
	TSP D1	-1,256	b	
1-2	Témoins	0,207	a	<0,0001
	TSP D1	-0,554	b	
	NPK D1	-0,796	b	
2-3	Témoins	0,287	a	0,0003
	1 TSP D1	-0,512	b	
	NPK D	-0,638	b	
3-4	Témoins	0,934	a	<0,0001
	TSP D1	-1,059	b	
	NPK D1	-1,559	b	

**Tableau 19.** Classement par ordre décroissant du taux de la croissance spécifique (%), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Intervalle d'exposition	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
0-1	Témoins	0,091	a	<0,0001
	NPK D1	-0,694	b	
	TSP D1	-1,446	c	
1-2	Témoins	0,207	a	<0,0001
	TSP D1	-0,401	b	
	NPK D1	-0,622	b	
2-3	Témoins	0,287	a	<0,0001
	TSP D1	-0,579	b	
	NPK D1	-0,813	c	
4	Témoins	0,934	a	<0,0001
	TSP D1	-1,086	b	
	NPK D1	-1,282	b	

### 3.2. Effet des engrais chimiques sur les biomarqueurs du stress oxydatif

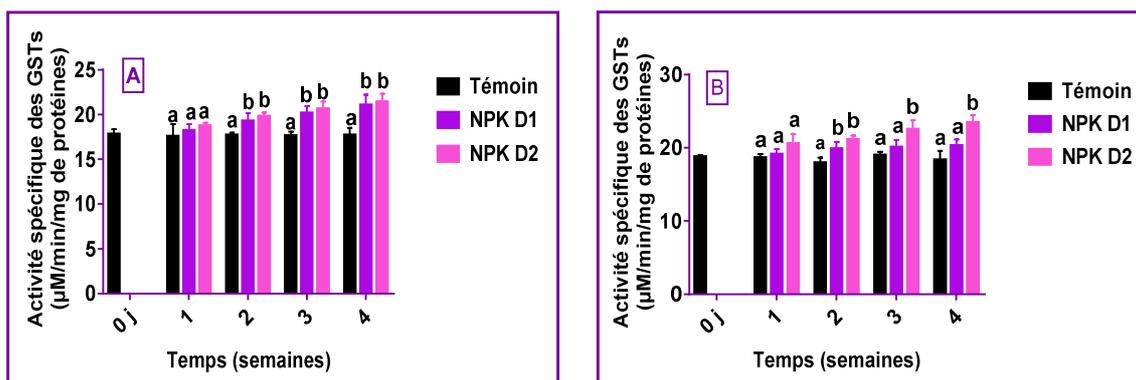
#### 3.2.1. Activité spécifique des GSTs chez les adultes et les juvéniles

##### 3.2.1.1. Effet du NPK

L'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le NPK (D1 et D2), est mentionnée dans la figure 25 (A et B).

Les résultats obtenus chez les adultes révèlent une augmentation significative de ce biomarqueur avec les deux doses appliquées à 2 ( $F_{2,6}=11,89$  ;  $p=0,0082$ ), à 3 ( $F_{2,6}= 16,45$  ;  $p=0,0037$ ) et à 4 semaines de traitement ( $F_{2,6}= 14,12$  ;  $p=0,0054$ ) par rapport aux témoins, sans effet dose (D1 vs D2 : S2 :  $q=1,663$  ; S3 :  $q=1,22$  ; S4 :  $q=0,6743$ ). Par contre, aucun effet n'a été signalé au cours de la première semaine ( $p>0,05$ ).

Chez les juvéniles, cette activité marque également une augmentation significative à 2 semaines de traitement ( $F_{2,6}=14,89$  ;  $p=0,0049$ ) avec les 2 doses appliquées, et à 3 ( $F_{2,6}=10,93$  ;  $p=0,0100$ ) et 4 semaines de traitement ( $F_{2,6}=18,53$  ;  $p=0,0082$ ) avec la dose la plus forte (Dose 2). Par contre, aucun effet n'a été signalé au cours de la première semaine de traitement ( $p>0,05$ ).



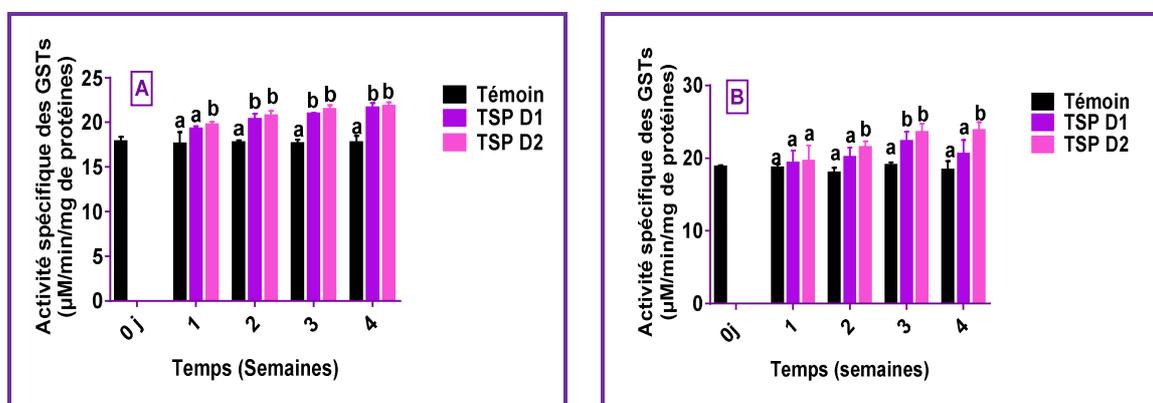
**Figure 25.** Effet du NPK (D1 et D2) sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.2.1.2. Effet du TSP

L'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le TSP (D1 et D2), est mentionnée dans la figure 26 (A et B).

Chez les adultes, les résultats de cette activité montrent une augmentation significative après 1 semaine de traitement avec la dose la plus forte ( $F_{2,6}=5,95$  :  $p=0,0377$ ), et après 2 semaines ( $F_{2,6}= 34,27$  :  $p=0,0005$ ), 3 semaines ( $F_{2,6}= 87,23$  :  $p<0,0001$ ), et 4 semaines ( $F_{2,6}= 46,08$  :  $p=0,0002$ ) avec les deux doses appliquées. Par ailleurs, aucun effet dose n'a été signalé au cours de toutes les périodes testées (D1 vs D2 : S1 :  $q=0,9585$  ; S2 :  $q=1,373$  ; S3 :  $q=2,112$  ; S4 :  $q=0,5417$ ).

En ce qui concerne les juvéniles, cette activité marque également une augmentation significative à 3 semaines de traitement ( $F_{2,6}=15,04$  ;  $p=0,0046$ ) avec les 2 doses appliquées, et à 4 semaines ( $F_{2,6}=10,1$  ;  $p=0,0120$ ) avec la dose la plus forte (Dose 2). Par contre, aucun effet n'a été signalé au cours de la première et la deuxième semaine de traitement ( $p>0,05$ ).



**Figure 26.** Effet du TSP (D1 et D2) sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.2.1.3. Efficacité comparée des engrais sur l'activité des GSTs chez les adultes

Le classement par ordre croissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1) réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier 1 seul groupe à une semaine renfermant les témoins et les traités, 2 groupes au cours de la deuxième semaine ( $F_{3,8}=5,717$  ;  $p=0,0217$ ), un groupe qui englobe les témoins, les traités NPK et un second groupe composé des traités au TSP. A la troisième ( $F_{3,8}= 12,81$  ;  $p=0,0020$ ) et à la quatrième semaine ( $F_{3,8}= 16,89$  ;  $p=0,0008$ ), deux groupes sont également constatés, le premier groupe formé des témoins seuls et un second groupe constitué des deux traitements (Tableau 20).

Concernant les traités avec le TSP et le NPK à la Dose 2, le classement relatif à l'activité des GSTs (Tableau 21), a permis d'identifier 1 seul groupe à une semaine contenant les témoins et les traités, 2 groupes au cours de la deuxième semaine ( $F_{3,8}= 15,47$  ;  $p=0,0011$ ), la troisième ( $F_{3,8}= 32,52$  ;  $p<0,0001$ ) et la quatrième semaine ( $F_{3,8}= 27,21$  ;  $p=0,0002$ ) ; un premier groupe englobe les témoins et le second renferme les traités par NPK et TSP. On peut conclure que les deux engrais ont un effet similaire sur ce biomarqueur.

**Tableau 20.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	17,60	a	>0,05
	NPK D1	18,21	a	
	TSP D1	19,29	a	
Semaine 2	Témoins	17,75	a	0,021
	NPK D1	19,31	a	
	TSP D1	20,36	b	
Semaine 3	Témoins	17,63	a	0,002
	NPK D1	20,17	b	
	TSP D1	20,97	b	
Semaine 4	Témoins	17,71	a	0,0008
	NPK D1	21,06	b	
	TSP D1	21,64	b	

**Tableau 21.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	17,60	a	>0,05
	NPK D2	18,74	a	
	TSP D2	19,58	a	
Semaine 2	Témoins	17,75	a	0,001
	NPK D2	19,83	b	
	TSP D2	20,74	b	
Semaine 3	Témoins	17,63	a	0,0002
	NPK D2	20,66	b	
	TSP D2	21,44	b	
Semaine 4	Témoins	17,71	a	<0,0001
	NPK D2	21,43	b	
	TSP D2	21,83	b	

#### 3.2.1.4. Efficacité comparée des engrais sur l'activité des GSTs chez les juvéniles

Le classement par ordre croissant des valeurs moyennes concernant la première et la deuxième dose (D1, D2) (Tableaux 22, 23) réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier un seul groupe constitué des témoins et des traités par le NPK et le TSP pour toutes les périodes de traitement : semaine 1, 2, 3 et 4 ( $p > 0,05$ ).

**Tableau 22.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	18,65	a	>0,05
	NPK D1	19,12	a	
	TSP D1	19,33	a	
Semaine 2	Témoins	17,99	a	>0,05
	NPK D1	19,90	a	
	TSP D1	20,10	a	
Semaine 3	Témoins	19,03	a	>0,05
	NPK D1	20,12	a	
	TSP D1	20,33	a	
Semaine 4	Témoins	18,36	a	>0,05
	NPK D1	20,32	a	
	TSP D1	20,56	a	

**Tableau 23.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	18,65	a	>0,05
	TSP D2	19,59	a	
	NPK D2	20,59	a	
Semaine 2	Témoins	17,99	a	>0,05
	TSP D2	20,15	a	
	NPK D2	21,15	a	
Semaine 3	Témoins	19,03	a	>0,05
	TSP D2	20,87	a	
	NPK D2	22,53	a	
Semaine 4	Témoins	18,36	a	>0,05
	TSP D2	21,12	a	
	NPK D2	23,45	a	

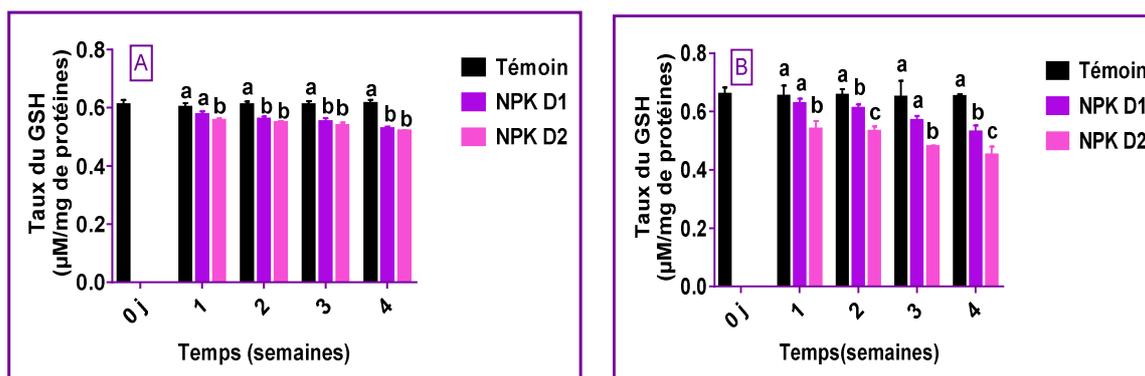
### 3.2.2. Taux du GSH chez les adultes et les juvéniles

#### 3.2.2.1. Effets du NPK

Le taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le NPK (D1 et D2), est mentionnée dans la figure 27 (A et B).

Les résultats révèlent une diminution significative de ce taux après 2 semaines ( $F_{2,6}=41,53$  ;  $p=0,0003$ ), 3 semaines ( $F_{2,6}= 38,85$  ;  $p=0,0004$ ) et 4 semaines de traitement ( $F_{2,6}= 124,5$  ;  $p<0,0001$ ) avec les deux doses appliquées. Tandis que, cette diminution est signalée au cours de la première semaine après traitement avec la dose la plus forte ( $F_{2,6}=13,2$  ;  $p=0,064$ ). Par ailleurs, la comparaison par le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les doses testées (D1 vs D2 : S1 :  $q=3,272$  ; S2 :  $q=2,48$  ; S3 :  $q=2,203$  ; S4 :  $q=1,723$ ).

Les mêmes observations ont été constatées chez les juvéniles, où on a noté une diminution significative du taux du GSH après traitement avec la dose la plus forte du NPK à 1 semaine ( $F_{2,6}=13,85$  ;  $p=0,0065$ ) et 3 semaines de traitement ( $F_{2,6}= 19,55$  ;  $p=0,0024$ ) et avec les deux doses appliquées à 2 semaines ( $F_{2,6}=40,54$  ;  $p=0,0003$ ) et 4 semaines de traitement ( $F_{2,6}=70,39$  ;  $p<0,0001$ ). Par ailleurs, la comparaison par le Test HSD de Tukey, révèle un effet dose au cours de toutes les périodes testées (D1 vs D2 : S1 :  $p= 0,0187$  ; S2 :  $p= 0,0031$  ; S3 :  $p=0,0370$  ; S4 :  $p=0,0086$ ).



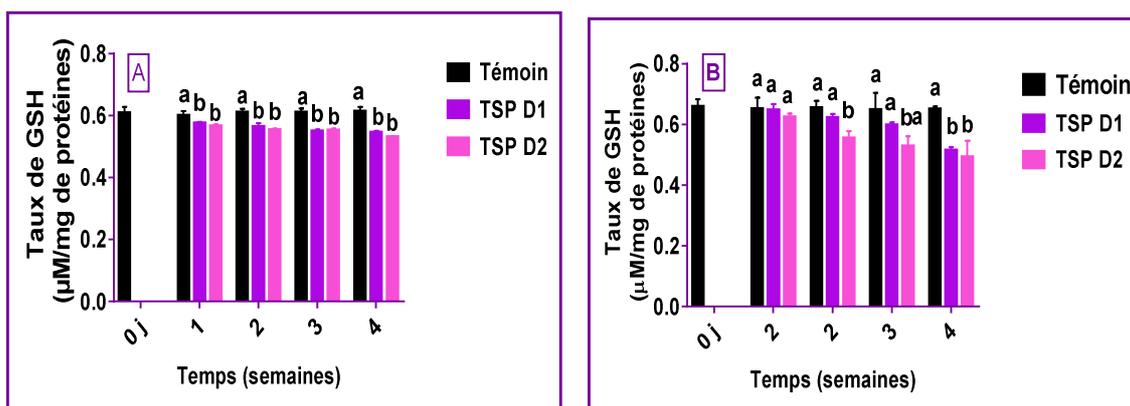
**Figure 27.** Effet du NPK (D1 et D2) sur le taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.2.2.2. Effets du TSP

Le taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes et les juvéniles d'*A. caliginosa* traités avec le TSP (D1 et D2), est mentionné dans la figure 28 (A et B).

Les résultats du taux du GSH obtenus chez les adultes montrent une diminution significative après traitement avec les deux doses appliquées à 1 ( $F_{2,6}=13,4$  ;  $p=0,0061$ ), à 2 ( $F_{2,6}=35,03$  ;  $p=0,0003$ ), à 3 ( $F_{2,6}=63,29$  ;  $p<0,0001$ ), et à 4 semaines de traitement ( $F_{2,6}=92,99$  ;  $p<0,0001$ ). De plus, la comparaison par le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les doses testées (D1 vs D2 : S1 :  $q=1,755$  ; S2 :  $q=1,938$  ; S3 :  $q=0,8348$  ; S4 :  $q=3,132$ ).

Concernant les juvéniles, le traitement n'exerce aucun effet sur le taux du GSH pour la première semaine ( $p>0,05$ ). Tandis qu'après 2 ( $F_{2,6}=23,31$  ;  $p=0,0015$ ) et 3 semaines de traitement ( $F_{2,6}=7,884$  ;  $p=0,0209$ ), on note une diminution significative après traitement avec la dose la plus forte. Concernant la quatrième semaine ( $F_{2,6}=21,8$  ;  $p=0,0018$ ), une diminution du taux du GSH est signalée après traitement avec les deux doses appliquées. Par ailleurs, la comparaison par le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les doses testées (D1 vs D2 : S3 :  $q=3,261$ ; S4 :  $q=1,196$ ). De plus, un effet dose a été remarqué à 2 semaines (D1 vs D2 : S2 :  $p=0,0097$ ).



**Figure 28.** Effet du TSP (D1 et D2) sur le taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.2.2.3. Efficacité comparée des engrais sur le taux du GSH chez les adultes

Un classement par ordre décroissant du taux du GSH est mentionné dans le tableau 24. Les résultats mettent en évidence l'existence de deux groupes pour les traités à la Dose 1, après une semaine de traitement ( $F_{3,8}=8,893$  ;  $p=0,0063$ ), le premier groupe est formé des témoins et du NPK et le deuxième constitué du TSP. A 2 semaines ( $F_{2,6}=28,38$  ;  $p<0,0001$ ), à 3 semaines ( $F_{2,6}=38,78$  ;  $p<0,0001$ ) et à 4 semaines de traitement, deux groupes sont également constatés, un groupe représenté par les témoins, et un second groupe par les deux traitements.

Pour les traités avec la Dose 2, le classement relatif au taux du GSH (Tableau 25), révèle l'existence de 3 groupes distincts après une semaine de traitement ( $F_{2,6}=41,24$  ;  $p<0,0001$ ), chacun étant constitué d'une série. Concernant la deuxième ( $F_{2,6}=99,58$  ;  $p<0,0001$ ), la troisième ( $F_{2,6}=92,17$  ;  $p<0,0001$ ) et la quatrième semaine de traitement ( $F_{2,6}=152,9$  ;  $p<0,0001$ ), 2 groupes ont été identifiés, le premier est représenté par les témoins, et le second par le NPK et le TSP.

**Tableau 24.** Classement par ordre décroissant du taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	0,60	a	0,006
	NPK D1	0,58	a	
	TSP D1	0,57	b	
Semaine 2	Témoins	0,61	a	0,0001
	TSP D1	0,56	b	
	NPK D1	0,56	b	
Semaine 3	Témoins	0,62	a	<0,0001
	TSP D1	0,55	b	
	NPK D1	0,53	b	
Semaine 4	Témoins	0,61	a	<0,0001
	NPK D1	0,55	b	
	TSP D1	0,55	b	

**Tableau 25.** Classement par ordre décroissant du taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	0,60	a	<0,0001
	TSP D2	0,57	b	
	NPK D2	0,56	c	
Semaine 2	Témoins	0,61	a	<0,0001
	TSP D2	0,55	b	
	NPK D2	0,55	b	
Semaine 3	Témoins	0,61	a	<0,0001
	TSP D2	0,55	b	
	NPK D2	0,55	b	
Semaine 4	Témoins	0,61	a	<0,0001
	TSP D2	0,53	b	
	NPK D2	0,52	b	

#### 3.2.2.4. Efficacité comparée des traitements sur le taux du GSH chez les juvéniles

Un classement par ordre croissant du taux du GSH est mentionné dans le tableau 26. Les résultats mettent en évidence l'existence d'un seul groupe chez les traités à la Dose 1, après une et trois semaines de traitement ( $p > 0,05$ ). Tandis que, 2 groupes sont constatés pour la deuxième ( $F_{2,6}=6,45$  ;  $p=0,0320$ ) et la quatrième semaine ( $F_{2,6}=80,86$  ;  $p < 0,0001$ ), le premier composé des témoins, et le second formé des traités.

Pour les traités à la Dose 2, le classement relatif au taux du GSH (Tableau 27), a permis de mettre en évidence 2 groupes distincts après une semaine de traitement ( $F_{2,6}=14,77$  ;  $p=0,0048$ ) ; le premier se compose des témoins et traités par le TSP, et le second contient les traités par le NPK. A deux ( $F_{2,6}=34,6$  ;  $p=0,0005$ ), à trois ( $F_{2,6}=16,66$  ;  $p=0,0036$ ) et à quatre

semaines de traitement ( $F_{2,6}=27,02$  ;  $p=0,0010$ ), deux groupes ont été également identifiés ; le premier comporte les témoins et un second renferme les traités par le NPK et le TSP.

**Tableau 26.** Classement par ordre décroissant du taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	0,65	a	>0,05
	TSP D1	0,65	a	
	NPK D1	0,63	a	
Semaine 2	Témoins	0,66	a	0,0320
	TSP D1	0,62	b	
	NPK D1	0,61	b	
Semaine 3	Témoins	0,65	a	>0,05
	TSP D1	0,60	a	
	NPK D1	0,57	a	
Semaine 4	Témoins	0,65	a	<0,0001
	NPK D1	0,53	b	
	TSP D1	0,52	b	

**Tableau 27.** Classement par ordre décroissant du taux du GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	0,65	a	0,0048
	TSP D2	0,63	a	
	NPK D2	0,54	b	
Semaine 2	Témoins	0,66	a	0,0005
	TSP D2	0,56	b	
	NPK D2	0,53	b	
Semaine 3	Témoins	0,65	a	0,0036
	TSP D2	0,53	b	
	NPK D2	0,48	b	
Semaine 4	Témoins	0,65	a	0,0010
	TSP D2	0,49	b	
	NPK D2	0,45	b	

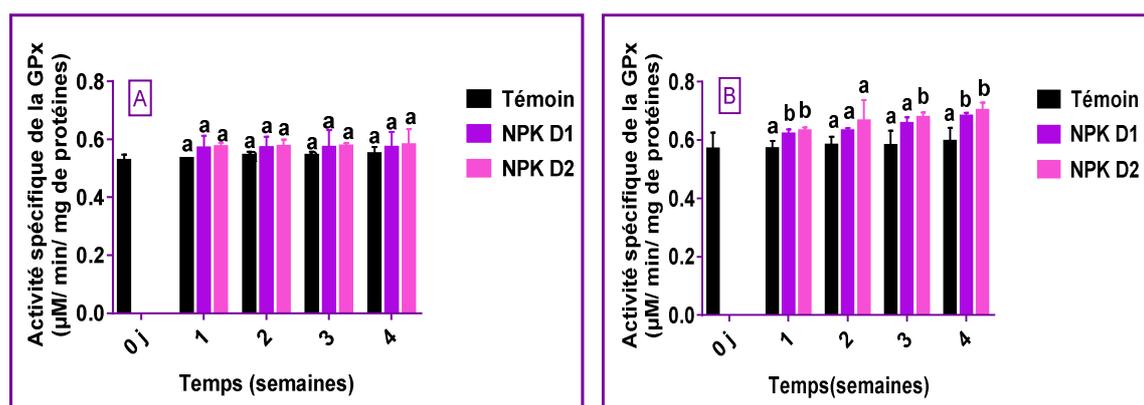
### 3.2.3. Activité de la GPx chez les adultes et les juvéniles

#### 3.2.3.1. Effet du NPK

L'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le NPK (D1 et D2), est mentionnée dans la figure 29 (A et B).

Le traitement des adultes ne provoque aucun effet ( $p>0,05$ ) sur ce biomarqueur au cours des périodes testées et avec les deux doses appliquées par rapport aux témoins.

Concernant les juvéniles, les résultats obtenus montrent une augmentation significative de l'activité spécifique de ce biomarqueur au cours de la semaine 1 ( $F_{2,6}=8,864$  ;  $p=0,0162$ ) et la semaine 4 ( $F_{2,6}=9,949$  ;  $p=0,0124$ ) après traitement avec les 2 doses appliquées. En ce qui concerne la semaine 3 ( $F_{2,6}=7,402$  ;  $p=0,0240$ ), cette augmentation significative est signalée après traitement avec la dose la plus forte. Tandis que, pour la semaine 2, aucune différence significative n'a été signalée ( $p>0,05$ ). Aucun effet dose n'a été signalé à tous les temps testés (D1 vs D2 : S1 :  $q=0,9591$  ; S3 :  $q=1,098$  ; S4 :  $q=1,136$ ).



**Figure 29.** Effet du NPK (D1 et D2) sur l'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

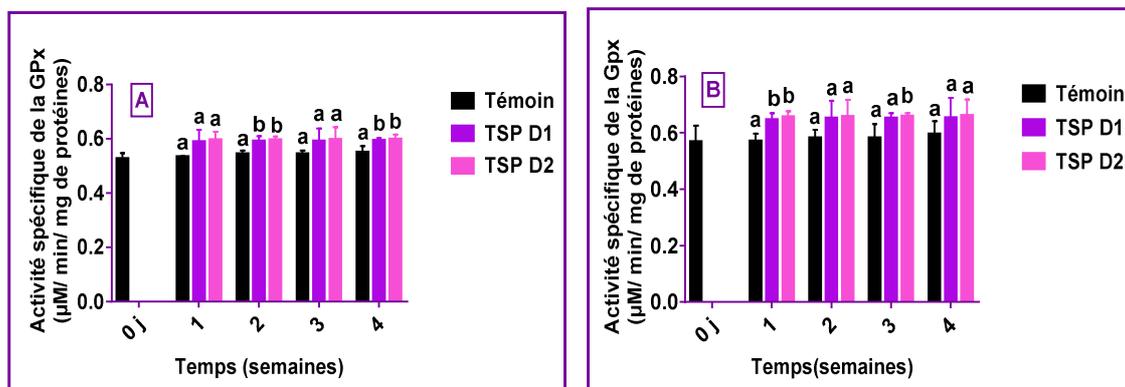
### 3.2.3.2. Effet du TSP

L'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le TSP (D1 et D2), est mentionnée dans la figure 30 (A et B).

Les résultats mentionnés dans la Figure 31A, montrent une augmentation significative de l'activité spécifique de ce biomarqueur chez les adultes traités avec les 2 doses appliquées, à 2 ( $F_{2,6}=12,63$  ;  $p=0,0071$ ), et 4 semaines de traitement ( $F_{2,6}=7,581$  ;  $p=0,0228$ ). Tandis qu'aucun effet n'a été signalé au cours de la première et la troisième semaine de traitement ( $p>0,05$ ). De plus, la comparaison par le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les doses testées (D1 vs D2 : S2 :  $q=0,5765$  ; S4 :  $q=0,4785$ ).

Les mêmes observations ont été constatées chez les juvéniles, où on a noté une induction du système de détoxification par l'application des deux doses du TSP, traduite par une augmentation de l'activité spécifique de la GPx et cela à une semaine ( $F_{2,6}=13,81$  ;  $p=0,0057$ ), et à 3 semaines de traitement ( $F_{2,6}=5,851$  ;  $p=0,0389$ ) avec la dose la plus forte. Tandis qu'aucun effet n'a été signalé au cours de la semaine 2 et 4 ( $p>0,05$ ). De plus, la comparaison

par le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les doses testées (D1 vs D2 : S1 :  $q=0,7837$  ; S3 :  $q=0,4155$ ).



**Figure 30.** Effet du TSP (D1 et D2) sur l'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.2.3.3. Efficacité comparée des traitements sur l'activité spécifique de la GPx chez les adultes

Le classement croissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1) (Tableau 28) a permis de mettre en évidence 1 seul groupe au cours de toutes les périodes testées, renfermant les témoins et les traités par le NPK et le TSP ( $p > 0,05$ ).

Concernant la Dose 2, le classement relatif à l'activité de la GPx (Tableau 29), a permis de mettre en évidence deux groupes pour la première semaine ( $F_{3,8}=15,85$  ;  $p=0,0010$ ) et la deuxième semaine ( $F_{3,8}=16,88$  ;  $p=0,0008$ ), le premier groupe contient les témoins et les traités par le NPK et un second constitué par les traités avec le TSP. Pour la troisième et la quatrième semaine, un seul groupe de moyennes a été constaté ( $p > 0,05$ ).

**Tableau 28.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	0,53	a	>0,05
	NPK D1	0,57	a	
	TSP D1	0,59	a	
Semaine 2	Témoins	0,54	a	0,037
	NPK D1	0,57	a	
	TSP D1	0,59	a	
Semaine 3	Témoins	0,54	a	>0,05
	NPK D1	0,57	a	
	TSP D1	0,59	a	
Semaine 4	Témoins	0,55	a	>0,05
	NPK D1	0,57	a	

TSP D1	0,59	a
--------	------	---

**Tableau 29.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	0,53	a	0,001
	NPK D2	0,58	a	
	TSP D2	0,60	b	
Semaine 2	Témoins	0,54	a	0,008
	NPK D2	0,58	a	
	TSP D2	0,60	b	
Semaine 3	Témoins	0,54	a	0,010
	NPK D2	0,58	a	
	TSP D2	0,60	a	
Semaine 4	Témoins	0,55	a	0,039
	NPK D2	0,58	a	
	TSP D2	0,60	a	

#### 3.2.3.4. Efficacité comparée des engrais sur l'activité spécifique de la GPx chez les juvéniles

Le classement croissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1) (Tableau 30) a permis de mettre en évidence 1 groupe de moyennes au cours de la première, la deuxième, et la quatrième semaine de traitement ( $p > 0,05$ ). Par contre à 3 semaines après traitement, on constate 2 groupes de moyennes ( $F_{2,6} = 6.373$ ,  $p = 0.0163$ , le premier formé par les témoins et les traités par le TSP et un second constitué des traités par le NPK).

Concernant les traités à la Dose 2, le classement relatif à l'activité de GPx (Tableau 31), a permis d'identifier 1 seul groupe de moyennes à tous les temps testés ( $p > 0,05$ ).

**Tableau 30.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	0,57	a	$>0,05$
	NPK D1	0,62	a	
	TSP D1	0,65	a	
Semaine 2	Témoins	0,58	a	$>0,05$
	NPK D1	0,63	a	
	TSP D1	0,65	a	
Semaine 3	Témoins	0,58	a	0,0163
	TSP D1	0,65	a	
	NPK D1	0,66	b	
Semaine 4	Témoins	0,60	a	$>0,05$
	TSP D1	0,65	a	
	NPK D1	0,68	a	

**Tableau 31.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la GPx ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	0,57	a	>0,05
	NPK D2	0,63	a	
	TSP D2	0,66	a	
Semaine 2	Témoins	0,58	a	>0,05
	TSP D2	0,66	a	
	NPK D2	0,67	a	
Semaine 3	Témoins	0,58	a	0,0259
	TSP D2	0,66	a	
	NPK D2	0,68	a	
Semaine 4	Témoins	0,60	a	>0,05
	TSP D2	0,66	a	
	NPK D2	0,70	a	

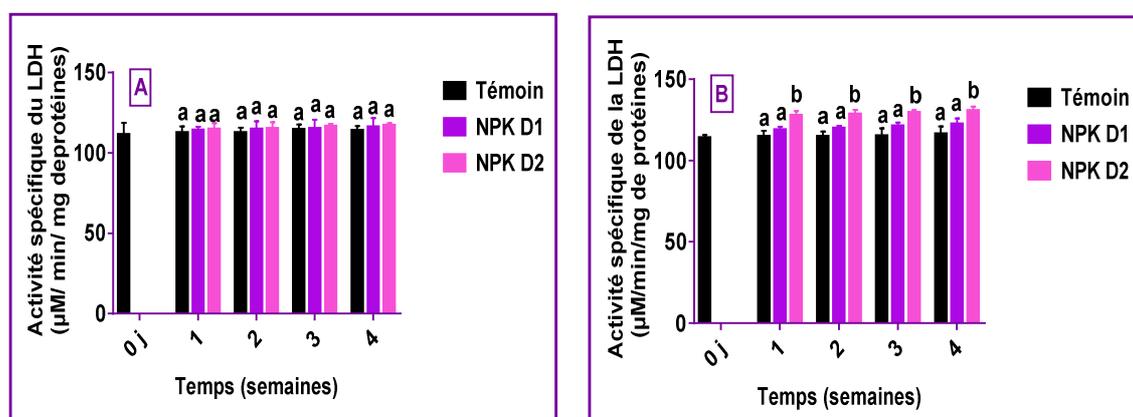
### 3.2.4. Activité de la LDH chez les adultes et les juvéniles

#### 3.2.4.1. Effet du NPK

L'activité spécifique de la lactate déshydrogénase (LDH) ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le NPK (D1 et D2), est mentionnée dans la figure 31 (A et B).

Les résultats obtenus chez les adultes ne montrent aucun effet traitement sur ce biomarqueur avec les deux doses appliquées au cours de toute la période testée ( $p > 0,05$ ).

Concernant les juvéniles, les résultats montrent une augmentation significative de l'activité de la LDH à une semaine ( $F_{2,6}=19$  ;  $p=0,0025$ ), à 2 ( $F_{2,6}=24,96$  ;  $p=0,0012$ ), à 3 ( $F_{2,6}=17,78$  ;  $p=0,0030$ ) et à 4 semaines ( $F_{2,6}=13,38$  ;  $p=0,0061$ ) après traitement avec la dose la plus forte.

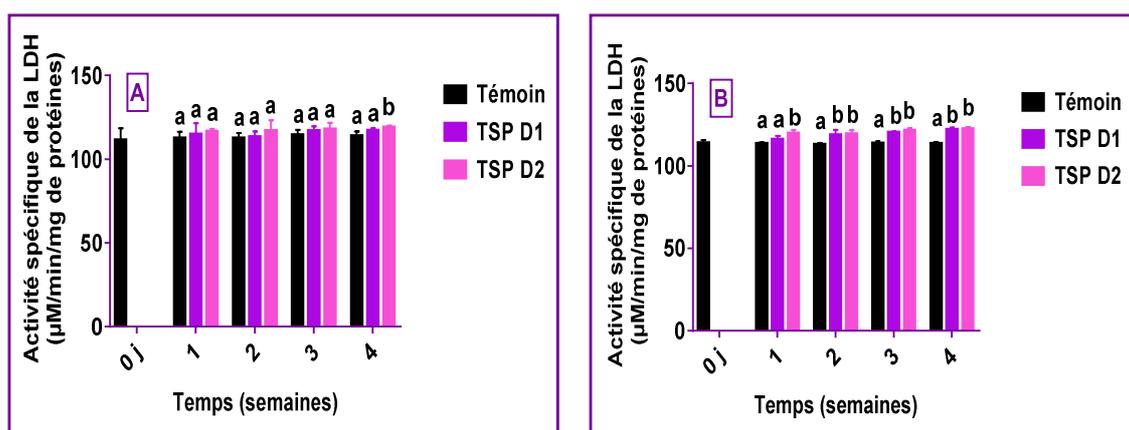


**Figure 31.** Effet du NPK (D1 et D2) sur l'activité spécifique de la LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.2.4.2. Effet du TSP

L'activité spécifique de la LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le TSP (D1 et D2), est montrée dans la figure 32 (A et B). Concernant les adultes, le traitement a induit une augmentation significative de l'activité spécifique de ce biomarqueur après traitement avec la dose la plus forte à 4 semaines ( $F_{2,6}=7,064$  ;  $p=0,0265$ ). Tandis qu'aucune différence n'a été signalée au cours de la première, la deuxième et la troisième semaine de traitement ( $p>0,05$ ).

Pour les juvéniles, les résultats montrent une augmentation significative de l'activité spécifique du LDH après traitement avec la dose la plus forte à 1 semaine ( $F_{2,6}=13,07$  ;  $p=0,0065$ ), à 2 ( $F_{2,6}=7,765$  ;  $p=0,0216$ ), 3 ( $F_{2,6}=67,16$  ;  $p<0,0001$ ) et à 4 semaines ( $F_{2,6}=90,96$  ;  $p<0,0001$ ) après traitement avec les deux doses appliquées. Par ailleurs, la comparaison par le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les doses testées (D1 vs D2 : S2 :  $q=0,4272$  ; S3 :  $q=1,887$  ; S4 :  $q=0,9454$ ).



**Figure 32.** Effet du TSP (D1 et D2) sur l'activité spécifique de la LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.2.4.3. Efficacité comparée des traitements sur l'activité spécifique de la LDH chez les adultes

Le classement croissant des valeurs moyennes concernant la dose 1 et la dose 2 (Tableaux 32 et 33) a permis de mettre en évidence un seul groupe constitué des témoins et des traités (NPK et TSP) au cours des périodes testées ( $p>0,05$ ) et cela aussi bien chez les adultes que chez les juvéniles, sauf à 4 mois de traitement par le TSP avec la plus forte dose chez les adultes, où on a noté 2 groupes de moyennes, un groupe formé des témoins et des traités par le NPK et un second constitué des traités par le TSP.

**Tableau 32.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	112,64	a	>0,05
	NPK D1	114,33	a	
	TSP D1	115,02	a	
Semaine 2	Témoins	112,67	a	>0,05
	NPK D1	114,99	a	
	TSP D1	113,41	a	
Semaine 3	Témoins	114,67	a	>0,05
	NPK D1	115,24	a	
	TSP D1	117,02	a	
Semaine 4	Témoins	114,01	a	>0,05
	NPK D1	116,21	a	
	TSP D1	117,28	a	

**Tableau 33.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique du LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	112,64	a	>0,05
	NPK D2	114,99	a	
	TSP D2	116,79	a	
Semaine 2	Témoins	112,67	a	>0,05
	NPK D2	115,32	a	
	TSP D2	117,23	a	
Semaine 3	Témoins	114,67	a	>0,05
	NPK D2	116,53	a	
	TSP D2	118,01	a	
Semaine 4	Témoins	114,01	a	0,032
	NPK D2	117,21	a	
	TSP D2	119,23	b	

#### 3.2.4.4. Efficacité comparée des traitements sur l'activité spécifique de la LDH chez les juvéniles

Le classement croissant des valeurs moyennes concernant les traités à la première dose (D1) (Tableau 34) a permis de mettre en évidence un seul groupe constitué des témoins et des deux traités (NPK et TSP) au cours des périodes testées ( $p > 0,05$ ).

Concernant les traités à la Dose 2, le classement relatif à l'activité spécifique de la LDH (Tableau 35), a permis de mettre en évidence 2 groupes de moyennes pour la première ( $F_{3,8}=6,526$  ;  $p=0,0153$ ), la deuxième ( $F_{3,8}=16,29$  ;  $p=0,0009$ ), la troisième ( $F_{3,8}=13,42$  ;  $p=0,0017$ ) et la quatrième semaine de traitement ( $F_{3,8}=16,63$  ;  $p=0,0008$ ), le premier groupe

composé des témoins et des traités avec le TSP et le deuxième groupe renferme les traités par le NPK.

**Tableau 34.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	114,78	a	>0,05
	TSP D1	117,66	a	
	NPK D1	119,03	a	
Semaine 2	Témoins	114,78	a	>0,05
	TSP D1	118,89	a	
	NPK D1	120,12	a	
Semaine 3	Témoins	115,32	a	>0,05
	TSP D1	120,59	a	
	NPK D1	121,37	a	
Semaine 4	Témoins	116,44	a	>0,05
	TSP D1	120,80	a	
	NPK D1	122,59	a	

**Tableau 35.** Classement par ordre croissant de l'activité spécifique de la LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	114,78	a	0,0153
	TSP D2	118,56	a	
	NPK D2	127,78	b	
Semaine 2	Témoins	114,78	a	0,0009
	TSP D2	119,42	a	
	NPK D2	128,60	b	
Semaine 3	Témoins	115,32	a	0,0017
	TSP D2	121,54	a	
	NPK D2	129,59	b	
Semaine 4	Témoins	116,44	a	0,0008
	TSP D2	122,30	a	
	NPK D2	130,86	b	

### 3.3. Effet des engrais chimiques sur la composition biochimique des vers de terre

#### 3.3.1. Effet sur le taux de protéines totales chez les adultes et les juvéniles

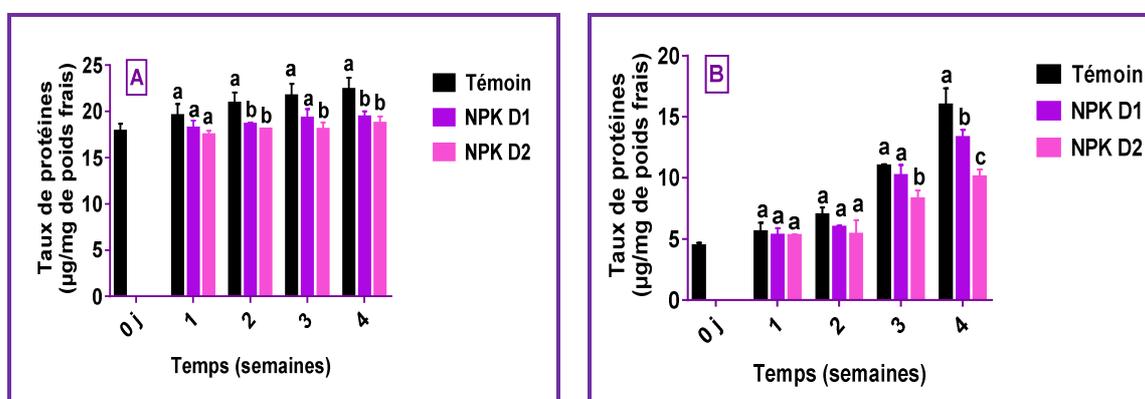
##### 3.3.1.1. Effet du NPK

Le taux de protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes et les juvéniles d'*A. caliginosa* traités avec le NPK (D1 et D2), est mentionné dans la figure 33 (A et B).

Concernant les adultes, les résultats révèlent une diminution significative de ce contenu à 2 semaines ( $F_{2,6}=14,71$  ;  $p=0,0049$ ) et 4 semaines de traitement ( $F_{2,6}=14,35$  ;  $p=0,0052$ ) avec les

deux doses appliquées. Une diminution significative a été également signalée après traitement avec la forte dose à la troisième semaine ( $F_{2,6}=9,724$  ;  $p=0,0131$ ). Concernant la première semaine, aucun effet n'a été signalé pour les deux doses appliquées.

En ce qui concerne les juvéniles, les résultats montrent une diminution significative du taux de protéines totales après traitement avec la dose la plus forte pour la semaine 3 ( $F_{2,6}=13,48$  ;  $p=0,0060$ ), et avec les deux doses pour la semaine 4 ( $F_{2,6}=29,16$  ;  $p=0,0008$ ). Par contre, aucun effet n'a été signalé à la première et la deuxième semaine pour les deux doses appliquées ( $p>0,05$ ). De plus, la comparaison par le Test HSD de Tukey révèle un effet dose à 4 semaines de traitement (D1 vs D2 : S4 :  $p=0,0141$ ).



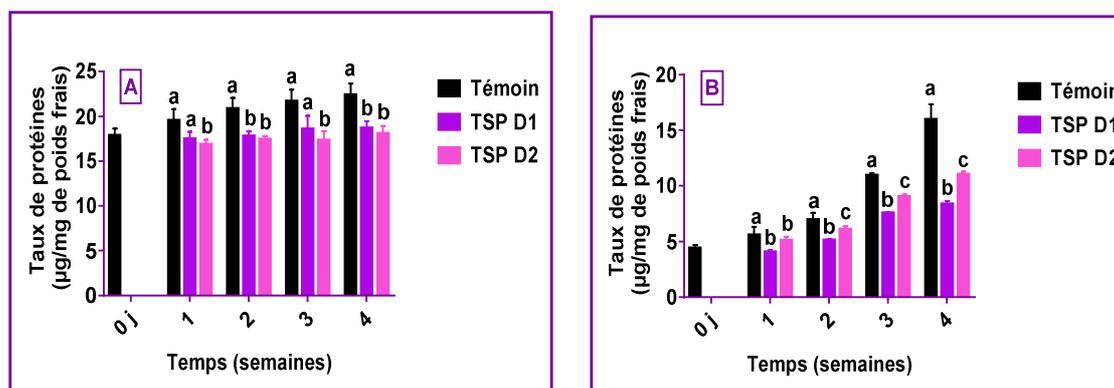
**Figure 33.** Effet du NPK (D1 et D2) sur le taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.3.1.2. Effet du TSP

Le taux de protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéines) chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le TSP (D1 et D2), est présenté dans la figure 34 (A et B).

Concernant les adultes d'*A. caliginosa*, les résultats montrent une diminution significative après 2 semaines ( $F_{2,6}=19,14$  ;  $p=0,0025$ ) et 4 semaines de traitement ( $F_{2,6}=24,2$  ;  $p=0,0013$ ) avec les deux doses (D1 et D2). En ce qui concerne la première semaine ( $F_{2,6}=7,63$  ;  $p=0,0225$ ) et la troisième semaine de traitement ( $F_{2,6}=9,335$  ;  $p=0,0144$ ), le taux de protéines subit une diminution significative après traitement avec la dose la plus forte par rapport aux témoins. Par ailleurs, la comparaison par le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les doses testées (D1 vs D2 : S2 :  $q=1,192$  ; S2 :  $q=0,8206$  ; S3 :  $q=1,7$  ; S4 :  $q=1,79$ ).

Les mêmes observations ont été constatées chez les juvéniles, où on a noté une diminution du taux de protéines totales et cela à tous les temps testés : semaine 1 ( $F_{2,6}=8,644$  ;  $p=0,0171$ ), semaine 2 ( $F_{2,6}=17,83$  ;  $p=0,0030$ ), semaine 3 ( $F_{2,6}=478,9$  ;  $p<0,0001$ ) et semaine 4 ( $F_{2,6}=65,9$  ;  $p<0,0001$ ) de traitement. De plus, la comparaison par le Test HSD de Tukey révèle un effet dose (D1 vs D2 : S2 :  $p=0,0423$  ; S3 :  $p<0,0001$  ; S4 :  $p=0,0176$ ).



**Figure 34.** Effet du TSP (D1 et D2) sur le taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.3.1.3. Efficacité comparée des traitements sur le taux de protéines chez les adultes

Le classement décroissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1) (Tableau 36) a permis d'identifier 1 seul groupe au cours de la première semaine ( $p>0,05$ ) ; renfermant toutes les séries. Concernant la deuxième semaine ( $F_{3,8}=16,68$  ;  $p=0,0008$ ), deux groupes ont été identifiés ; le premier constitué des témoins seuls et le second groupe renferme les deux traitements (NPK et TSP). A 3 ( $F_{3,8}=6,515$  ;  $p=0,0153$ ) et à 4 semaines de traitement ( $F_{3,8}=9,826$  ;  $p=0,0047$ ), deux groupes de moyennes ont été également identifiés, un groupe formé des témoins et des traités par le NPK et un second groupe composé des traités au TSP.

Concernant les traités à la Dose 2, le classement décroissant (Tableau 37), a permis de mettre en évidence 2 groupes de moyennes à tous les temps testés : semaine 1 ( $F_{3,8}=11,83$  ;  $p=0,0026$ ), semaine 2 ( $F_{3,8}=4,909$  ;  $p=0,0320$ ), semaine 3 ( $F_{3,8}=15,75$  ;  $p=0,0010$ ) et semaine 4 de traitement ( $F_{3,8}=18,5$  ;  $p=0,0006$ ) ; le premier groupe englobe les témoins seuls et le second renferme les traités par le NPK et le TSP. Aucun effet dose n'a été enregistré au cours des périodes étudiées.

**Tableau 36.** Classement par ordre décroissant du taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu frais), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	19,58	a	<0,05
	NPK D1	18,21	a	
	TSP D1	17,49	a	
Semaine 2	Témoins	20,92	a	0,0008
	NPK D1	18,65	b	
	TSP D1	17,82	b	
Semaine 3	Témoins	21,69	a	0,015
	NPK D1	19,31	a	
	TSP D1	18,60	b	
Semaine 4	Témoins	22,41	a	0,004
	NPK D1	19,45	a	
	TSP D1	18,72	b	

**Tableau 37.** Classement par ordre décroissant du taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	19,58	a	0,002
	NPK D2	17,50	b	
	TSP D2	16,88	b	
Semaine 2	Témoins	20,92	a	0,0001
	NPK D2	18,11	b	
	TSP D2	17,46	b	
Semaine 3	Témoins	21,69	a	0,001
	NPK D2	18,07	b	
	TSP D2	17,36	b	
Semaine 4	Témoins	22,41	a	0,0006
	NPK D2	18,75	b	
	TSP D2	18,12	b	

#### 3.3.1.4. Efficacité comparée des traitements sur le taux de protéines chez les juvéniles

Le classement décroissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1) (Tableau 38) réalisé grâce au test HSD de Tukey, a permis d'identifier 2 groupes au cours de la première ( $F_{3,8}=7,393$  ;  $p=0,0108$ ) et la troisième semaine de traitement ( $F_{3,8}=38,22$  ;  $p<0,0001$ ) ; dont le premier groupe renferme les témoins et les traités par le NPK et le second contient les traités par le TSP. Deux groupes sont également constatés pour la semaine 2 ( $F_{3,8}=27,2$  ;  $p=0,0002$ ), un groupe constitué des témoins seuls, et le second comprend les traités par le NPK et le TSP. Par contre à quatre semaines de traitement ( $F_{3,8}=73,36$  ;  $p<0,0001$ ), 3 groupes sont signalés, chacun étant constitué d'une série.

Concernant les traités à la Dose 2, le classement décroissant (Tableau 39), a permis de mettre en évidence un seul groupe de moyennes pour la première et la deuxième semaine de

traitement, renfermant les témoins et les traités ( $p>0,05$ ). Concernant la troisième semaine ( $F_{3,8}=28,16$  ;  $p=0,0001$ ) ; trois groupes sont enregistrés, chacun étant constitué d'une série. A 4 semaines de traitement ( $F_{3,8}=44,5$  ;  $p<0,0001$ ) ; 2 groupes sont signalés, un groupe témoin seul, et un second groupe renfermant les deux traitements.

**Tableau 38.** Classement par ordre décroissant du taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	5,61	a	0,0108
	NPK D1	5,31	a	
	TSP D1	4,09	b	
Semaine 2	Témoins	6,98	a	0,0002
	NPK D1	5,97	b	
	TSP D1	5,15	b	
Semaine 3	Témoins	10,97	a	<0,0001
	NPK D1	10,20	a	
	TSP D1	7,57	b	
Semaine 4	Témoins	15,97	a	<0,0001
	NPK D1	13,30	b	
	TSP D1	8,39	c	

**Tableau 39.** Classement par ordre décroissant du taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	5,61	a	>0,05
	NPK D2	5,28	a	
	TSP D2	4,70	a	
Semaine 2	Témoins	6,98	a	>0,05
	NPK D2	5,40	a	
	TSP D2	6,30	a	
Semaine 3	Témoins	10,97	a	0,0001
	NPK D2	8,29	b	
	TSP D2	7,75	c	
Semaine 4	Témoins	10,97	a	<0,0001
	NPK D2	8,29	b	
	TSP D2	7,75	b	

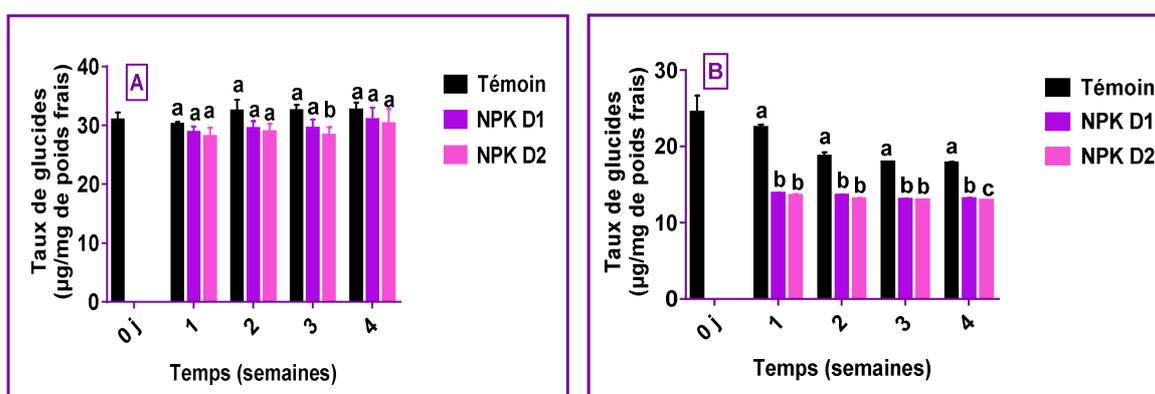
### 3.3.2. Effet sur le taux de glucides totaux chez les adultes et les juvéniles

#### 3.3.2.1. Effet du NPK

Le taux de glucides chez les juvéniles et les adultes d'*A. caliginosa* traités avec le NPK (D1 et D2), est mentionnée dans la figure 35 (A et B).

Concernant les adultes, les résultats obtenus montrent une diminution significative du contenu en glucides seulement à 3 semaines de traitement et avec la dose la plus forte ( $F_{2,6}=11,89$  ;  $p=0,0082$ ). Tandis qu'aucun effet n'a été signalé au cours de la première, la deuxième et la quatrième semaine de traitement avec les deux doses appliquées ( $p>0,05$ ).

Pour les juvéniles, les résultats mentionnés dans la figure 35B montrent une diminution significative du contenu en glucides totaux après traitement avec les deux doses du NPK et cela pour la semaine 1 ( $F_{2,6}=1247$  ;  $p<0,0001$ ), la semaine 2 ( $F_{2,6}=324,3$  ;  $p<0,0001$ ), la semaine 3 ( $F_{2,6}=28509$  ;  $p<0,0001$ ) et la semaine 4 ( $F_{2,6}=4218$  ;  $p<0,0001$ ). Par ailleurs, un effet dose a été signalé seulement à 4 semaines de traitement (D1 vs D2 : S4 :  $p=0,0350$ ).



**Figure 35.** Effet du NPK (D1 et D2) sur le taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

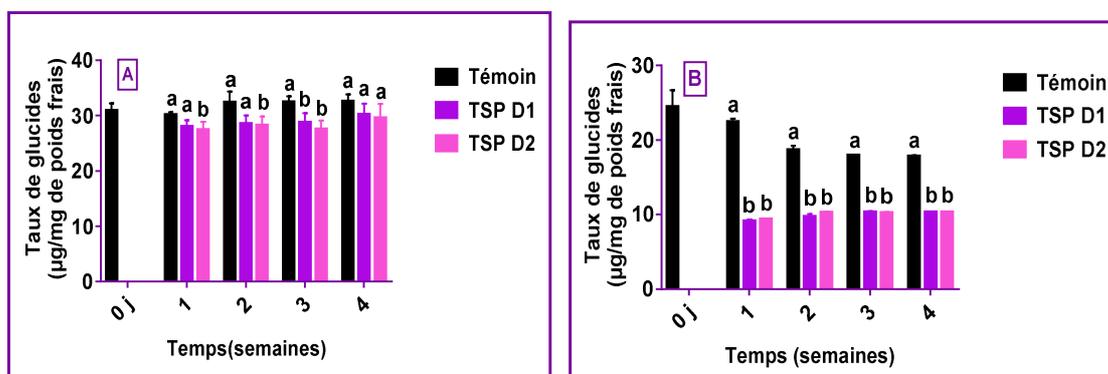
### 3.3.2.2. Effet du TSP

Le taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes et les juvéniles d'*A. caliginosa* traités avec le TSP (D1 et D2), est mentionnée dans la figure 36 (A et B).

Les résultats chez les adultes montrent une diminution significative après traitement avec la dose la plus forte, à la première ( $F_{2,6}=5,441$  ;  $p=0,0449$ ) et la deuxième semaine ( $F_{2,6}=5,935$  ;  $p=0,0378$ ). A 3 semaines de traitement, les deux doses appliquées affectent ce composé biochimique ( $F_{2,6}=9,875$  ;  $p=0,0127$ ). Tandis qu'aucun effet n'a été signalé à 4 semaines de traitement ( $p>0,05$ ).

Concernant les juvéniles, les résultats révèlent une diminution significative du taux de ce composé énergétique après traitement avec les deux doses testées à 1 ( $F_{2,6}=27,87$  ;  $p<0,0001$ ), 2 ( $F_{2,6}=674,9$  ;  $p<0,0001$ ), 3 ( $F_{2,6}=23550$  ;  $p<0,0001$ ) et 4 semaines ( $F_{2,6}=12698$  ;

$p < 0,0001$ ). Par ailleurs, la comparaison par le Test HSD de Tukey, ne révèle aucun effet dose (D1 vs D2 : S1 :  $q = 1,736$  ; S2 :  $q = 2,825$  ; S3 :  $q = 2,895$  ; S4 :  $q = 0,01734$ ).



**Figure 36.** Effet du TSP (D1 et D2) sur le taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.3.2.3. Efficacité comparée des traitements sur le taux de glucides chez les adultes

Le classement décroissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1) (Tableau 40) réalisé grâce au test HSD de Tukey, a permis d'identifier 2 groupes au cours de la deuxième ( $F_{3,8}=5,885$  ;  $p=0,0204$ ) et la troisième semaine de traitement ( $F_{3,8}=6,775$  ;  $p=0,0138$ ), le premier constitué des témoins et des traités par le NPK et le second groupe renferme les traités par le TSP. Par contre, un seul groupe constitué des témoins et des traités a été enregistrée au cours de la première et la quatrième semaine ( $p > 0,05$ ).

Concernant les traités à la Dose 2, le classement décroissant (Tableau 41), a permis de mettre en évidence un seul groupe de moyennes au cours de la première et la quatrième semaine ( $p > 0,05$ ). Concernant la semaine 2 ( $F_{3,8}=6,683$  ;  $p=0,0143$ ), 2 groupes de moyennes ont été identifiés ; le premier constitué des témoins et des traités par le NPK et le second groupe renferme les traités par le TSP. Pour la semaine 3 ( $F_{3,8}=11,01$  ;  $p=0,0033$ ), deux groupes ont également été constatés, un groupe formé des témoins seuls et un second groupe constitué des traités par le NPK et le TSP.

**Tableau 40.** Classement par ordre décroissant du taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu frais), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	30,18	a	0,018
	NPK D1	28,81	a	
	TSP D1	28,09	a	
Semaine 2	Témoins	32,46	a	0,020
	NPK D1	29,46	a	
	TSP D1	28,63	b	
Semaine 3	Témoins	32,50	a	0,013
	NPK D1	29,55	a	
	TSP D1	28,84	b	
Semaine 4	Témoins	32,65	a	>0,05
	NPK D1	30,99	a	
	TSP D1	30,26	a	

**Tableau 41.** Classement par ordre décroissant du taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	30,18	a	0,010
	NPK D2	28,10	a	
	TSP D2	27,48	a	
Semaine 2	Témoins	32,46	a	0,014
	NPK D2	28,93	a	
	TSP D2	28,27	b	
Semaine 3	Témoins	32,50	a	0,003
	NPK D2	28,30	b	
	TSP D2	27,60	b	
Semaine 4	Témoins	32,65	a	>0,05
	NPK D2	30,29	a	
	TSP D2	29,66	a	

#### 3.3.2.4. Efficacité comparée des traitements sur le taux de glucides chez les juvéniles

Le classement par ordre décroissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1) réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier 3 groupes à une semaine ( $F_{3,8}=1107$  ;  $p<0,0001$ ), à 2 semaines ( $F_{3,8}=55,14$  ;  $p<0,0001$ ), à 3 semaines ( $F_{3,8}=23269$  ;  $p<0,0001$ ) et à 4 semaines de traitement ( $F_{3,8}=3870$  ;  $p<0,0001$ ) ; chacun étant constitué d'une série (Tableau 42).

Les mêmes observations ont été signalées chez les traités à la Dose 2, où on a noté également 3 groupes de moyennes, à la semaine 1 ( $F_{3,8}= 1721$  ;  $p<0,0001$ ), la semaine 2 ( $F_{3,8}= 1124$  ;  $p<0,0001$ ), la semaine 3 ( $F_{3,8}= 1068$  ;  $p<0,0001$ ) et la semaine 4 de traitement ( $F_{3,8}= 10677$  ;  $p<0,0001$ ), chacun étant constitué d'un traitement (Tableau 43).

**Tableau 42.** Classement par ordre décroissant du taux de glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	22,48	a	<0,0001
	NPK D1	13,89	b	
	TSP D1	9,19	c	
Semaine 2	Témoins	18,74	a	<0,0001
	NPK D1	13,62	b	
	TSP D1	9,79	c	
Semaine 3	Témoins	17,99	a	<0,0001
	NPK D1	13,09	b	
	TSP D1	10,38	c	
Semaine 4	Témoins	17,87	a	<0,0001
	NPK D1	13,16	b	
	TSP D1	10,36	c	

**Tableau 43.** Classement par ordre décroissant du taux glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	22,48	a	<0,0001
	NPK D2	13,60	b	
	TSP D2	9,44	c	
Semaine 2	Témoins	18,74	a	<0,0001
	NPK D2	13,12	b	
	TSP D2	10,33	c	
Semaine 3	Témoins	17,99	a	<0,0001
	NPK D2	13,02	b	
	TSP D2	10,30	c	
Semaine 4	Témoins	17,87	a	<0,0001
	NPK D2	12,96	b	
	TSP D2	10,36	c	

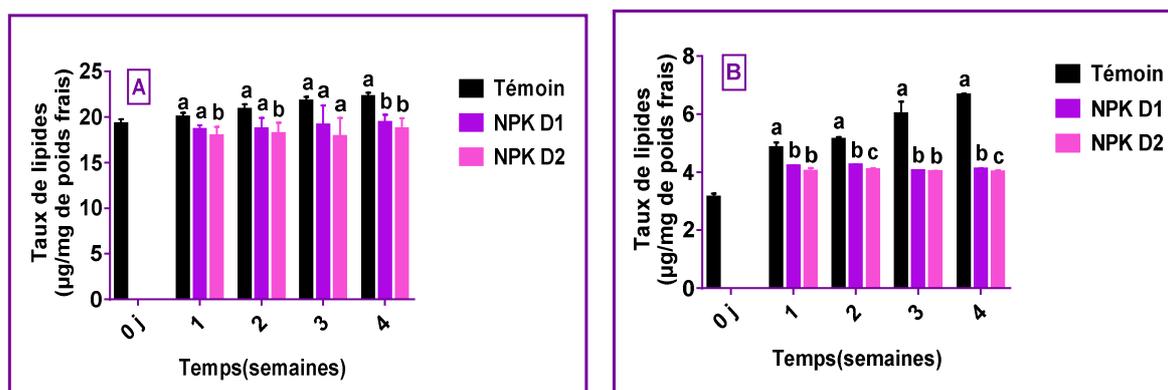
### 3.3.3. Effet sur le taux de lipides totaux chez les adultes et les juvéniles

#### 3.3.3.1. Effet du NPK

Le profil du taux de lipides totaux chez les adultes et les juvéniles d'*A. caliginosa* traités avec le NPK (D1 et D2), est mentionné dans la figure 37 (A et B).

Concernant les adultes, les résultats montrent une diminution significative après 1 semaine ( $F_{2,6}=7,138$  :  $p=0,0259$ ) et 2 semaines ( $F_{2,6}=5,906$  :  $p=0,0382$ ) de traitement avec la dose la plus forte. Par ailleurs, une diminution significative a été signalée après traitement avec les deux doses appliquées à la quatrième semaine ( $F_{2,6}=14,16$  :  $p=0,0053$ ). Aucun effet traitement n'a été signalé à 3 semaines de traitement ( $p>0,05$ ).

Pour les juvéniles, les résultats montrent une diminution significative après 1 semaine ( $F_{2,6}=38,36$  :  $p=0,0004$ ), 2 semaines ( $F_{2,6}=363,1$  :  $p<0,0001$ ), 3 semaines ( $F_{2,6}=69,09$  :  $p<0,0001$ ) et 4 semaines ( $F_{2,6}=4609$  :  $p<0,0001$ ) après traitement avec les deux doses appliquées. Par ailleurs, un effet dose a été constaté au cours de la semaine 2 et la semaine 4 (D1 vs D2 : S2 :  $p=0,0151$  ; S4 :  $p=0,0493$ ).

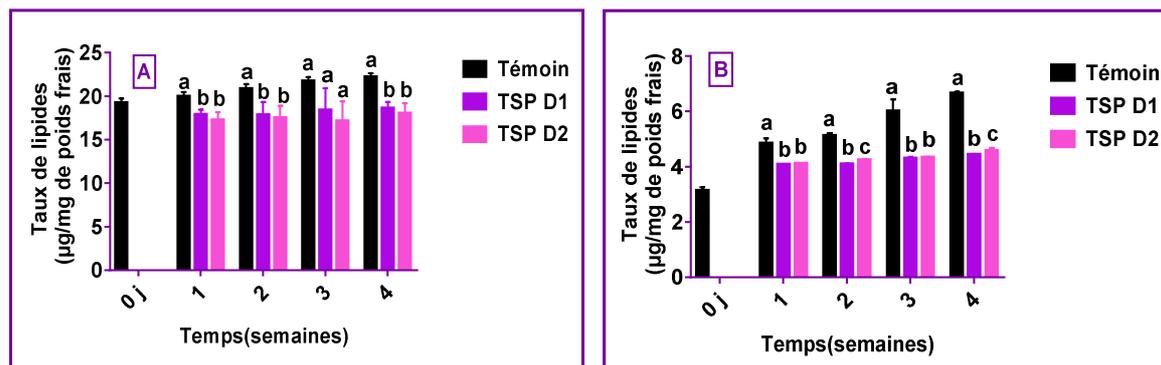


**Figure 37.** Effet du NPK (D1 et D2) sur le taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.3.3.2. Effet du TSP

Le taux de lipides totaux chez les adultes et les juvéniles d'*A. caliginosa* traités avec le TSP (D1 et D2), est mentionnée dans la figure 38 (A et B). Concernant les adultes, les résultats montrent une diminution significative après 1 ( $F_{2,6}=14,02$  ;  $p=0,0055$ ), 2 ( $F_{2,6}=7,224$  ;  $p=0,0253$ ), et 4 semaines ( $F_{2,6}=24,5$  ;  $p=0,0013$ ) après traitement avec les deux doses testées. Aucun effet n'a été signalé à 3 semaines de traitement. Par ailleurs, la comparaison par le Test HSD de Tukey, ne révèle aucune différence entre les doses testées (D1 vs D2 : S1 :  $q=0,615$  ; S2 :  $q=0,5243$  ; S4 :  $q=1,318$ ).

Chez les juvéniles, ce taux marque une diminution significative à la semaine 1 ( $F_{2,6}=54,13$  :  $p=0,0001$ ), la semaine 2 ( $F_{2,6}=428,4$  ;  $p<0,0001$ ), la semaine 3 ( $F_{2,6}=49,91$  ;  $p=0,0002$ ) et la semaine 4 ( $F_{2,6}=1563$  ;  $p<0,0001$ ) après traitement avec les deux doses appliquées. Par ailleurs, un effet dose a été constaté au cours de la deuxième et la quatrième semaine de traitement (D1 vs D2 : S2 :  $p=0,0237$  ; S4 :  $p=0,0318$ ).



**Figure 38.** Effet du TSP (D1 et D2) sur le taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais) chez les adultes (A) et les juvéniles (B) d'*A. caliginosa* ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  pools contenant chacun 50 mg de tissu frais) : Test HSD de Tukey.

### 3.3.3.3. Efficacité comparée des traitements sur le taux de lipides chez les adultes

Le classement par ordre décroissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1) réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier 2 groupes à une semaine ( $F_{3,8}=19,55$  :  $p=0,0005$ ) et à deux semaines de traitement ( $F_{3,8}=6,582$  :  $p=0,0149$ ), le premier renferme les témoins et les traités par le NPK et le second constitué des traités par le TSP. Pour la quatrième semaine ( $F_{3,8}=27,6$  :  $p=0,0001$ ) deux groupes ont été constatés également, le premier groupe formé des témoins seuls, et un second groupe composé des traités par le NPK et le TSP. Tandis qu'aucun effet traitement n'a été signalé au cours de la troisième semaine ( $p>0,05$ ) (Tableau 44).

Concernant les traités à la Dose 2, le classement relatif aux taux de lipides (Tableau 45), a permis d'identifier 2 groupes de moyennes à une semaine ( $F_{3,8}=18,43$  :  $p=0,0006$ ) et quatre semaines de traitement ( $F_{3,8}=22,91$  :  $p=0,0003$ ), le premier groupe renferme les témoins seuls, et le second groupe composé des traités avec le NPK et le TSP. Concernant la deuxième semaine ( $F_{3,8}=9,37$  :  $p=0,0054$ ) deux groupes sont également constatés, un groupe témoins et traités avec le NPK, et un second formé des traités avec le TSP. La troisième semaine ( $p>0,05$ ) est formée d'un seul groupe renfermant les témoins et les traités.

**Tableau 44.** Classement par ordre décroissant du taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu frais), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 1 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	20,00	a	0,0005
	NPK D1	18,63	a	
	TSP D1	17,92	b	
Semaine 2	Témoins	20,87	a	0,014
	NPK D1	18,72	a	
	TSP D1	18,19	b	
Semaine 3	Témoins	21,77	a	>0,05
	NPK D1	19,13	a	
	TSP D1	17,89	a	
Semaine 4	Témoins	22,23	a	0,0001
	NPK D1	19,40	b	
	TSP D1	18,70	b	

**Tableau 45.** Classement par ordre décroissant du taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	20,00	a	0,0006
	NPK D2	17,92	b	
	TSP D2	17,30	b	
Semaine 2	Témoins	20,87	a	0,005
	NPK D2	18,19	a	
	TSP D2	17,54	b	
Semaine 3	Témoins	21,77	a	0,028
	NPK D2	17,89	a	
	TSP D2	17,18	a	
Semaine 4	Témoins	22,23	a	0,0003
	NPK D2	18,70	b	
	TSP D2	18,07	b	

#### 3.3.3.4. Efficacité comparée des traitements sur le taux de lipides chez les juvéniles

Le classement par ordre décroissant des valeurs moyennes concernant la première dose (D1) réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier un seul groupe à une semaine ( $p > 0,05$ ). Pour la semaine 2 ( $F_{3,8}=15,79$  ;  $p=0,0001$ ) et la semaine 3 ( $F_{3,8}=43,72$  ;  $p < 0,0001$ ) ; 2 groupes de moyennes ont été constatés, le premier renferme les témoins seuls et le second contient les deux traitements : NPK et TSP. En ce qui concerne la quatrième semaine ( $F_{3,8}=1344$  ;  $p < 0,0001$ ) ; 3 groupes sont signalés ; chacun étant constitué d'un traitement (Tableau 46).

Concernant les traités à la Dose 2, le classement relatif aux taux de lipides (Tableau 47), a permis d'identifier 3 groupes à une semaine ( $F_{3,8}=18,12$  ;  $p=0,0006$ ), à 3

semaines ( $F_{3,8}=44,75$  ;  $p<0,0001$ ) et à 4 semaines de traitement ( $F_{3,8}=191,8$  ;  $p<0,0001$ ) ; chacun étant constitué d'une série. A 2 semaines de traitement ( $F_{3,8}=98,56$  :  $p<0,0001$ ), deux groupes de moyennes ont été signalés ; un groupe témoins et un groupe de traités par le TSP et le NPK.

**Tableau 46.** Classement par ordre décroissant du taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu frais), chez les adultes d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	4,84	a	>0,05
	NPK D1	4,22	a	
	TSP D1	4,09	a	
Semaine 2	Témoins	5,13	a	0,0001
	NPK D1	4,26	b	
	TSP D1	4,11	b	
Semaine 3	Témoins	6,02	a	<0,0001
	TSP D1	4,31	b	
	NPK D1	4,06	b	
Semaine 4	Témoins	6,67	a	<0,0001
	TSP D1	4,44	b	
	NPK D1	4,11	c	

**Tableau 47.** Classement par ordre décroissant du taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de poids frais), chez les juvéniles d'*A. caliginosa*, après traitement à la Dose 2 : test HSD de Tukey.

Temps	Traitements	Valeurs moyennes	Groupes	P
Semaine 1	Témoins	4,84	a	0,0006
	TSP D2	4,12	b	
	NPK D2	4,03	c	
Semaine 2	Témoins	5,13	a	<0,0001
	TSP D2	4,25	b	
	NPK D2	4,09	b	
Semaine 3	Témoins	6,02	a	<0,0001
	TSP D2	4,66	b	
	NPK D2	4,03	c	
Semaine 4	Témoins	6,67	a	<0,0001
	TSP D2	4,59	b	
	NPK D2	4,01	c	

### 3.4. Bioaccumulation des engrais chimiques dans les tissus des vers de terre adultes

#### 3.4.1. NPK

L'engrais composé, le NPK est formé par l'azote (N), le phosphate ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ), le potassium ( $\text{K}_2\text{O}$ ), le soufre ( $\text{SO}_3$ ) et quelques oligo-éléments. Les résultats mentionnés dans le tableau 48 obtenus par la technique FRX, montrent les pourcentages massiques des éléments et de leurs oxydes dans les tissus des vers de terre adultes témoins et traités par la dose la plus forte du NPK. Ces résultats indiquent une augmentation du pourcentage massique de l'azote pour

les traités comparativement aux témoins pour une valeur de 0,10 % et une absence totale de son oxyde. Concernant le phosphate et le potassium, les résultats révèlent une augmentation des pourcentages massiques de ces deux éléments et leurs oxydes chez les traités comparativement aux témoins. Contrairement pour le soufre, les résultats indiquent une diminution de son pourcentage chez les traités comparativement aux témoins. Par ailleurs, le fer marque une diminution des pourcentages massiques chez les traités comparativement aux témoins. Le taux du manganèse (Mn), du zinc (Zn) et de leurs oxydes subissent une légère augmentation chez les traités par rapport aux témoins. Une stabilité des pourcentages du cuivre (Cu) et de son oxyde a été signalée. Les résultats montrent que les éléments arsenic (As) et plomb (Pb) et leurs oxydes  $As_2O_3$  et  $PbO$  sont absents dans les tissus des témoins et présents dans ceux des traités.

**Tableau 48.** Pourcentages massiques des éléments et de leurs oxydes dans les tissus des adultes témoins et traités d'*A. caliginosa*, après 1 mois de traitement par l'engrais NPK.

Eléments	Pourcentage Massique (%)		Oxydes	Pourcentage Massique (%)	
	Témoins	Traités		Témoins	Traités
C	24,6884	24,5996	CO <sub>2</sub>	90,4605	90,1353
N	1,5295	1,6352	/	/	/
Na	0,2513	0,238	Na <sub>2</sub> O	0,3388	0,3206
Mg	0,1261	0,1509	MgO	0,2091	0,2502
Al	0,5766	0,3375	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,0894	0,6378
Si	1,0261	0,9263	SiO <sub>2</sub>	2,195	1,9816
P	0,3851	0,4458	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,8823	1,0214
S	0,3846	0,3219	SO <sub>3</sub>	0,8854	0,8037
Cl	0,2058	0,1672	/	/	/
K	0,3472	0,382	K <sub>2</sub> O	0,4183	0,4601
Ca	1,0686	1,6961	CaO	1,4951	2,3732
Ti	0,0193	0,0122	TiO <sub>2</sub>	0,0321	0,0203
Cr	0,0009	0,0012	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,0014	0,0018
Mn	0,0013	0,0018	MnO	0,0017	0,0023
Fe	0,1674	0,117	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2393	0,1673
Co	0,0003	0,0003	Co <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,0004	0,0004
Ni	0,0003	0,0005	NiO	0,0004	0,0007
Cu	0,0003	0,0003	CuO	0,0004	0,0004
Zn	0,0063	0,0112	ZnO	0,0078	0,0139
As	/	0,0001	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	/	0,0001
Se	0,0005	0,0003	SeO <sub>2</sub>	0,0008	0,0004
Br	0,001	0,0009	/	/	/
Sr	0,0046	0,0039	SrO	0,0054	0,0046
Y	0,0001	0,0001	Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,0001	0,0002
Pb	/	0,0004	PbO	/	0,0004

### 3.4.2. TSP

L'engrais simple TSP est constitué du phosphate (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), du calcium (Ca) et de quelques oligo-éléments. Les résultats mentionnés dans le tableau 49 obtenus par la technique FRX, montrent les pourcentages massiques des éléments et de leurs oxydes dans les tissus des vers de terre adultes témoins et traités par la dose la plus forte du TSP. Les résultats indiquent une augmentation des pourcentages massiques du phosphate chez les traités comparativement aux témoins. Concernant le calcium, les résultats montrent une augmentation des pourcentages massiques de cet élément et de son oxyde CaO chez les traités par rapport aux témoins. Contrairement, pour le fer, les résultats indiquent une diminution de son pourcentage chez les traités comparativement aux témoins. Les pourcentages du manganèse (Mn), zinc (Zn) et de leurs oxydes subissent une légère augmentation chez les traités comparativement aux témoins. Une stabilité des pourcentages du cuivre (Cu) et de son oxyde a été remarquée. Les résultats montrent que les éléments arsenic (As) et plomb (Pb) et de leurs oxydes As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et PbO sont absents dans les tissus des témoins et présents dans ceux des traités.

**Tableau 49.** Pourcentages massiques des éléments et de leurs oxydes dans les tissus des adultes témoins et traités d'*A. caliginosa*, après 1 mois de traitement par l'engrais TSP.

Eléments	Pourcentage Massique (%)		Oxydes	Pourcentage Massique (%)	
	Témoin	Traité (TSP)		Témoin	Traité (TSP)
C	24,6884	24,5762	CO <sub>2</sub>	90,4605	90,0494
N	1,5295	1,8697	/	/	/
Na	0,2513	0,2279	Na <sub>2</sub> O	0,3388	0,3072
Mg	0,1261	0,1486	MgO	0,2091	0,2464
Al	0,5766	0,3357	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,0894	0,6342
Si	1,0261	0,9066	SiO <sub>2</sub>	2,195	1,9394
P	0,3851	0,4313	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,8823	0,9883
S	0,3846	0,317	SO <sub>3</sub>	0,8854	0,7915
Cl	0,2058	0,1705	/	/	/
K	0,3472	0,3768	K <sub>2</sub> O	0,4183	0,4538
Ca	1,0686	1,6679	CaO	1,4951	2,3338
Ti	0,0193	0,0133	TiO <sub>2</sub>	0,0321	0,0221
Cr	0,0009	0,0009	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,0014	0,0013
Mn	0,0013	0,002	MnO	0,0017	0,0025
Fe	0,1674	0,1174	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2393	0,1678
Co	0,0003	0,0002	Co <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,0004	0,0002
Ni	0,0003	0,0004	NiO	0,0004	0,0005
Cu	0,0003	0,0003	CuO	0,0004	0,0004
Zn	0,0063	0,0111	ZnO	0,0078	0,0139
As	/	0,0001	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	/	0,0002
Se	0,0005	0,0003	SeO <sub>2</sub>	0,0008	0,0004
Br	0,001	0,0012	/	/	/
Sr	0,0046	0,0039	SrO	0,0054	0,0046
Y	0,0001	0,0002	Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,0001	0,0002
Pb	/	0,0005	PbO	/	0,0005

### 3.5. Effet des engrais sur la structure histologique des adultes

Les vers de terre peuvent absorber les produits chimiques du sol et de l'eau interstitielle, à la fois par leur peau (dermique) et par ingestion (orale). L'étude histologique a été basée sur la présentation des téguments qui recouvrent le ver et assurant sa respiration, et de l'intestin qui occupe la partie moyenne et postérieure du ver et représente le siège majeur de l'absorption ; afin de présenter les altérations histologiques qui peuvent toucher les tissus des vers de terre après exposition aux engrais chimiques NPK et TSP. Evidemment, des changements histopathologiques ont été mis en évidence dans les tissus des vers traités par la dose la plus forte (DL<sub>50</sub>) du NPK et du TSP à la fin de l'expérience (après 1 mois de traitement) comparativement aux vers témoins. L'histologie des vers adultes témoins présente une apparence normale pour les téguments et l'intestin. Par contre, les adultes exposés aux traitements présentaient des dommages histopathologiques mentionnées dans les figures (39, 40, 41, 42 et 43 (B et C)).

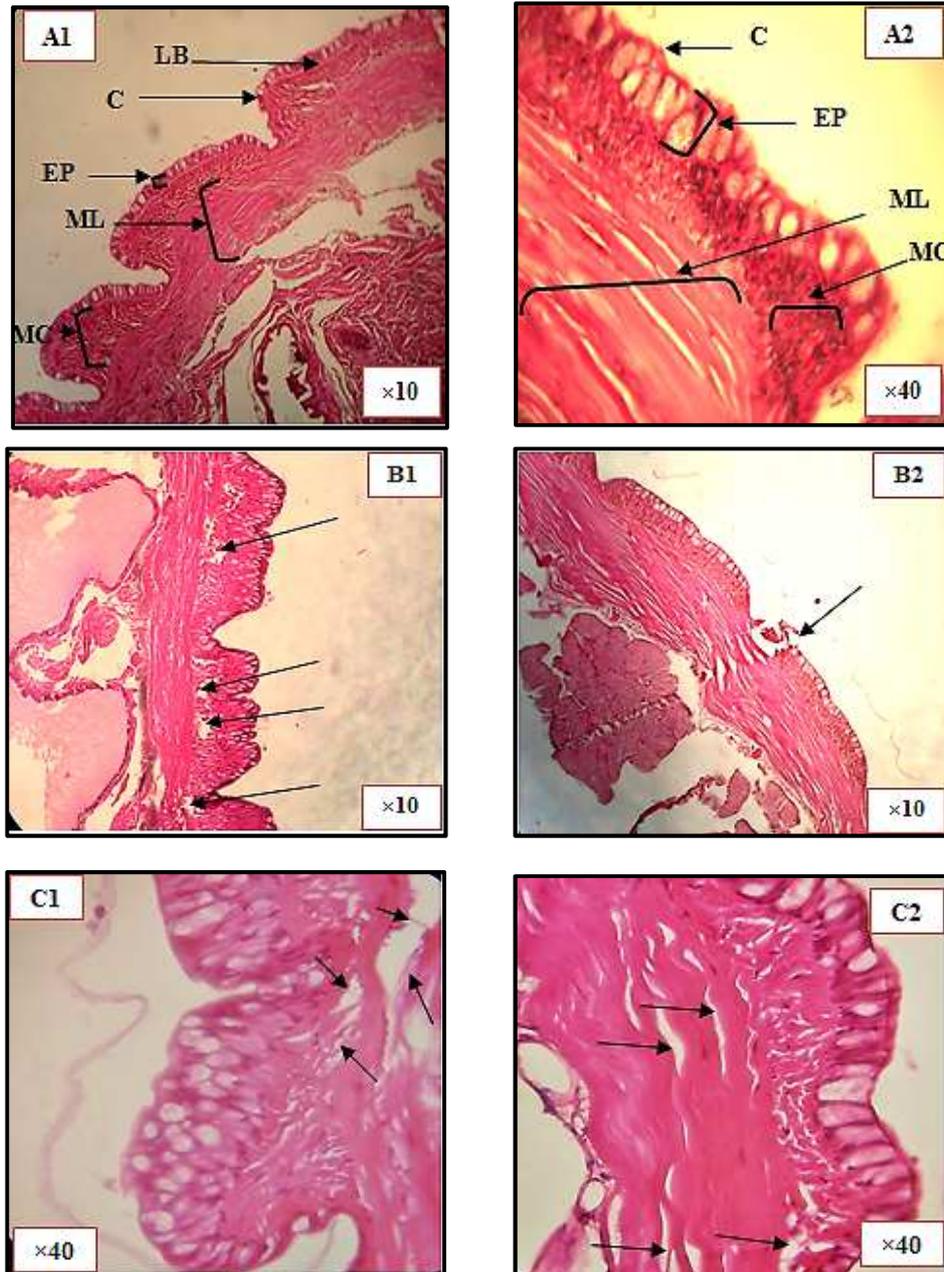
**Tégument :** les téguments des vers adultes témoins présentaient une structure normale avec une cuticule (C) intacte et une surface régulière de l'épiderme (EP) formée par des cellules épithéliales serrées sur une lame basale (LB). Ces téguments sont soutenus par 2 couches de fibres musculaires ; la première circulaire (MC) et la deuxième longitudinale (ML) (Figs. 39, 40, 41(A)).

Le traitement avec les engrais chimiques pendant 1 mois provoque quelques modifications au niveau des tissus, concernant les traités par le NPK, les coupes histologiques montrent une déchirure de l'épithélium, des lyses et nécroses au niveau des cellules épithéliales (Figs. 39, 41 (B2)) avec une destruction du muscle circulaire (Fig. 39B1) et un détachement des fibres musculaires longitudinales (Figs. 40 (B1, B2), 41B1). De plus, on a remarqué l'apparition d'un épiderme irrégulier (Figs. 40 (B1, B2), 41B1). Les mêmes observations ont été constatées après traitement par le TSP, où on a noté des altérations tissulaires particulièrement au niveau des deux couches musculaires ; avec une destruction du muscle circulaire (Fig. 39 (C1, C2)) et un détachement des fibres du muscle longitudinal (Figs. 39, 40 et 41 (C1, C2)). De plus, quelques déformations au niveau de l'épiderme (Figs. 40, 41 (C1)) sans lyse ou nécrose tissulaire ont été signalées.

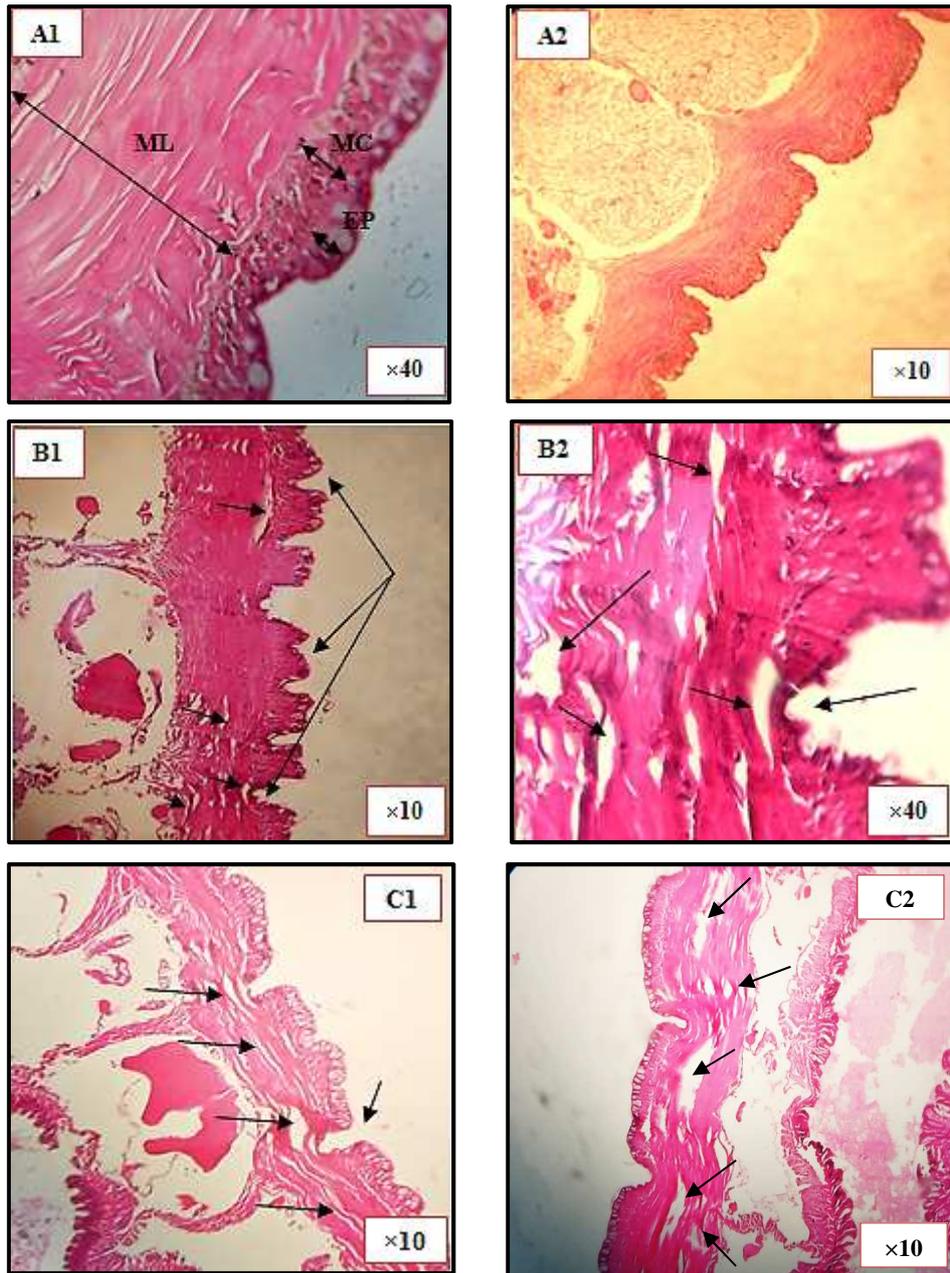
**Intestin :** l'intestin des vers de terre adultes témoins montrait un typhlosole, présenté par des invaginations profondes et des plis bien déterminés. Toute la surface interne de l'intestin est

bordée par un épithélium en colonne portant une bordure en brosse. Cette paroi est soutenue par une fine couche musculaire circulaire et des muscles longitudinaux sous forme d'un réseau de couches continues. La surface externe de l'intestin est recouverte par des cellules nommées les chloragènes (CH) (Figs. 42, 43 (A)).

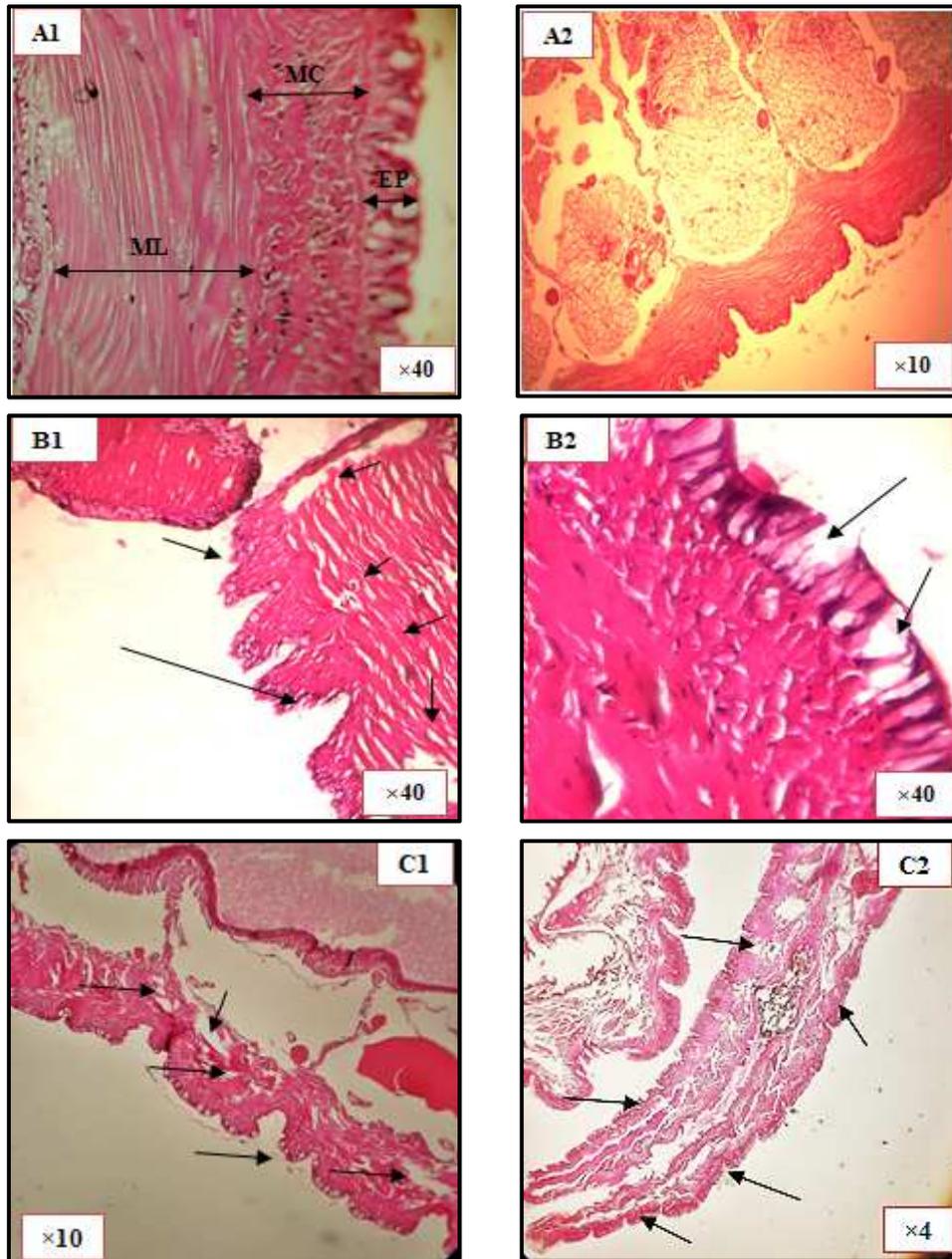
Après un mois de traitement, les résultats de l'histologie ont montré que ces engrais chimiques affectent la paroi intestinale en causant des altérations ; tels que, le fusionnement des plis intestinaux, avec quelques décollements au niveau du tissu chloragène comparativement aux témoins (Figs. 42, 43(B1, B2)), et cela après traitement avec le NPK. Concernant le traitement par le TSP, des altérations intestinales ont été constatées d'une façon plus marquée ; avec un rétrécissement et destruction de la paroi intestinale, un détachement des muscles circulaires et longitudinaux, et un décollement au niveau du tissu chloragène (Figs. 42, 43 (C1, C2)).



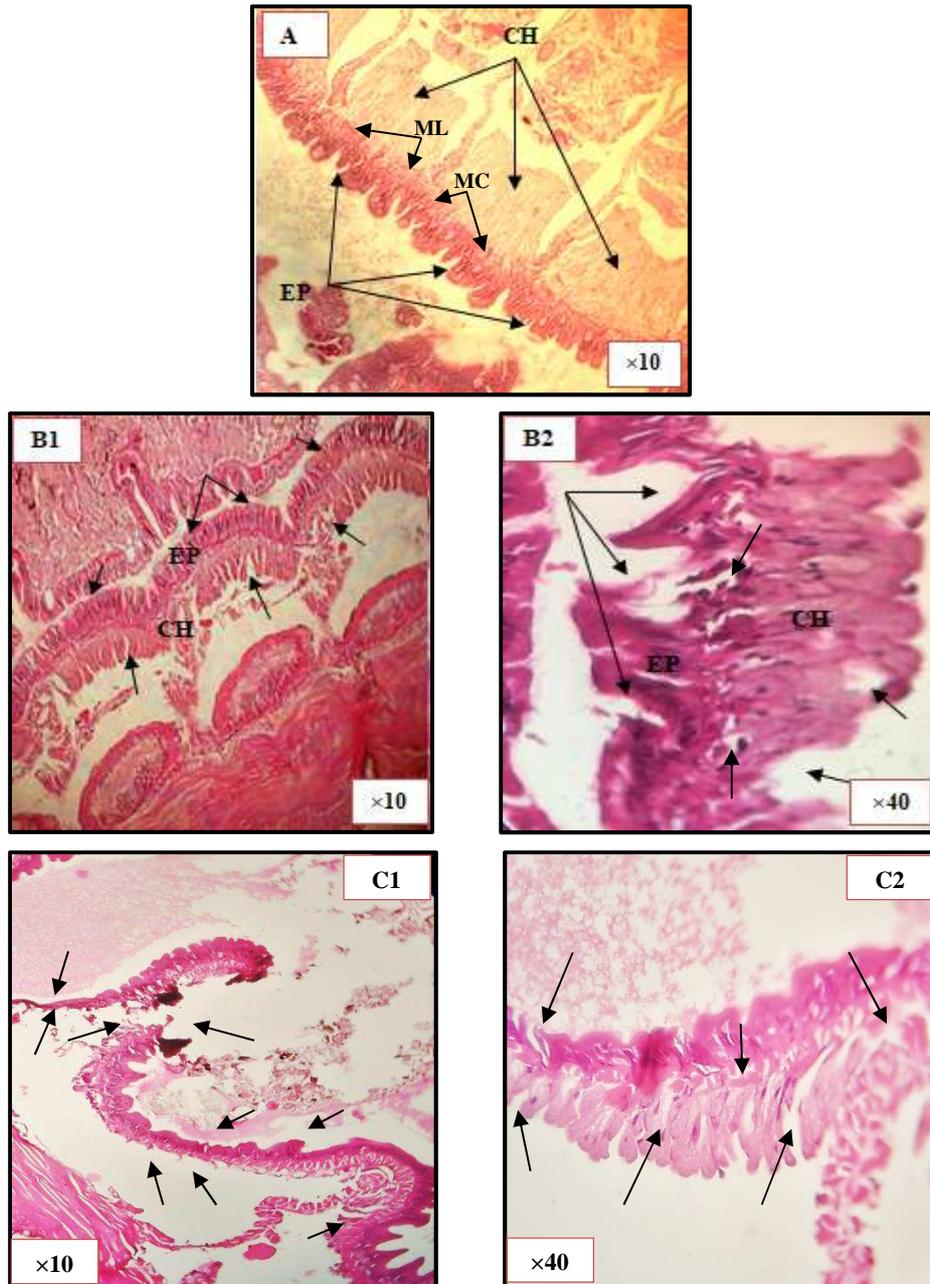
**Figure 39.** Coupes histologiques longitudinales du tégument (partie antérieure) d'*A. caliginosa*. **C** : cuticule, **EP** : épithélium, **LB** : lame basale, **MC** : muscle circulaire, **ML** : muscle longitudinal. **A** : Témoins, **B** : NPK, **C** : TSP.



**Figure 40.** Coupes histologiques longitudinales du tégument (partie moyenne) d'*A. caliginosa*.  
**C** : cuticule, **EP** : épithélium, **LB** : lame basale, **MC** : muscle circulaire, **ML** : muscle longitudinal.  
**A** : Témoins, **B** : NPK, **C** : TSP.

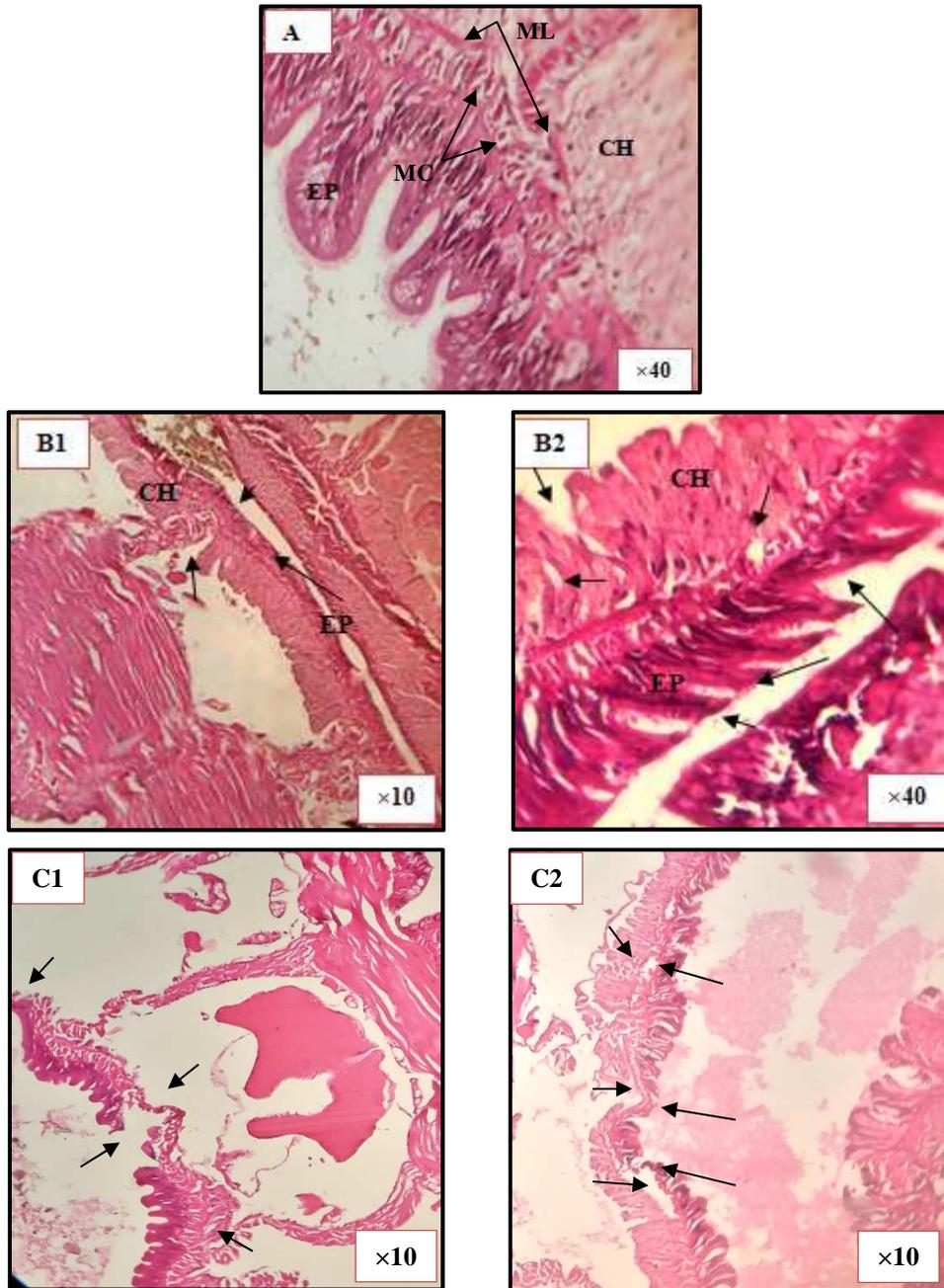


**Figure 41.** Coupes histologiques longitudinales du tégument (partie postérieure) d'*A. caliginosa*.  
**C** : cuticule, **EP** : épithélium, **LB** : lame basale, **MC** : muscle circulaire, **ML** : muscle longitudinal.  
**A** : Témoins, **B** : NPK, **C** : TSP.



**Figure 42.** Coupes histologiques longitudinales de la paroi intestinale (partie moyenne) d'*A. caliginosa*. EP : épithélium, MC : muscle circulaire, ML : muscle longitudinal, CH : cellule chloragogène.

A : Témoins, B : NPK, C : TSP.



**Figure 43.** Coupes histologiques longitudinales de la paroi intestinale de la partie postérieure d'*A. caliginosa* ; EP : épithélium, MC : muscle circulaire, ML : muscle longitudinal, CH : cellule chloragogène. A : Témoins, B : NPK, C : TSP.

# *DISCUSSION*

## IV. DISCUSSION

### 4.1 Effet des engrais chimiques sur les biomarqueurs

Les mesures des produits biochimiques et les réponses aux contaminants (biomarqueurs) des organismes vivants (bioindicateurs) par le biais des tests biologiques (bioessais), sont devenus un outil essentiel pour évaluer la qualité du sol et de l'environnement, en fournissant une approche intégrée dans l'évaluation des risques écologiques (Bustos *et al.*, 2015). Les tests toxicologiques du sol sont généralement effectués en utilisant *Eisenia fetida* comme espèce standard de ver de terre, mais elle est tolérante à un large éventail de polluants organiques et inorganiques que d'autres espèces telles que *Lumbricus rubellus*, *Aporrectodea longa* et *Aporrectodea caliginosa* (Pelosi *et al.*, 2013 ; Qiu *et al.*, 2014 ; Velki & Hackenberger, 2013). Par conséquent, l'utilisation d'espèces sensibles est cruciale pour l'estimation précise de la contamination des sols (Chen *et al.*, 2017). *A. caliginosa* est l'une des espèces les plus abondantes dans la plupart des sols (et en particulier les sols cultivés) (Bart *et al.*, 2018). En raison de son habitat dans la couche superficielle, cette espèce est vulnérable aux pesticides appliqués à la surface. Cela augmente sa pertinence écologique par rapport à *E. fetida*, ce qui en fait un candidat idéal pour l'évaluation de l'impact potentiel des produits agrochimiques sur le terrain (Booth & O'Halloran, 2001). En revanche, les petites espèces (*A. caliginosa*, *A. rosea* et *A. chlorotica*) sont plus sensibles aux divers traitements du sol que les grosses espèces (*L. terrestris* et *A. longa*) (Van Rhee & Nathans, 1961). Une meilleure évaluation des effets de produits chimiques sur les organismes non visés (non ciblés) nécessite la réalisation des tests à l'aide d'espèces pertinentes. Les espèces indigènes, typiques et sensibles de vers de terre devraient être prises en compte dans les évaluations des risques du sol pour éviter de sous-estimer la toxicité de divers polluants (Chen *et al.*, 2017).

Pour évaluer la toxicité chronique du sol, il est indispensable de déterminer les réponses sublétales qui peuvent avoir un impact direct sur la performance, la reproduction et le comportement des espèces (Solé, 2020). Un biomarqueur est défini comme toutes altérations biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementales qui peuvent être déterminées au niveau d'un tissu, d'un liquide ou d'un individu entier, pour évaluer l'exposition et/ou l'impact d'un ou de plusieurs toxiques (Depledge, 1994). L'utilisation des biomarqueurs pour estimer l'exposition aux produits chimiques ou les effets qui en résultent, a fait l'objet d'une attention considérable parce qu'ils indiquent le degré d'exposition ou ses effets toxiques (Peakall & Shugart, 1993 ; Peakall, 1994 ; Weeks, 1995). Les biomarqueurs ont été largement appliqués dans le domaine de la biosurveillance en utilisant les moules et d'autres mollusques

comme sentinelles. Cependant, les biomarqueurs sont peu étudiés chez les vers de terre malgré que ces derniers représentent l'organisme standard utilisé dans les essais toxicologiques (Rodriguez *et al.*, 2007). Les biomarqueurs sont nécessaires à l'évaluation de la sensibilité des espèces de vers de terre pour fournir des informations précises (Chen *et al.*, 2017). Après qu'un produit chimique pénètre dans le corps d'un organisme, les réponses physiologiques et biochimiques commencent et l'organisme peut résister ou être empoisonné (Ebrahimzadeh *et al.*, 2021).

#### 4.1.1 Effet sur les biomarqueurs physiologiques

La mortalité, l'inhibition de la croissance et les réponses biochimiques sont des indicateurs typiques pour évaluer les effets toxiques des produits chimiques sur les vers de terre (Shi *et al.*, 2007 ; Wu *et al.*, 2011).

##### 4.1.1.1 Mortalité

Les essais toxicologiques réalisés au cours de notre étude ont révélé une augmentation des mortalités chez les juvéniles d'*A. caliginosa* en fonction des doses appliquées des deux traitements NPK et TSP après un mois d'exposition. Le profil de la mortalité suggère que les effets des engrais testés sur les vers de terre résultaient de l'absorption de ces produits chimiques dans l'ensemble du corps de ver, à travers la paroi corporelle ou par ingestion (Stanley & Preetha, 2016). Peu de recherches ont été effectuées sur la toxicité des engrais à l'égard des vers de terre. Chez les séries témoins, aucune mortalité n'a été observée tout au long de la période expérimentale, ce qui montre que les conditions expérimentales étaient acceptables en terme de fournir un environnement vital et sain pour la survie des vers de terre (Elyamine *et al.*, 2018).

Les effets sublétaux sont plus importants que la toxicité létale (Stanley & Preetha, 2016). Une étude a montré que les vers juvéniles, immatures et adultes de *Drawida willsi* survivaient dans un sol contenant respectivement jusqu'à 250, 370 et 490 mg/kg de NPK. Mais une mortalité de 100 % a été enregistrée lorsque les vers juvéniles ont été exposés à une dose de 490 mg/kg du NPK. Cependant, à 640 mg/kg et 730 mg/kg, 96 % et 92% de mortalité ont été observées chez les vers immatures et les vers adultes respectivement. Le taux de mortalité augmente avec l'augmentation des doses appliquées (Bhattacharya & Sahu, 2016). Selon Atuah & Hodson (2011), une mortalité de 50 % a été mentionnée lors de l'exposition des vers adultes

de l'espèce *Eisenia Fetida* à une concentration de TSP comprise entre 3107 et 3590 mg/kg pendant 14 jours.

Les résultats de [Shruthi et al. \(2017\)](#) ont révélé une variation de mortalités chez les adultes et les juvéniles d'*Eudrilus eugeniae* lorsqu'ils sont exposés aux divers engrais inorganiques mélangés à la nourriture, allant de 0% jusqu'à 100% de mortalité. Des travaux antérieurs ont montré que les engrais minéraux inorganiques peuvent être également toxiques contre les vers de terre suite à une exposition directe par contact ([Abbiramy et al., 2013a](#)). Plusieurs études ont démontré que l'application des engrais chimiques sous forme de pulvérisation ou de poudre peut avoir un effet négatif sur les populations de vers de terre ([Reinecke & Reinecke, 2004](#) ; [Rai et al., 2014](#)). Peu d'études ont été réalisées sur la toxicité de ces engrais inorganiques à l'égard des vers de terre dans l'écosystème agricole ([Shruthi et al., 2017](#)). Le traitement des adultes d'*Eisenia fetida* avec l'urée et le diammonium phosphate (DAP) a diminué le pourcentage de survie des vers de terre ; la CL<sub>50</sub> pour l'urée était de 876,56 mg/kg, tandis que la CL<sub>50</sub> pour le DAP était de 2098,69 mg/kg de sol ([Passi et al., 2021](#)). L'effet des engrais sur la macrofaune, y compris les vers de terre, est également signalée et varie d'une espèce à l'autre, ce qui peut être probablement attribuée à des différences dans leur physiologie et leur biologie ([Yahyaabad et al., 2018](#)). Les espèces épigées telles que *E. fetida* qui se nourrissent de la matière de surface sont plus sujets aux changements chimiques dans le sol de surface par rapport à différentes espèces anéciques, par exemple *L. terrestris* qui creusent le sous-sol des terriers verticaux ([Yahyaabadi et al., 2018](#)). La nocivité des engrais inorganiques sur les vers de terre est due à l'effet acide et toxique de l'ammoniac ([Donahue, 2001](#)).

Les tests de toxicité aigue ont montré que le carbamate appliqué sur l'espèce *Eisenia fetida* induisait une augmentation de la mortalité en fonction de la concentration, avec une CL<sub>50</sub> de 8,20 µg/cm<sup>2</sup> (48 h) pour le test de contact et de 3,37 mg/kg (14 jours) dans le sol artificiel ([Gu et al., 2021](#)). La toxicité du sélénium a été évaluée sur le ver de terre *Eisenia fetida* par des tests d'exposition en utilisant du papier filtre, du sol artificiel et du fumier de vache. Les CL<sub>50</sub> à 24h et 48h pour l'essai de contact du papier filtre étaient de 2,7 et 1,52 µg/cm<sup>2</sup>. Dans l'analyse du sol artificiel, la CL<sub>50</sub> à 7 et 14 jours étaient de 93,84 et 65,36 mg/kg, respectivement. Le test du fumier de vache a montré une CL<sub>50</sub> de 358,94 mg/kg au 7ème jours, tandis qu'après 14 jours la CL<sub>50</sub> était 145,26 mg/kg ([Yue et al., 2021](#)). De plus, les valeurs de la CL<sub>50</sub> obtenues après 14 jours d'exposition à un fongicide, le benzovindiflupyr

(BZF) sont de 416 mg/kg pour les vers de terre adultes et 341 mg/kg pour les juvéniles de l'espèce *Eisenia fetida* (Yao *et al.*, 2021). Correia & Moreira (2010) ont signalé une mortalité de 100 % chez les vers de terre (*Eisenia foetida*) exposés à un herbicide avec deux doses 500 et 1000 mg/kg.

La toxicité d'un produit chimique à l'égard des vers de terre dépend des stratégies d'alimentation adoptées par ces espèces et en outre sur la disponibilité du polluant (Schon *et al.*, 2017). De plus, le mode d'application du produit influence le potentiel toxique du produit, car l'application de ces derniers sur les vers de terre par ingestion (voie intestinale) a un effet plus lent que l'application par contact à travers la cuticule (Iturbe-Requena *et al.*, 2019). La toxicité chronique induite par l'exposition à long terme des vers de terre aux contaminants présents dans le sol ne devrait pas être ignorée (Yao *et al.*, 2021).

#### 4.1.1.2 Croissance

Les vers de terre fournissent des fonctions clés du sol qui favorisent de nombreux services écosystémiques positifs. Ces services sont importants pour la durabilité de l'agroécosystème, mais peuvent être dégradés par des pratiques agricoles intensives (Pelosi *et al.*, 2014). La plus grande menace pour la santé des sols est les pesticides et les produits chimiques synthétiques, y compris les engrais (Migliani & Bisht, 2019). La présence des contaminants dans le sol met les vers de terre dans un état de stress, ce qui peut engendrer un détournement de son énergie nécessaire à la reproduction, à l'activité fouisseuse et à la croissance (Pelosi *et al.*, 2014). L'utilisation du changement de la masse corporelle comme biomarqueur est pertinente sur le plan écologique, car on pense que les pertes élevées de la masse corporelle entraînent des effets négatifs sur la survie et la reproduction des vers de terre (Dittbrenner *et al.*, 2010). Ces changements dans la biomasse pourraient être un bon indicateur du stress chimique qui est lié à la dynamique énergétique et à l'inhibition de la croissance (Shi *et al.*, 2007 ; Wu *et al.*, 2012).

La perte de poids semble être un indicateur du stress physiologique, lié au degré d'intoxication et au temps d'exposition (Van Gestel *et al.*, 1995 ; Frampton *et al.*, 2006). Nos résultats ont montré un effet inhibiteur des engrais sur la prise de poids chez les adultes et les juvéniles d'*A. caliginosa* avec un effet plus marqué après traitement par le TSP. Certaines études ont montré que la croissance des vers de terre est trop affectée au stade juvénile qu'au stade adulte (Zhou *et al.*, 2008). Il a été rapporté que l'utilisation des engrais inorganiques

influence la biomasse des vers de terre (Lalthanzara & Ramanujam, 2010). Robert (2008) a rapporté que les engrais contenant de l'azote comme le NPK sont répulsifs contre les escargots et les insectes, ils induisent une diminution de la prise de l'alimentation et perturbent ainsi la croissance. El-Deeb *et al.* (2017) ont constaté une diminution de la croissance de l'escargot *Biomphalaria alexandrina* suite à l'application de trois types d'engrais NPK (azote élevé, phosphore élevé et équilibré), tandis que Ragab & Shoukry (2006) ont enregistré un fort impact des concentrations sublétales d'urée sur le taux de la croissance de la même espèce par rapport à celles du nitrate d'ammonium. Par ailleurs, Abdel-Hamid *et al.* (1998) ont signalé une réduction de la croissance des juvéniles de *B. alexandrina* exposés à l'urée et le nitrate d'ammonium. Wu *et al.* (2020) ont signalé que le pH acide du sol dû à l'application excessive des engrais azotés avait des effets inhibiteurs importants sur la croissance des vers de terre, *E. foetida*. Le taux de croissance et le taux d'inhibition de la croissance spécifique dans tous les groupes d'*E. foetida* traités par le polluant tetrabromodiphényl éther (BDE-47) étaient significativement différents de ceux des témoins (Xu *et al.*, 2015). La croissance des adultes d'*A. caliginosa* traités par le glyphosate et la deltaméthrine a été inhibée par l'insecticide beaucoup plus que par l'herbicide (Bouazdia, 2020). L'inhibition de la croissance induite par les contaminants peut provoquer des troubles métaboliques, comportementaux ou de perturbations du contrôle neuroendocrine. Au niveau individuel, une conséquence écophysiological importante de l'inhibition de la croissance est d'engendrer un retard de la période de maturité sexuelle (Laskowski & Hopkin, 1996).

Le taux de croissance spécifique chez les vers de terre exposés au sulfonate de perfluorooctane et à l'acide perfluorooctanoïque était négative durant tous les temps d'exposition (Zheng *et al.*, 2016). L'inhibition de la croissance des vers de terre exposés au lindane et à la deltaméthrine était significativement plus élevée que celle des témoins, et elle dépend de la durée d'exposition (Shi *et al.*, 2007). Choo & Baker (1998) ont constaté que l'endosulfan et le fénamiphos réduisaient considérablement le poids des juvéniles d'*Aporrectodea*. Zhou *et al.* (2006) ont montré que le poids des vers de terre est un important indicateur des effets toxiques de l'acétochlore et du méthamidophos et qui est plus sensible que la mortalité. Les travaux de Helling *et al.* (2000) et de Yasmin & D'Souza (2007) ont signalé une réduction de la croissance d'*E. foetida* avec une relation dose-dépendante après application d'un engrais et de trois pesticides, carbendazime, glyphosate et diméthoate. Le faible taux de croissance constaté chez les vers de terre peut être dû à un apport alimentaire plus faible (Ribeiro *et al.*, 2001).

Ces changements dans la biomasse peuvent être un bon indicateur physiologique du stress, liant les effets chimiques à la dynamique énergétique et, en fin de compte, à l'inhibition de la croissance (Wu *et al.*, 2012), due aux proportions élevées d'énergie métabolique utilisées au moment du processus de désintoxication (Piola *et al.*, 2013). Également, la perte de poids dépend du degré d'intoxication et de la période d'exposition (Frampton *et al.*, 2006). Elle peut être interprétée comme une indication de l'état de santé général (Olvera-Velona *et al.*, 2008). La perte de poids chez les vers de terre peut être liée à leur stratégie de survie. Dans les conditions environnementales défavorables, les vers de terre évitent l'empoisonnement en réduisant la consommation de nourriture et le taux de consommation (Mosleh *et al.*, 2003). En outre, la consommation de protéines, lipides et du glycogène causés par les produits chimiques toxiques peuvent être responsables de la perte de poids chez les vers de terre (Liu *et al.*, 2015 ; Ye *et al.*, 2016 ; Yao *et al.*, 2020). En revanche, la diminution du poids est susceptible d'être associée à un mécanisme de détoxification des vers de terre impliqué pour l'élimination des toxiques par le métabolisme énergétique (Yao *et al.*, 2021). L'effet le plus typique des polluants est d'inhiber la prise de poids des vers de terre (Xiao *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2018). La perte de poids dans notre étude peut être expliquée par l'altération de l'épithélium intestinale ce qui réduit l'absorption des nutriments et qui a été confirmé par nos résultats.

#### 4.1.2 Effet sur les biomarqueurs du stress oxydatif

Récemment, l'utilisation des biomarqueurs pour estimer l'exposition ou les effets qui en résultent des produits chimiques ont fait l'objet d'une attention considérable (Dawood *et al.*, 2017). L'utilité des biomarqueurs chez les vers de terre est progressivement pertinente pour l'évaluation de l'impact des pesticides sur l'organisme du sol (Tiwari *et al.*, 2016). Diverses classes d'enzymes sont utilisées comme biomarqueurs chez les vers de terre en raison de leur rôle crucial dans la transmission neurocholinergique et dans l'homéostasie cellulaire pour prévenir l'action toxique des produits chimiques (Sanchez-Hernandez, 2006 ; Novais *et al.*, 2011 ; Mekahlia *et al.*, 2015). L'exposition des vers de terre à des contaminants du sol conduit à l'augmentation immédiate des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ; qui comprennent une série de radicaux anioniques superoxydes ( $O_2^-$ ), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) (Zhang *et al.*, 2014). Ces dernières sont des espèces chimiques à courte durée de vie contenant des électrons non appariés, formés par la réduction partielle de l'oxygène moléculaire (Moloney & Cotter, 2018). Ces substances sont très réactives et

peuvent attaquer divers types de biomolécules dans leur voisinage, ce qui est connu sous le nom du stress oxydatif (Tsikas, 2017). Afin de neutraliser les dommages oxydatifs, un système complexe de défense antioxydante évolue dans les organismes en impliquant des éléments enzymatiques et non-enzymatique de récupération et de piégeage des ROS (Wang *et al.*, 2021). Le système enzymatique comprend le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), GPx, GST et autres enzymes antioxydantes, bien que le système non enzymatique comprenne du GSH, du glutathion oxydé (GSSG) et d'autres antioxydants non-enzymatiques (Birben *et al.*, 2012).

Lors de l'application des engrais sur le sol, des enzymes antioxydantes, y compris la SOD, la CAT et la peroxidase (POD) ainsi que la GPx chez les vers de terre ont été activées pour protéger le corps contre les dommages oxydatifs (Song *et al.*, 2018). Bien que l'activité des enzymes antioxydantes puisse être augmentée ou inhibée sous stress chimique, il n'existe cependant aucune règle générale pour ces perturbations (Nmaduka *et al.*, 2018). Les études réalisées sur les vers de terre dans ce sens sont limitées. Certains biomarqueurs biochimiques sont considérés comme des signaux d'alerte précoces pour d'autres conséquences (Van Gestel & Van Brummelen, 1996 ; Solé, 2020). Ces derniers répondent de façon sensible à un dysfonctionnement et leur présence rend compte de la biodisponibilité des polluants et des effets qu'ils engendrent sur les organismes et les populations (Mc Carthy & Shugart, 1990). Les biomarqueurs biochimiques sont utilisés pour l'analyse de la toxicité, la métabolisation et la détoxification des polluants chez les vers de terre (Denoyelle *et al.*, 2007 ; Reinecke & Reinecke, 2007 ; Wang *et al.*, 2021). Les changements enzymatiques et protéiques sont associés aux conditions écophysiologiques de différentes espèces de vers de terre (Tripathi *et al.*, 2011).

La transformation métabolique d'un pesticide est l'un des principaux facteurs pour contrôler sa bioaccumulation et sa toxicité (Toshiyuki & Keiko, 2015). L'oxydation enzymatique et l'hydrolyse sont les réactions primaires typiques de la phase I, et les métabolites résultants sont conjugués avec des molécules endogènes en phase II (Katagi & Ose, 2015). Les enzymes du cycle redox du glutathion, comprenant GPx, GR et GST, jouent un rôle protecteur contre le stress oxydatif (Van der Oost *et al.*, 1998). Les biomarqueurs intègrent un large éventail de facteurs environnementaux, toxicologiques et écologiques qui contrôlent et modulent les contaminants d'exposition (Arnaud *et al.*, 2000).

L'exposition des vers de terre aux xénobiotiques, peut se produire directement par absorption de l'eau interstitielle du sol par la peau et par l'ingestion de sol contaminé et particules traversant l'épiderme intestinal (Belfroid *et al.*, 1993 ; 1996). Cette exposition peut induire des mécanismes de biotransformation et de désintoxication chez les vers de terre, comme chez d'autres organismes, pour les modifier ou les récupérer, en facilitant leur excrétion (Rodríguez-Castellanos & Sanchez-Hernandez, 2007).

#### 4.1.2.1 Effet sur l'activité des GSTs

Les glutathion S-transférases (GSTs) sont des enzymes de détoxification de la phase II modulées par la présence des xénobiotiques, elles ont été utilisées comme biomarqueur indiquant l'exposition aux contaminants environnementaux (Gunderson *et al.*, 2016). Cette enzyme multifonctionnelle est impliquée dans la détoxification des composés électrophiles et dans les mécanismes de la défense antioxydante cellulaire (Zhu *et al.*, 2011). L'activité de ce biomarqueur est requise pour le maintien de l'homéostasie de l'environnement interne (Maity *et al.*, 2018). Il vise à combiner le glutathion réduit (GSH) pour produire un métabolite conjugué soluble dans l'eau (Rodriguez *et al.*, 2007). Cela neutralise les sites nucléophiles réactifs du produit chimique et/ou augmente sa solubilité dans l'eau facilitant son excrétion de la cellule (Pavlidis *et al.*, 2018). La combinaison s'effectue avec de nombreux substrats (y compris les produits secondaires de la peroxydation lipidique) et réduire la toxicité endogène ou exogène (Paravani *et al.*, 2019) ; afin de faciliter leur élimination (Ketterer *et al.*, 1983). Par conjugaison, la GST neutralise de nombreux xénobiotiques et métabolites endogènes (Hayes *et al.*, 2005), ce qui semble être une explication possible de la teneur réduite en GSH. De plus, les GSTs sont impliquées dans le métabolisme ou biotransformation de substances nocives endogènes dans de nombreux organismes (Awali *et al.*, 2019 ; Sun *et al.*, 2019). En tant qu'indicateur sensible pour détecter les polluants, la GST peut non seulement dégrader les polluants, mais aussi fournir des informations précoces sur le stress oxydatif des organismes (Lushchak, 2011 ; Board & Menon, 2013 ; Han *et al.*, 2014 ; Sanchez-Hernandez *et al.*, 2014 ; Zhao *et al.*, 2017). Les GSTs catalysent les attaques nucléophiles du GSH sur les composés contenant du carbone, de l'azote ou du soufre, participant à des mécanismes de détoxification et d'élimination (Huber *et al.*, 2008).

L'activité spécifique des GSTs chez les adultes et les juvéniles d'*A. caliginosa* évaluée à 0, 1, 2, 3 et 4 semaines de traitement, révèle une augmentation significative après traitement avec les deux engrais (NPK et TSP) et ce, comparativement aux témoins. Les deux traitements ont

un effet similaire induisant l'activation du système de détoxification. Des résultats similaires ont montré une augmentation de l'activité des GSTs chez les adultes de *Lumbricus terrestris* prélevés des sites contaminés par les métaux lourds (Bennour *et al.*, 2020) et chez *Allolobophora caliginosa* après traitement par le cadmium (Otmani *et al.*, 2018). Cette observation a été également enregistrée chez *L. terrestris* après une exposition à court terme au TSP et au Sekator (Mekahlia *et al.*, 2016) et chez *Octodrilus complanatus* traité par le methomyl (Zeriri *et al.*, 2012). Maity *et al.* (2008) et Xue *et al.* (2009) ont constaté des niveaux accrus de GSTs chez les vers de terre exposés au plomb et au tétrabromobisphénol, respectivement. De plus, Aly & Schröder (2008) ont montré que le taux de conjugaison de la GST chez *Eisenia foetida* variait en utilisant deux herbicides différents ; le fenoxaprop et le métalachlore. Une augmentation de l'activité de ce biomarqueur a été révélée également lors de l'évaluation des effets biologiques de la pollution des sols sur *L. terrestris* (Kılıç, 2011).

Des résultats identiques ont également été signalés chez *Aporrectodea caliginosa nocturna* (Schreck *et al.*, 2008) traitée par la mixture de six pesticides ; deux insecticides et quatre fongicides, et chez les vers adultes de la même espèce prélevés du sol fortement contaminé par les métaux lourds (As, Cd, Pb, Cr, Hg, Mn, Fe, Co, Ni, Cu et Zn) (Maity *et al.*, 2018), et traités à court terme par l'organophosphoré chlorpyrifos (Sabchez-Hernandez *et al.*, 2014). Velki *et al.* (2014) ont constaté une augmentation significative de l'activité des GSTs chez différentes espèces de vers de terre à savoir : *E. andrei*, *L. terrestris*, *L. rubellus* et *Octolasion lacteum* exposées au pirimiphos méthyle pendant 28 jours. Xiao *et al.* (2006) ont montré une augmentation de 5 à 10 % de l'activité des GSTs chez le ver de terre *Eisenia fetida* exposé à l'herbicide acétochlore. Les travaux de Contardo-Jara & Wiegand (2008) suggèrent également l'utilisation de la variation de l'activité GST chez le ver de terre *Lumbriculus variegatus* comme un biomarqueur sensible de l'exposition à un polluant organique, l'atrazine.

Par contre, des inhibitions de l'activité des GSTs ont été observées chez les juvéniles d'*A. caliginosa* traités par un organophosphoré, le diazinon (Booth & O'Halloran, 2001) et chez *Eisenia andrei* exposé au triclocarban (Sales Junior *et al.*, 2020).

Il a été largement rapporté que l'activité des GSTs chez les vers de terre a été affecté par nombreux polluants (Xu *et al.*, 2021). Selon Song *et al.* (2009) et Zhou *et al.* (2016), cette enzyme est un bioindicateur principal associé à la réaction au stress oxydatif causé par les produits pour les tests à long terme. L'augmentation de l'activité des GSTs peut-être un indicateur important de la capacité des vers de terre à détoxifier le polluant, et elle peut être

associée à la difficulté du système antioxydant pour compenser complètement le stress oxydatif déclenché par une exposition à long terme (Maity *et al.*, 2018). L'induction de l'activité de cette enzyme, indiquerait probablement un taux élevé de conjugaison des composés testés avec le GSH, et de ce fait, une activation possible des défenses antioxydantes (Board & Menon, 2013). Selon Cossu *et al.* (1997), la pollution implique une induction des enzymes antioxydantes permettant aux organismes de surmonter partiellement ou totalement le stress résultant de l'exposition à un danger environnemental.

#### 4.1.2.2 Effet sur le taux du GSH

Les vers de terre sont fréquemment exposés à des contaminants chimiques du sol (métaux lourds, pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques, etc.) et accumulent des quantités importantes de polluants inorganiques et organiques dans leur corps (Hobbelen *et al.*, 2006). Pour cette raison, il est souhaitable qu'ils suivent l'un des systèmes de désintoxication. Le tripeptide GSH, associé à la GST, participe dans le cycle redox du glutathion et est considéré comme la principale ligne de défense du système antioxydant contre les espèces réactives d'oxygène (ROS) (Simioni *et al.*, 2018 ; Sales Junior *et al.*, 2021). Cette molécule de faible masse moléculaire et les enzymes du cycle redox du glutathion impliquées dans la phase 2 de la biotransformation II présentent des capacités antioxydantes permettant de protéger les cellules contre les effets indésirables causés par les ROS et les xénobiotiques. Par conséquent, ces antioxydants sont essentiels à la survie de l'organisme et représentent également des marqueurs significatifs par rapport à la pollution de l'environnement (Maity *et al.*, 2008 ; 2010).

Le glutathion est le principal composé antioxydant présent dans la fraction soluble de la cellule, participant à divers processus cellulaires critiques, y compris la désintoxication et la régulation de la prolifération et du développement cellulaires (Yan *et al.*, 1997). Il joue un rôle multifactoriel dans le mécanisme de défense antioxydant (Sathishsekar & Subramanian, 2005). C'est un piègeur direct des radicaux libres rencontrés dans les cellules et un co-substrat nécessaire pour l'activité de la GPx et celle des glutathion-S-transférases (Ravi *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2018). Par conséquent, les changements du taux du GSH peuvent être considérés comme un indicateur particulièrement sensible du stress oxydant (Taleb-Senouci *et al.*, 2009).

Le glutathion est un acteur clé de ce système antioxydant, avec une fonction significative dans la récupération des ROS et comme tampon pour maintenir l'état redox cellulaire en équilibre

(Howarth *et al.*, 2003 ; Meyer & Hell, 2005). Il existe sous forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG). À l'état réduit, le groupement thiol de la cystéine est capable de donner un électron réducteur directement à des molécules instables telles que les ROSs (Espèces réactives d'oxygène). A ce stade là, le GSH devient réactif, et réagit facilement avec un autre GSH réactif pour former le GSSG. Dans une étape suivante, le GSH peut être régénéré à partir de GSSG par l'action de la glutathion réductase (GR), au détriment du NADPH (Jozefczak *et al.*, 2012). Le résidu de cystéine en fait du GSH un important antioxydant agit comme un substrat pour la régénération d'autres antioxydants essentiels (Jozefczak *et al.*, 2012). GSH, un composant essentiel dans la désintoxication des ions métalliques, il fournit une affinité élevée des métaux à son groupement thiol (Maity *et al.*, 2018).

Le taux de GSH évalué chez les adultes et les juvéniles d'*A. caliginosa* révèle une diminution significative après traitement au TSP et NPK à différentes périodes comparativement aux témoins avec un effet similaire pour les deux traitements. Des résultats similaires ont été signalés chez les adultes d'*Eisenia andrei* traités par le triclocarban après une exposition chronique de 42 jours (Sales Junior *et al.*, 2020). Par ailleurs, les teneurs en GSH dans l'hépatopancréas et les reins d'*Helix aspersa* exposé aux nanoparticules d'oxyde de cuivre ont montré une diminution significative, par rapport aux groupes témoins après 45 jours d'exposition (Benamara *et al.*, 2021). Par contre, les travaux de Mekahlia *et al.* (2016) ont montré une augmentation du taux de GSH chez *L. terrestris* après exposition à un herbicide (Sekator) et un engrais (TSP). Les travaux de Sales Junior *et al.* (2021) réalisés sur les effets sublétaux à long terme (56 jours) sur le système antioxydant des vers de terre *Eisenia andrei* après une exposition à une litière de volaille contaminée par des antibiotiques révèlent une corrélation négligeable entre le GSH et la GST indiquant les demandes du GSH dans le cycle redox du glutathion au lieu de son utilisation comme substrat du GST.

L'induction de l'activité de la GST et du GPx peut être corrélée à la réduction du taux du GSH entraînant un épuisement du statut antioxydant cellulaire (Radu *et al.*, 2010 ; Maity *et al.*, 2018). La carence en GSH pourrait être due au taux de consommation de GSH pour piéger les radicaux libres de manière non enzymatique ou dans une réaction catalysée par GPx via l'oxydation de deux molécules de GSH en une molécule de GSSG (glutathion oxydé) (Van der Oost *et al.*, 2003).

Cette diminution peut entraîner davantage de dommages liés au stress oxydatif (Elia *et al.*, 2003) tels que les lésions tissulaires (Kawamura & Muraoka, 2018). En fait, la conjugaison du

GSH avec un xénobiotique, soit spontanément, soit catalysé par GSH-S-transférases (GST), diminue la réactivité du xénobiotique et rend ces molécules plus solubles dans l'eau, et ils peuvent être plus facilement éliminés (Boyland & Chasseaud, 1969).

#### 4.1.2.3. Effet sur l'activité de la GPx

La glutathion peroxydase (GPx), connue comme la peroxydase la plus importante, assure la désintoxication du peroxyde et des hydroperoxydes en composés hydriques et hydroxyles, respectivement (Pinto *et al.*, 2003), de sorte qu'elle joue un rôle protecteur contre le stress oxydatif (Van Der Oost *et al.*, 2003). Les GPx constituent une famille d'enzymes capables de réduire des composés hydroperoxydes en composés hydroxyles correspondants en utilisant du glutathion ou des agents réducteurs équivalents comme co-substrats (Gladyshef *et al.*, 1998). La glutathion peroxydase est une importante oxydoréductase chez les êtres vivants qui pourraient piéger les radicaux libres et les lipides peroxydes pour protéger l'intégration de la structure et de la fonction de la membrane (Xiao *et al.*, 2013). Cette enzyme antioxydante exerce son rôle protecteur en agissant comme piègeur pour les concentrations élevées de peroxyde d'hydrogène ; au cours de ce processus, le glutathion est oxydé et perd sa capacité protectrice (Zhou, 2020).

L'activité spécifique de la GPx chez les juvéniles d'*A. caliginosa* marque une augmentation significative suite à une exposition à deux engrais, le NPK et le TSP comparativement aux témoins. Tandis que, le NPK n'exerce aucun effet chez les adultes à différents temps de traitement ; cependant, une induction de l'activité de ce biomarqueur a été constatée après traitement par le TSP. Des résultats identiques ont été également signalés chez *A. caliginosa* exposée pendant 4 semaines aux nanoparticules d'argent (AgNPs) et aux nitrates d'argent (AgNO<sub>3</sub>) (Saleeb *et al.*, 2020), et chez la même espèce soumise à un traitement par les éléments métalliques (Maity *et al.*, 2018). Les vers de terre d'*E. fetida* traités par l'AgNP ont montré une élévation de l'activité enzymatique du GPx après une exposition à long terme (Das *et al.*, 2018). En revanche, une induction marquée de cette enzyme a été observée chez l'escargot *E. vermiculata* exposé à l'engrais Weatfert (Attia *et al.*, 2021) et chez *Biomphalaria alexandrina* exposée à un engrais azoté (El-Deeb *et al.*, 2017). De plus, une induction de l'activité de cette enzyme a été signalée dans l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* traités par les nanoparticules de l'oxyde du fer NanoFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Besnaci *et al.*, 2019). L'exposition in vivo d'*Eisenia fetida* au plomb et à l'uranium n'a pas modifié l'activité de la GPx. Cependant, l'exposition in vitro au plomb a entraîné une réduction de son activité

et une augmentation après exposition à l'uranium (Labrot *et al.*, 1996). Par contre, l'activité de ce biomarqueur a été diminuée chez les vers de terre *E. fetida* traitée par l'arséniate (As-V) pendant 28 jours (Deng *et al.*, 2021).

L'augmentation de l'activité de cette enzyme est due à la demande accrue de l'organisme pour éliminer les éléments toxiques et gérer les dommages oxydatifs en réduisant le niveau de peroxydes (Elumalai *et al.*, 2007). La GPx élimine le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à l'aide du glutathion réduit, qui agit comme un donneur d'hydrogène, tandis que la glutathion réductase (GR) réduit le glutathion oxydé (GSSH) pour retenir le statut antioxydant cellulaire.

#### 4.1.2.4. Effet sur l'activité de la LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme glycolytique clé que l'on trouve dans presque tous les tissus des vers de terre (First *et al.*, 1991 ; Shekari *et al.*, 2008). Elle existe dans le cytoplasme de toutes les cellules et est libérée par le cytoplasme en réponse à des dommages à la membrane plasmique cellulaire (Kaja *et al.*, 2015). Par conséquent, la LDH extracellulaire libérée par les cellules endommagées pourraient agir comme un indicateur de cytotoxicité (Han *et al.*, 2011). Cette importante enzyme métabolique catalyse la conversion du pyruvate en lactate dans la glycolyse anaérobie (Tripathi *et al.*, 2011 ; Nayak *et al.*, 2018). Ce biomarqueur joue un rôle clé dans le maintien de l'équilibre entre le catabolisme et l'anabolisme des glucides (Chen *et al.*, 2001). Il a été également utilisé comme indicateur d'exposition au stress (Diamantino *et al.*, 2001). Pour évaluer la toxicité de tout xénobiotique, y compris les pesticides et les métaux lourds ainsi que le diagnostic des dommages des cellules, des tissus et des organes, le LDH a été largement exploité chez les vertébrés. Toutefois, dans les essais de toxicité des invertébrés, le potentiel de cette enzyme comme indicateur est rarement exploré (Ribeiro *et al.*, 1999 ; Nathan *et al.*, 2006 ; Rishch *et al.*, 2012). L'activité extracellulaire de cette enzyme augmente sous condition du stress oxydatif, car l'intégrité cellulaire peut être perturbée pendant le processus de la peroxydation lipidique (Jovanovic *et al.*, 2010).

Les résultats ont montré que l'activité de la lactate déshydrogénase augmentait en réponse au traitement par les engrais ; NPKs et TSP appliqués sur les juvéniles d'*A. caliginosa* à différentes périodes, tandis qu'aucun effet n'a été mentionné chez les adultes. Cette augmentation a été également observée chez l'espèce *Glyphidrilus tuberosus* exposée à des concentrations élevées de phosphogypse (PG) (Nayak *et al.*, 2018). Les résultats d'Abd-El

Azeem & Sheir (2018) révèlent une augmentation significative de l'activité de la LDH chez *Deroceras reticulatum* exposé à l'engrais Caselio. De plus, une augmentation de ce biomarqueur a été signalée chez l'escargot terrestre, *Eobania vermiculata* exposé au méthomyl (Khalil, 2016) et à l'engrais weatfert (Attia *et al.*, 2021). L'herbicide atrazine a causé l'augmentation de l'activité de cette enzyme chez les vers de terre *Eisenia fetida* après 28 jours d'exposition (Lammertyn *et al.*, 2021). Cependant, Rico *et al.* (2016) a montré une activation de cette enzyme après l'application de cinq pesticides (trichlorfon, diméthoate, carbendazime, tébuconazole et prochloraz) sur *E. fetida* pendant 14 jours.

La lactate déshydrogénase est une enzyme anaérobie associée à la production d'énergie, en particulier lorsque l'organisme a besoin d'une quantité d'énergie supplémentaire en courte période (Diamantino *et al.*, 2001 ; Tripathi *et al.*, 2011). L'élévation de l'activité de la LDH pourrait être le résultat de la synthèse accrue de cette enzyme pour se défendre contre le stress et augmenter les sources de production d'énergie par la dégradation des nucléotides et des acides aminés riches en énergie (Mosleh *et al.*, 2003).

#### 4.2 Effet des engrais chimiques sur la composition biochimique

Edwards (1985) a rapporté que la matière sèche d'un corps de ver de terre contient 60 à 70% de protéines, 7 à 10% de matières grasses, 8 à 20% de glucides, 2,3% de minéraux et une variété de vitamines. Les paramètres biochimiques des organismes exposés à des contaminants toxiques ont été utilisés comme biomarqueurs et peuvent être considérés comme un outil de diagnostic important pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (McLoughlin *et al.*, 2000). Les changements dans les réserves d'énergie et/ou la consommation d'énergie ont été utilisés comme biomarqueurs du stress toxique (Świątek & Bednarska, 2019). Ces changements indiquent des modifications dans le métabolisme et la fonction cellulaire d'un organisme (Montanha *et al.*, 2014). Pendant le stress, les organismes ont besoin de plus d'énergie pour détoxifier, biotransformer et excréter les toxiques dans le but de minimiser leurs effets (Khalil, 2016). D'autre part, l'excès de ROS peut entraîner des dommages au niveau de la structure des organites et des biomolécules conduisant à la carbonylation des protéines oxydatives, à la peroxydation lipidique, à la rupture et la destruction de la structure membranaire, qui provoquent en outre une nécrose, une apoptose ou même une mutagénèse (Yu *et al.*, 2020).

Très peu d'études ont été réalisées pour tester les effets des engrais sur le profil biochimique des vers de terre. L'exposition à un polluant peut avoir un impact sur la croissance d'un ver de terre, soit par des effets toxiques directs sur l'organisme, soit indirectement, en ayant un impact sur le bilan énergétique de l'organisme qui tente de détoxifier le contaminant (Spurgeon & Hopkin, 1996). C'est particulièrement important pour les vers de terre juvéniles, car cela réduira la quantité d'énergie disponible pour la maturation et se traduira par une maturation plus lente et un retard dans la production des cocons (Booth & O'Halloran, 2001). En période d'apport alimentaire excessif à celui indispensable pour l'entretien, la croissance et la reproduction, l'excès d'énergie est stocké dans divers organes sous forme de glycogène ou de lipide. Ces réserves sont ensuite mobilisées en période d'insuffisance de l'approvisionnement en nourriture pour fournir de l'énergie (Scott-Fordsmand & Weeks, 2000). Le stockage de ces composés peut être affecté par les facteurs de stress physiologiques, mais peuvent également être influencés par les facteurs de stress chimiques (Mayer *et al.*, 1992). Dans ces conditions de stress, les vers de terre ont besoin plus d'énergie pour détoxifier la substance toxique. Lorsque ces derniers ont une quantité limitée de glucides et de lipides, la source d'énergie alternative pour répondre à la demande accrue d'énergie est les protéines. Ces dernières sont des composants constitutifs qui ne peuvent alimenter le métabolisme qu'en cas de carence énergétique extrême (Świątek & Bednarska, 2019). La réduction du contenu en protéine indiquait une altération métabolique au niveau cellulaire (Xu *et al.*, 2021).

Le stress subléthal des toxiques peut induire des changements compensatoires dans le métabolisme énergétique des organismes en raison de l'augmentation des dépenses énergétiques associée au processus de désintoxication (Holmstrup *et al.*, 2011). Étant donné que la majeure partie de la consommation d'énergie d'un organisme est utilisée pour la croissance, la reproduction et le métabolisme de base. Cet état de stress peut entraîner une réduction de la croissance et de la reproduction (Maltby, 1999). Il a été démontré que la différence entre les réserves d'énergie disponibles et la consommation d'énergie est révélatrice de l'état général d'un organisme, et que cela est corrélé avec des niveaux plus élevés d'organisation biologique tels que les taux de croissance de la population (De Coen & Janssen, 2003). Chez les vers de terre, la variabilité naturelle du niveau de ces réserves est mal connue, bien que chez d'autres organismes, il a été démontré qu'il varie en fonction de certains facteurs tels que la disponibilité des aliments, le stade de croissance et le stade de reproduction (Scott-Fordsmand & Weeks, 2000).

Les protéines considérées comme le matériau de construction des tissus, sont impliquées presque dans toutes les fonctions physiologiques. Elles sont toujours proportionnelles à la croissance des vers (Shankerappa, 2013). La teneur en protéines chez les vers de terre montre une variabilité considérable entre différentes espèces et sous différents traitements chez la même espèce, cela peut-être en raison de la variabilité de l'étendue de l'inclusion intestinale (Sun & Jiang, 2017). Nos résultats montrent que le traitement des adultes et des juvéniles d'*A. caliginosa* par le NPKs et le TSP induit une modification du taux de protéines en le diminuant avec un effet marqué du TSP. Des résultats similaires ont montré que la concentration des protéines solubles diminue chez les vers traités avec des pesticides, cela suggère une activation des mécanismes compensatoires physiologiques pour fournir des intermédiaires pour dériver de l'énergie (Mosleh *et al.*, 2003). Cependant, les résultats de Gao *et al.* (2013) ont montré que la teneur en protéines a augmenté lorsque les vers de terre, *E. foetida* ont été exposés au propiconazole et au difénoconazole, cette augmentation pourrait être une contribution au mécanisme de défense contre le stress chimique.

D'autres études ont signalé la diminution de la teneur en protéines et des activités enzymatiques en réponse aux produits agrochimiques (Ismail *et al.*, 1997). Cette réduction peut être due à un catabolisme protéique en réponse à la demande d'énergie des vers à cause du stress oxydatif induit par ces engrais chimiques. L'activation des enzymes du stress oxydatif est probablement due aux effets des ROS qui attaquent les résidus hydrophobes des acides aminés, contribuant à la rupture des liaisons peptidiques et interférant avec la fonction de ces protéines (Ahmad *et al.*, 2017 ; Murray Stewart *et al.*, 2018). De plus, ces protéines soumises à des dommages oxydatifs peuvent subir une carbonylation (Nyström, 2005), et les protéines carbonylées forment des agrégats chimiquement irréversibles entraînant la perte permanente de leurs fonctions (Amici *et al.*, 1989 ; Dalle-Donne *et al.*, 2006) et aboutissant à un dysfonctionnement cellulaire (Kwak & An, 2015 ; Li *et al.*, 2015).

En revanche, la teneur en protéines a augmenté de façon significative après exposition de *L. terrestris* au TSP et aucun effet n'a été rapportée par le sekator (Mekahlia *et al.*, 2016). Cette augmentation pourrait indiquer une adaptabilité physiologique de ces vers pour compenser le stress et le développement de défenses cellulaires en réponse à l'impact des pesticides et des engrais. De plus, l'accumulation de ces protéines pourrait être nécessaire pour restaurer les enzymes et compenser les pertes tissulaires suite à la nécrose induite par l'exposition au sekator ou au TSP (Mosleh *et al.*, 2006). De même, Mosleh *et al.* (2006) ont observé des

changements de la teneur en protéines chez les vers aquatiques *Tubifex tubifex* exposés au cuivre.

Les glucides sont la première source d'énergie mobilisée par les organismes soumis à un stress toxique (Moolman *et al.*, 2007). La graisse corporelle des vers de terre contient un système enzymatique nécessaire pour convertir le glucose en acide gras et en glycérol, ceux-ci sont incorporés dans les phospholipides neutres, les triglycérides et les phosphatidylcholines qui sont impliqués dans la croissance de l'organisme (Mosleh *et al.*, 2003). Dans notre étude, les engrais testés, NPK et TSP ont provoqué une réduction significative des réserves énergétiques, traduite par une réduction du taux de glucides avec un effet marqué du TSP. Des résultats identiques ont été soulignés chez *E. fetida* après traitement avec le sodium fluoride (NaF) et au calcium fluoride (CaF<sub>2</sub>) dont la teneur en glycogène du tissu chlorogène a été réduite (Vogel & Seifert, 1992). Par conséquent, l'effet néfaste de ces produits sur les niveaux de glucides chez les vers de terre peut contribuer à la réduction de leur taux de croissance (Mosleh *et al.*, 2003). L'exposition du ver de terre *E. andrei* au Zn a entraîné une augmentation de la consommation d'énergie au niveau cellulaire, reflétant la demande d'énergie relativement élevée pour répondre au stress toxique, mais aucun effet n'a été observé au niveau de l'ensemble du corps (Świątek & Bednarska, 2019). Certains facteurs tels que la contamination par les métaux et les caractéristiques du sol influencent la teneur en glycogène, en protéines et en lipides chez *A. caliginosa* avec un épuisement de 50% des réserves d'énergie (Beaumelle *et al.*, 2014). Les réserves énergétiques ont été trop affectés chez *A. chlorotica* après contamination par les pesticides (Givaudan *et al.*, 2014). Mêmes observations ont été constatées chez *L. rubellus* suite à son exposition sublétales au cuivre. Cette modification du métabolisme énergétique est probablement liée à l'interférence du cuivre avec la fonction mitochondriale et la réduction de la quantité d'énergie libérée à partir de la phosphorylation oxydative (Bundy *et al.*, 2008).

L'épuisement de glucides observé peut être produit en raison d'une hypoxie, car les conditions hypoxiques ont tendance à augmenter l'utilisation des glucides (De Zwaan & Zandee, 1972). De plus, les polluants causent plusieurs types d'hypoxie environnementale qui entraîne l'épuisement rapide des glucides stockées (Heath & Pritchard, 1965). En outre, le glycogène est considéré comme étant rapidement mobilisé lorsque les organismes font face à une demande d'énergie, tandis que les protéines et les lipides sont considérées comme des réserves à long terme (Levesque *et al.*, 2002).

Les lipides constituent le carburant énergétique privilégié proposé aux tissus en cas de besoins après les glucides. Pendant les périodes de stress chronique, ils constituent aussi une autre source d'énergie (Padmaja & Rao, 1994). Les lipides jouent un rôle extrêmement important dans le fonctionnement normal d'une cellule. Ils représentent non seulement une forme de stockage d'énergie, mais ils jouent également un rôle intime dans la structure des membranes cellulaires et des organites présents dans la cellule (Kandil *et al.*, 2009). Dans notre étude, une diminution du taux des lipides totaux a été notée chez les vers de terre adultes et juvéniles d'*A. caliginosa* après le traitement par le NPK et le TSP. Des résultats similaires ont été mentionnés dans les travaux de Vogel & Seifert (1992) sur l'effet de quatre fluorures administrés à des concentrations sublétales sur l'espèce *Eisenia fetida* montrant une diminution de la teneur en lipides après exposition à ces traitements. De plus, ce composé biochimique avait tendance à diminuer après exposition de l'espèce *A. caliginosa* au Pb et à augmenter avec le Zn (Beaumelle *et al.*, 2014). Par contre, aucun effet n'a été mentionné chez *Eisenia andrei* exposée aux nanoparticules de zinc (Świątek & Bednarska, 2019).

#### 4.3. Bioaccumulation des engrais

La croissance démographique n'a laissé aucun choix pour utiliser les engrais et les pesticides pour répondre à la demande alimentaire mondiale croissante (Laucka *et al.*, 2020). Les vers de terre sont la faune dominante et la plus importante de toute la macrofaune du sol. Par conséquent, chaque changement dans la composition du sol affecte les vers de terre directement ou indirectement. Plusieurs études ont été menées pour démontrer les effets nocifs des pesticides et des engrais sur le sol. Les organismes vivants sont continuellement exposés à une multitude de produits chimiques. Ces polluants présentent un risque mondial suite à leur persistance dans la nature, leurs propriétés toxiques et leur bioaccumulation dans la chaîne alimentaire (Guo *et al.*, 2008 ; Eqani *et al.*, 2012). Les vers de terre sont considérablement affectés par les xénobiotiques du sol en raison de leur interaction particulière avec le substrat du sol ; soit par l'ingestion de l'eau interstitielle contenant des polluants dissous, soit par l'absorption de contaminants portés sur des particules solides adsorbés au sol par la voie digestive (Dawood *et al.*, 2017). Une étude pertinente a rapporté que les vers de terre peuvent absorber les polluants par des processus épidermiques et intestinaux (Hirano & Tamae, 2011 ; Huang *et al.*, 2017 ; Zhu *et al.*, 2021).

Les vers de terre constituent environ 60-80% de la biomasse du sol, accumulent et transfèrent la plupart des polluants du sol à d'autres animaux de la chaîne alimentaire (Chevillot *et al.*,

2017). Ils représentent un organisme sentinelle idéal pour évaluer la contamination du sol, car ils sont en contact avec le sol et la solution du sol, ont tendance à migrer sur de courtes distances et sont largement distribués dans les sols dans le monde entier (Carter *et al.*, 2020). L'épiderme des vers de terre est en contact direct avec les sols contaminés et est considéré comme une voie importante d'absorption des substances toxiques (Reddy & Rao, 2008). Les espèces de vers de terre *Lumbricus rubellus* et *Aporrectodea caliginosa*, représentent les animaux qui sont en contact étroit avec l'eau interstitielle du sol et qui ont un épithélium de surface perméable à l'eau (Vijver, 2005). L'absorption des composés solubles dans l'eau se produit principalement par diffusion à travers la peau parce qu'ils sont faiblement absorbés par les composants du sol et sont donc biodisponibles dans l'eau interstitielle (Carter *et al.*, 2016a, 2016b). La biodisponibilité des contaminants solubles dans l'eau peut varier en fonction du pH, de la matière organique et de la teneur en argile (Carter *et al.*, 2016a, 2016b ; Karlsson *et al.*, 2016).

Les vers de terre ont le potentiel d'absorber et d'accumuler divers produits organiques et polluants inorganiques du sol (Morrison *et al.*, 2000). Ils sont une source majeure de nourriture pour d'autres animaux comme les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères, et la bioaccumulation des xénobiotiques par ces derniers est caractérisée par le risque de transfert de polluants à des niveaux trophiques plus élevés (Marino *et al.*, 1992).

Selon Dawood *et al.* (2017), les vers de terre sont bien adaptés pour servir comme bioindicateurs d'accumulation des produits chimiques dans le sol pour leur :

- ✓ Disponibilité dans une grande variété de sols,
- ✓ Caractéristiques morphologiques spécifiques, permettant d'absorber les contaminants directement à partir du sol.
- ✓ Surface épidermique extérieure vascularisée sans cuticule, permettant l'absorption directe des contaminants du sol.
- ✓ Ingestion du sol fournissant un moyen pour l'absorption alimentaire des contaminants.

L'analyse des résidus par la technique FRX effectuée sur les adultes d'*A. caliginosa* traités avec la DL<sub>50</sub> du NPKs et TSP ont montré une faible accumulation pour les deux traitements après 1 mois d'exposition. Les enzymes de détoxification contribuent à réduire ou à éliminer la toxicité des polluants, protégeant ainsi les organismes (Ye *et al.*, 2020). Les vers de terre d'*A. caliginosa* exposés à des concentrations élevées d'AgNO<sub>3</sub> et AgNP pendant 4 semaines

montrent que les vers exposés à l'AgNO<sub>3</sub> accumulaient des concentrations d'argent plus élevées que ceux qui sont exposés à l'AgNP (Saleeb *et al.*, 2020). De plus, les résultats de Huang *et al.* (2020) ont révélé que les vers de terre épigés *Metaphire californica* accumulent plus le Cd, tandis que les vers de terre endogés, *Amyntas hupeiensis* et les vers de terre anéciques, *Amyntas asacceus* accumulent plus le Cu et le Zn provenant du sol. La bioaccumulation des xénobiotiques chez les vers de terre, *Eisenia fetida* augmente avec l'augmentation du niveau d'exposition (Chen *et al.*, 2017). Il semble que les différents métaux lourds s'accumulent dans les vers de terre à des vitesses différentes, et ces différences peuvent être attribuées à l'espèce, à la concentration appliquée et à la durée d'exposition (Saleeb *et al.*, 2020).

Les vers de terre absorbent généralement les contaminants par diffusion passive via l'épiderme à partir de l'eau interstitielle du sol et de l'absorption intestinale après ingestion orale de particules du sol (Wang *et al.*, 2014). La contribution de ces deux voies dépend des stratégies écologiques, et des comportements alimentaires. Il a été rapporté que l'espèce épigée *E. fetida* absorbe principalement les polluants organiques via l'épiderme. Alors que *Metaphire guillelmi* les a pris par ingestion de particules du sol en raison de leur nature géophage, montrant ainsi une accumulation plus élevée du tétrabromobisphénol A (TBBPA) qu'*E. fetida* durant 21 jours d'exposition (Chen *et al.*, 2017). Divers facteurs environnementaux, notamment le pH, la conductivité électrique, le carbone organique, la teneur en azote, la température atmosphérique, la température du sol, l'humidité du sol, l'humidité et les précipitations, jouent un rôle majeur dans l'absorption et la bioaccumulation des xénobiotiques du sol au niveau des vers de terre (Dawood *et al.*, 2017). Cependant, avec l'environnement particulier du sol, la bioaccumulation dépend principalement de la concentration, de la spéciation chimique (biodisponibilité chimique), et sur la distribution spatiale (biodisponibilité physique) du produit chimique (Dawood *et al.*, 2017).

Une relation négative entre le degré d'accumulation de métaux dans les vers de terre et la teneur du sol en argile qui a été signalée par Van Gestel *et al.* (1992), cela pourrait s'expliquer par une diminution de la disponibilité des métaux dans l'eau interstitielle due à leur adsorption sur les particules d'argile. Les résultats de la bioaccumulation des engrais obtenus au cours de notre étude peuvent être expliqués par la texture du sol indigène utilisé et notre espèce choisie, *A. caliginosa* qui appartient à un groupe d'endogés vivant dans les premiers 25 cm du sol et se nourrissent principalement de la matière organique (Bouche, 1977). Cela a

été confirmé par [Dawood et al. \(2017\)](#) qui indiquent que la bioaccumulation des xénobiotiques chez les vers de terre est très variable et dépend de certains nombres de facteurs tels que ; l'espèce testée, les propriétés physico-chimiques des xénobiotiques et le type du sol et ses caractéristiques physico-chimiques.

De plus, les résultats de [Jiang et al. \(2021\)](#) ont montré que la faible accumulation des polluants dans le corps des vers de terre est due à leur élimination rapide. La proportion accumulée dépend de la physiologie du ver de terre, de son comportement et de la voie d'exposition. Seul le produit chimique dissous dans la solution du sol qui est absorbé par la voie cutanée ([Belfroid et al., 1996](#)). Cependant, le sol ingéré sera soumis aux conditions chimiques présentes dans le tractus gastro-intestinal (présence d'enzymes digestives, de surfactants, différence de pH par rapport au sol ambiant), ce qui se traduit théoriquement par la différence de proportion du produit chimique total présent en solution et celle disponible pour absorption. Une fois absorbé, le produit chimique peut être métabolisé et excrété, accumulé dans d'autres tissus, séquestré à l'intérieur ou transporté dans l'organisme au site d'action toxique ([Lanno et al., 2004](#)).

La majorité des études de bioaccumulation des xénobiotiques au niveau des tissus des vers de terre s'intéressait aux pesticides et aux métaux lourds. Peu de travaux ont été réalisés sur les engrais. Leur accumulation est parfois en dessous de limites de détection et elle suit cet ordre : engrais phosphorés P > engrais potassiques K > engrais azotés N ([Molina et al., 2009](#)).

#### 4.4. Effet des engrais sur la structure histologique

Les vers oligochètes ont une épaisse couche de mucus qui entoure l'épiderme ([Laverack, 1963](#)), à travers laquelle la respiration et l'excrétion des déchets se produisent. Ce qui rend les vers de terre sensibles à la perte d'eau ([Vijver, 2005](#)). La barrière extérieure de la paroi corporelle est une mince cuticule chitineuse, qui protège le ver de terre des abrasions et de la déshydratation excessive. Sous la cuticule, la couche épidermique contient des glandes et des cellules réceptrices nerveuses spécialisées. Deux couches musculaires bien définies sont présentes sous l'épiderme, une couche musculaire circulaire et une couche musculaire longitudinale. La locomotion est coordonnée par des contractions de ces différents groupes de muscles ([Roberts & Dorough, 1985](#)).

L'intestin qui forme la plus grande partie du canal alimentaire contient le typhlosole, un repliement dorsal de l'épithélium intestinal augmentant efficacement la surface interne, la

sécrétion et la surface absorbante. Les cellules épithéliales spécialisées, appelées cellules chloragènes, se trouvent près de l'intestin et près des vaisseaux sanguins et des néphridies (Roberts & Dorough, 1985).

L'exposition à des substances toxiques peut produire des perturbations biochimiques, histologiques ou morphologiques, traduite par des altérations spécifiques d'un organe, d'un système ou d'une fonction. Ces effets varient selon l'intensité, la voie, la fréquence et la durée de l'exposition mais aussi en fonction de l'espèce, le sexe, et l'âge des populations exposées. Ils peuvent être réversibles ou irréversibles, immédiats ou différés (Moussavou Moudouma, 2010). Les changements histopathologiques des vers de terre sont de plus en plus utilisés pour surveiller les polluants dans l'environnement du sol (Duo *et al.*, 2022).

Les observations histologiques et cytologiques sont des outils précieux pour évaluer les effets toxiques des contaminants chez plusieurs espèces dont les vers de terre (Morgan & Turner, 2005 ; Giovanetti *et al.*, 2010 ; Oluah *et al.*, 2010 ; Kiliç, 2011 ; Samal *et al.*, 2019 ; Gowri & Thangaraj, 2020). Les marqueurs histopathologiques sont des lésions tissulaires qui peuvent signaler des effets délétères résultant d'une exposition antérieure ou continue à un ou plusieurs agents toxiques (Reddy & Rao, 2008). Les altérations histopathologiques représentent un bon biomarqueur pour l'évaluation de la qualité du sol (Lourenço *et al.*, 2011). Des études récentes ont rapporté les effets histopathologiques des pesticides sur les vers de terre car l'étude histopathologique est la méthode la plus utile pour analyser le niveau des dommages tissulaires dans un organisme fournissant des informations détaillées sur la croissance, les dommages et le désordre dans les tissus sous l'influence de pesticides agricoles, déchets industriels, et déchets organiques (Bansiwal & Rai 2010 ; Yuvaraj *et al.*, 2018).

Nos résultats ont montré que les engrais chimiques affectent les téguments et la paroi intestinale par la mise en évidence de lésions au niveau de l'épithélium, des nécroses cellulaires, avec une destruction du muscle circulaire et détachement des fibres musculaires longitudinales. De plus, on a remarqué l'apparition d'un épiderme irrégulier. En ce qui concerne la paroi intestinale ; des altérations ont été signalées telles que le fusionnement des plis intestinaux avec quelques décollements au niveau du tissu chloragène, le détachement au niveau des muscles circulaires et longitudinaux et le rétrécissement de la paroi. Le traitement par le NPK affecte le plus les téguments tandis que le traitement par le TSP touche beaucoup plus la paroi intestinale.

L'application de certains produits agrochimiques sur *E. eugeniae* a induit des lésions épidermiques, une désintégration du tissu conjonctif, et une vacuolisation du derme (Samal *et al.*, 2019). Des changements histopathologiques ont été signalés chez *E. fetida*, *A. caliginosa* et *L. terrestris* après une exposition à un insecticide, l'imidaclopride à diverses concentrations (Dittbrenner *et al.*, 2011). De plus, les résultats obtenus par Shefali *et al.* (2018) ont montré que les métaux lourds, à savoir l'arsenic et le chrome appliqués sur le ver épigé, *Eudrilus eugeniae* engendrent un endommagement de la paroi intestinale représenté par fusion des villosités et nécrose. Par ailleurs, l'étude histopathologique et histochimique de l'intestin du ver de terre, *Pheretima elongata* exposé à l'herbicide glyphosate a montré une altération des membranes cellulaires et une nécrose (Morowati, 2000). Les manifestations histopathologiques ont été observées après l'exposition du ver de terre, *Nsukkadrilus mbae* à l'herbicide atrazine comprenaient des dommages au niveau de la couche chloragène et du tissu épithélial et élargissement glandulaire du tissu épithélial (Oluah *et al.*, 2010). De plus, des altérations importantes telles que la perte de l'intégrité structurelle de la couche épithéliale, lésion du tissu intestinal sous forme de vacuolisation et dégénérescence du tissu chloragène et fusion de villosités intestinales ont été observées chez le ver de terre, *Eisenia fetida* exposé aux boues de l'industrie de transformation du lait et qui ont conduit à une réduction de la zone d'absorption des nutriments. Simultanément, le processus d'intoxication consomme l'énergie des réserves du tissu chloragène (Kaur *et al.*, 2019). De plus, de graves dommages dans la couche tissulaire chloragène ont été détectés chez *E. fetida* exposée à l'AgNP (Das *et al.*, 2018). El-Deeb *et al.* (2015) ont enregistré des altérations histologiques au niveau des glandes digestives des escargots *Biomphalaria alexandrina* exposés aux engrais inorganiques. L'examen histopathologique d'*E. fetida* après une exposition de 28 jours à un métal montre une altération de la couche musculaire circulaire et une désintégration de la couche longitudinale (Liang *et al.*, 2017). Des effets similaires ont été signalés chez deux espèces de vers de terre, *Eudrilus eugeniae* et *Perionyx barotensis* traitées par le pesticide monocrotophos, représentés par la rupture du tissu chloragène, du muscle longitudinal, le fusionnement des villosités et la rupture des cellules nécrotiques dans la paroi corporelle du ver de terre (épiderme, muscles circulaires et longitudinaux) (Gowri & Thangaraj, 2020).

Une fois l'épithélium est endommagé, les contaminants du sol peuvent facilement pénétrer dans l'organisme (Duo *et al.*, 2022). Les lésions épidermiques graves des vers de terre pourraient nuire à la respiration cutanée. La synthèse biochimique des protéines tissulaires et des enzymes vitales semble être affectée par l'accumulation de ces produits chimiques dans

les tissus du ver de terre. Il est évident que les altérations morphologiques, histologiques et biochimiques constatées chez *E. eugeniae* pourraient être utilisées comme biomarqueurs pour évaluer la toxicité de certains polluants (Samal *et al.*, 2019). Le tissu chloragogène qui représente le site principal d'accumulation des contaminants (Morgan *et al.*, 2002 ; Giovanetti *et al.*, 2010), est l'équivalent métaboliquement aux cellules du foie des animaux supérieurs (Roots, 1960 ; Laverack, 1963). Ces cellules semblent jouer un rôle dans l'élimination et la désintoxication des déchets et des xénobiotiques (Roberts & Dorough, 1985). Les altérations morphologiques observées au niveau de ce tissu est l'indicateur principal de la manipulation de plus grandes quantités de substances toxiques (Morgan *et al.*, 2002). L'élimination de ces toxiques peut être obtenue par l'extrusion entières des chloragocytes (Cancio *et al.*, 1995), qui permettent aux vers de terre de tolérer les substances toxiques (Langdon *et al.*, 2001). Cependant, ces cellules peuvent devenir mobile et subir ensuite une autolyse et libérer leur contenu dans le liquide coélomique pour être excrété (Fischer, 1977 ; Laverack, 1963) ; les petites particules sont excrétées par les néphridies, tandis que les plus grosses sont extrudés à travers la surface du corps. Cependant, ces cellules ou leurs extrémités brisées sont transportées dans les régions de la croissance et la réparation, ou aux organes reproducteurs, ou à tout site où un apport supplémentaire de nourriture peut être nécessaire (Muthukaruppan *et al.*, 2005).

Les vers de terre sont considérés comme extrêmement sensibles aux changements environnementaux et à la toxicité due aux xénobiotiques. Avec une toxicité accrue, les vers deviennent agités et pour surmonter les effets toxiques, ils ont besoin d'une énorme quantité d'énergie obtenue par autolyse de leur propre tissu, principalement de la région postérieure (Rao *et al.*, 2003). Mikkelsen *et al.* (2004) ont signalé une contraction musculaire inhabituelle due au stress qui peut conduire à une absorption élevée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les tissus, entraînant une perte de l'intégrité cellulaire. Ce qui a été confirmé par Nayak *et al.* (2018) qui ont montré que les changements des propriétés chimiques du sol dus à l'ajout du phosphogypse (Pg) utilisé comme supplément de soufre et de calcium dans les sols agricoles, causent généralement des contractions musculaires rapides chez les vers de terre. La perte des fibres musculaires peut être attribuée à une absorption accrue de  $\text{Ca}^{2+}$  par les vers sous stress, ce qui est susceptible d'avoir un impact négatif sur la fonction locomotrice de l'animal dans le sol et son rôle vital en tant que macrodécomposeur.

Les vers de terre sont continuellement exposés aux produits chimiques du sol par leurs muqueuses digestives et leur peau, et dépendent des systèmes de désintoxication efficaces pour leur survie (Kiliç, 2011). En cas de lésion tissulaire, les cellules chloragènes sont capables de migrer vers la plaie où le tissu perdu et le régénérer (Morgane *et al.*, 2002 ; Reddy & Rao, 2008). Les altérations de l'activité des cellules chloragènes produites par l'exposition à des concentrations élevées de pesticides sont susceptibles d'être responsables du déficit observé dans les activités enzymatiques et peuvent être prises en compte comme précurseurs des effets létaux et sublétaux (Rico *et al.*, 2016).

*CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES*

## V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En agriculture, les engrais chimiques sont administrés en vue d'augmenter le rendement des cultures. Ils sont responsables d'une pollution massive des sols, mais sont surtout la principale cause de pollution d'air et d'eau et affectent non seulement les organismes ciblés, mais aussi les espèces non ciblées comme les vers de terre qui ont une importance primordiale dans la production primaire ; puisque qu'ils jouent un rôle essentiel dans la formation et l'entretien des sols fertiles et de leurs effets sur le recyclage des éléments nutritifs, le maintien de la fertilité et la structure des sols. Les vers de terre naturellement en contact avec les phases solides et aqueuses du sol, ingèrent de grandes quantités de sol et sont donc directement exposés à des contaminants provenant de l'utilisation intensive des biocides (herbicides et insecticides) et produits agrochimiques dans l'agriculture, des activités industrielles et des dépôts atmosphériques.

Le travail réalisé, nous a permis d'évaluer les effets de deux engrais chimiques, NPKs et TSP appliqués sur deux stades de développement (adulte et juvénile) d'une espèce bioindicatrice de pollution ; le ver de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la mortalité, la croissance, les biomarqueurs de stress oxydatif, enzymatiques tels que les glutathion S-transférases (GSTs), la glutathion peroxydase (GPx) et la lactate déshydrogénase (LDH), et non enzymatiques, le glutathion (GSH). D'autre part, la bioaccumulation et l'étude histologique ont été également déterminées chez les vers adultes.

La croissance des vers adultes et juvéniles a été réduite après exposition aux engrais : NPKs et TSP à différentes périodes testées. Cette réduction traduite par une augmentation du taux d'inhibition de la croissance correspond à des effets inhibiteurs sur la prise de poids engendrés par le traitement. Cette inhibition peut s'expliquer par une réduction des réserves énergétiques, allouées à la croissance (contenu en lipides et en glucides) dans les cellules de stockage des tissus.

L'évaluation de l'effet des engrais chimiques NPKs et TSP sur les biomarqueurs du stress oxydatif, indique que ces derniers induisent l'activation du système de détoxification par le biais d'une élévation significative de l'activité des GSTs, GPx et LDH et une diminution du GSH au cours de la période de traitement comparativement aux témoins.

L'étude de la composition biochimique montre que ces deux engrais inorganiques induisent un épuisement des réserves énergétiques (glucides et lipides) et une perturbation du contenu en protéines chez les adultes et les juvéniles d'*A. caliginosa*.

Les résultats de l'analyse des résidus obtenus par la technique FRX montrent que les engrais chimiques ont été accumulés dans les vers de terre, mais avec un faible taux d'accumulation. Finalement, l'application des deux engrais avec la DL<sub>50</sub> a induit une altération de la structure histologique du tégument et de la paroi intestinale.

On peut conclure que l'espèce *A. caliginosa* peut être utilisée comme bioindicateur de pollution terrestre pour évaluer les risques écologiques liés à l'application des engrais chimiques et des produits phytosanitaires dans le sol.

A l'avenir, il serait intéressant de compléter le présent travail en évaluant les effets de ces engrais inorganiques sur :

- ✓ Le comportement d'évitement
- ✓ La reproduction et le potentiel reproducteur
- ✓ Les enzymes digestives
- ✓ Le liquide cœlomique
- ✓ La génotoxicité pour envisager les effets sur l'ADN et l'ARN
- ✓ L'ultrastructure des tissus
- ✓ D'autres biomarqueurs de stress tels que ; superoxyde dismutase (SOD), cytochrome P450 (CYP 450) et protéines de choc thermique (HSP70).

Il serait également intéressant d'effectuer une étude *in situ* pour voir les effets dans les conditions naturelles sur terrain.

# *RESUMES*

## VI. RESUME

La présente étude a été menée afin d'étudier les effets de deux engrais chimiques, NPKs et triple superphosphate (TSP) appliqués à deux doses (DL<sub>25</sub> et DL<sub>50</sub>) sur les adultes et les juvéniles d'un ver de terre bioindicateur de pollution, *Aporrectodea caliginosa*, espèce dominante dans la région de Tébessa (Nord-Est de l'Algérie).

Les effets de ces deux engrais chimiques ont été examinés sur la mortalité, la croissance, les biomarqueurs enzymatiques (GSTs, GPx et LDH) et non enzymatique (GSH) et la composition biochimique (protéines, glucides, lipides) des adultes et des juvéniles d'*A. caliginosa*. La bioaccumulation et l'étude histologique ont été également déterminées chez les adultes traités à la DL<sub>50</sub>.

La croissance des vers adultes et juvéniles a été perturbée après exposition aux deux engrais (NPK et TSP) au cours de la période du traitement. L'étude biochimique montre que les traitements réduisent le contenu en protéines et les réserves énergétiques, reflétant la demande d'énergie relativement élevée pour répondre au stress toxique. Les engrais peuvent modifier la synthèse de métabolites et perturber certaines de ses fonctionnalités.

Par ailleurs, les biomarqueurs enzymatiques et non-enzymatiques déterminés chez les adultes et les juvéniles traités par NPKs et TSP à la (DL<sub>25</sub> et DL<sub>50</sub>) ont révélé une induction du système de détoxification, traduite par une augmentation de l'activité des GSTs, GPx et LDH et une diminution du taux du GSH.

Les engrais chimiques ont été accumulés dans les vers de terre, mais avec un faible taux de bioaccumulation. En plus, l'étude histologique des adultes traités à la DL<sub>50</sub> révèlent des modifications au niveau des téguments et de la paroi intestinale comparativement aux témoins. Ces résultats trouvés pourraient être utiles pour l'évaluation des écosystèmes terrestres contaminés en utilisant *A. calliginosa* comme bioindicateur de pollution terrestre et évaluer et les risques écologiques des engrais inorganiques dans le sol.

**Mots clés :** *Aporrectodea caliginosa*, Engrais, Mortalité, Croissance, Biomarqueurs, Composition biochimique, Bioaccumulation, Histopathologie.

**ABSTRACT**

The present study was conducted to investigate effects of two chemical fertilizers, NPKs and triple superphosphate (TSP) applied at two doses (LD<sub>25</sub>, LD<sub>50</sub>) on the pollution bioindicator, *Aporrectodea caliginosa* adults and juvenile's earthworm, the most abundant species in Tebessa area (northeastern Algeria).

The effects of these two chemical fertilizers were examined on mortality, growth, enzymatic (GSTs, GPx and LDH) and non-enzymatic (GSH) biomarkers and biochemical composition (proteins, carbohydrates, lipids) in adults and juveniles of *A. caliginosa*. Bioaccumulation and histological study were also determined using adults.

Growth of adult and juvenile worms was reduced after exposure to NPK and TSP. The biochemical study shows that treatments reduce protein content and energy reserves, reflecting the high relatively energy demand to respond to toxic stress. Fertilizers can alter the synthesis of metabolites and disrupt some of its functionality.

In addition, enzymatic and non-enzymatic biomarkers determined in treated adults and juveniles (LD<sub>25</sub> and LD<sub>50</sub>) revealed an induction of the detoxification system, resulting in an increase in the activity of GSTs, GPx and LDH and a decrease in the level of GSH.

Chemical fertilizers have been accumulated in earthworms, but with low bioaccumulation capacity. Histological study of adults treated with LD<sub>50</sub> reveals changes in the integuments and intestinal wall compared to controls. These obtained results could be useful as a biomarker for the assessment of contaminated terrestrial ecosystems using *A. calliginosa* as a biomonitor for terrestrial pollution and assessing ecological risks of chemical fertilizers in soil.

**Keywords:** *Aporrectodea caliginosa*, Fertilizers, Mortality, Growth, Biomarkers, Biochemical composition, Bioaccumulation, Histopathology.

## ملخص

أجريت هذه الدراسة للتحقق من آثار الأسمدة الكيميائية NPKs و ثلاثي الفوسفات (TSP) المطبق بجرعتين ( $DL_{50}$ ,  $DL_{25}$ ) على الديدان البالغة و غير الناضجة لدودة الأرض المؤشر البيولوجي للتلوث *Aporrectodea caliginosa* النوع السائد في منطقة بسة (شمال شرق الجزائر).

وقد تم دراسة آثار هذين السمادين الكيميائيين على الوفيات، النمو والمؤشرات الحيوية الإنزيمية (GSTs، GPx و LDH) و غير الإنزيمية (GSH) و الأيض الكيميائي الحيوي (البروتينات، الكربوهيدرات و الدهون) للديدان البالغين و غير الناضجين للنوع *A. caliginosa*، كما تم حديد التراكم البيولوجي و دراسة الأنسجة للبالغين بعد أربعة أسابيع من العلاج بالجرعة المميتة ( $DL_{50}$ ).

كما أن نمو الديدان البالغة و غير الناضجة قد انخفض بعد التعرض لـ NPKs و TSP خلال فترة العلاج 0، 1، 2، 3، 4 أسابيع، وبينت الدراسة البيوكيميائية أن العلاجات قلل من محتوى البروتين واحتياطات الطاقة، مما يعكس الطلب المرفوع نسبيا على الطاقة لمقاومة الإجهاد التأكسلي وبالتالي الأسمدة يمكن أن غير تركيب الأيض و تعطيل البعض من وظائفه.

وبالإضافة إلى ذلك كشفت المؤشرات الحيوية الإنزيمية و غير الإنزيمية التي حددت عند الديدان البالغة و غير الناضجة المعالجة بـ NPKs و TSP عن حريص نظف إزالة السموم، مما أدى زيادة في نشاط GSTs، GPx و LDH و انخفاض في مستوى GSH.

وقد راكمت الأسمدة الكيميائية في ديدان الأرض ولكن بقدرة منخفضة. بالإضافة إلى ذلك كشف الدراسة النسيجية للديدان البالغين الذين عولجوا بـ ( $DL_{50}$ ) غيرات في الغلاف الخارجي والجدار المعوي مقارنة بالشواهد.

يمكن أن كون هذه النتائج مفيدة كعلامة بيولوجية لتقييم النظم البيئية الملوثة باستخدام *A. caliginosa* في المراقبة البيولوجية للتلوث و تقييم المخاطر البيئية التي نجر عن استعمال الأسمدة الكيميائية في التربة.

**كلمات مفتاحية:** *Aporrectodea caliginosa*، أسمدة، وفيات، نمو، مؤشرات حيوية، التركيب البيوكيميائي، التراكم البيولوجي، دراسة نسيجية.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

## VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Ababsa, N., Laiche, A. & Djabbar, F. (2017).** Abundance and species richness of lombric macrofauna in a semi-arid forest ecosystem. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 9(3): 1634-1643. Doi: 10.4314/jfas.v9i3.24.
- Abbiramy, K.S.K. & Ross, P.R. (2013a).** Determination of acute toxicity of NPK fertilizers to *Eisenia foetida* using a simple paper contact method. *International Journal of Scientific Research*. 2(2): 415-417.
- Abbiramy, K.S.K., Ross, P.R. & Paramanandham, J.P. (2013b).** Assessment of acute toxicity of superphosphate to *Eisenia foetida* using paper contact method. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 3(2):112-115.
- Abbiramy, K.S.K. & Ross, P.R. (2013c).** Validation of tropical artificial soil ecotoxicological studies on *Eisenia foetida* against combine fertilizers. *International Journal Innovative Research and Studies*. 2(7): 212-227.
- Abd-El Azeem, H.H. & Sheir, S.K. (2018).** Impacts of the plant fertilizer, Caselio on the slug, *Deroceras reticulatum* (Gastropoda, Stylommatophora): laboratory studies. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 9(1): 386-396.
- Abdel-Hamid, A.Z., Farrag, E., Rizk, M., Omar, M.T. & Mantawy, M.M.E. (1997).** Effect of Nitrogen; Sulphur & Phosphorus Containing Fertilizers and Organophosphorous Insecticide on Reproduction of *Biomphalaria alexandrina* Snails. *Egyptian journal of pharmaceutical sciences*. 38 (1-3): 147-158.
- Ahmad, S., Khan, H., Shahab, U., Rehman, S., Rafi, Z., Khan, M.Y. & Uddin, M. (2017).** Protein oxidation: an overview of metabolism of sulphur containing amino acid, cysteine. *Front Biosci (Schol Ed.)*. 9: 71-87.
- Aly, M.A.S. & Schröder, P. (2008).** Effect of herbicides on glutathione S-transferases in the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Science and Pollution Research*. 15(2): 143-149. Doi: 10.1065/espr2007.02.385.
- Alturkistani, H.A., Tashkandi, F.M. & Mohammedsaleh, Z.M. (2016).** Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science*. 8(3):72.79. Doi:10.5539/gjhs.v8n3p72.
- Arnaud, C., Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Soler, P. & Ribera, D. (2000).** Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biology and Biochemistry*. 32(1): 67-73. Doi: 10.1016/S0038-0717(99)00130-3.

**Attia, L., Tine, S., Tine-Djebbar, F. & Soltani, N. (2021).** Potential hazards of an inorganic fertilizer (Weatfert) for the brown garden snail (*Eobania vermiculata* Müller, 1774): growth, histological and biochemical changes and biomarkers. *Applied Ecology and Environment Research*. 9(3): 1719-1734. Doi: 10.15666/aer/1903\_17191734.

**Atuah, L. & Hodson, M.E. (2011).** A comparison of the relative toxicity of bone meal and other P sources used as remedial treatments to the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia*. 54: 181-186. Doi:10.1016/j.pedobi.2011.07.009.

**Awali, S., Abdulelah, S.A., Crile, K.G., Yacoo, K.E., Almouseli, A., Torres, V.C. & Belanger, R.M. (2019).** Cytochrome P450 and Glutathione-S-Transferase Activity are Altered Following Environmentally Relevant Atrazine Exposures in Crayfish (*Faxonius virilis*). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 103(4): 579-584. Doi: 10.1007/s00128-019-02674-2.

## B

**Băcanu, C.S., Cristina, S.D., Iuliana Manuela, D.I. & Silviu, S. (2019).** Agricultural production, soil quality and fertilizer used in Braila County, Romania. *Research in Agriculture and Agronomy*. Doi: 10.5171/2019.970358

**Bachelier, G. (1963).** *La Vie Animale dans le Sol*. ORSTOM: Paris; 279p.

**Baha, M. & Berra, S. (2001).** *Proselodrilus doumandjiin*. sp., a new lumbricid from Algeria. *Tropical Zoology*. 14(1): 87-93. Doi:10.1080/03946975.2001.10531144

**Baize, D. (2000).** *Guide des analyses en pédologie: 2e édition, revue et augmentée*. Edition Quæ. 257 p.

**Bansiwal, K. & Rai, N. (2010).** Assessment of malathion toxicity in certain organs of earthworm, *Eisenia foetida*. *Bioscan*. 5(3):473-476.

**Bart, S., Amossé, J., Lowe, C.N., Mougin, C., Péry, A.R. & Pelosi, C. (2018).** *Aporrectodea caliginosa*, a relevant earthworm species for a posteriori pesticide risk assessment: current knowledge and recommendations for culture and experimental design. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(34): 33867-33881. Doi: 10.1007/s11356-018-2579-9.

**Bazri, K., Ouahrani, G., Diaz Cosin, D.J. & Dolores T.A. (2016).** The earthworm biodiversity in eastern Algeria. 7 th International Oligochaete Taxonomy Meeting. Station Biologique de Paimpont, France. Sciencesconf.org: iotm:118907.

**Bazri, K., Ouahrani, G., Gheribi-Aoulmi, Z. & Diaz Cosin, D.J (2013).** La diversité des lombriciens dans l'Est algérien depuis la côte jusqu'au désert - The earthworm's diversity in Eastern Algeria from the coast to desert. *Ecologia Mediterranea*. 39(2): 5-17.

- Beaumelle, L., Lamy, I., Cheviron, N. & Hedde, M. (2014).** Is there a relationship between earthworm energy reserves and metal availability after exposure to field-contaminated soils?. *Environmental Pollution*. 191 : 182-189. Doi:10.1016/j.envpol.2014.04.021.
- Belfroid, A.C., Sijm, D.T.H.M. & Van Gestel, C.A.M. (1996).** Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environmental Reviews*. 4(4): 276-299. Doi: 10.1139/a96-015.
- Belfroid, A., Vanwezel, A., Sikkenk, M., Van Gestel, K., Seinen, W. & Hermens, J. (1993).** The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): experiments in water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 25(2):154-165. Doi:10.1006/eesa.1993.1014.
- Benamara, M., Amrani, A., Zaidi, H., Sedrati, F., Bouroumana, S., Zouzou, D. & Nasr, H. (2021).** Oxidative Stress Induced By The Metallic Oxide The Copper Oxide (CuO-Nps) On Terrestrial Snail *Helix Aspersa*. *Research Square*. 1-18. Doi: 10.21203/rs.3.rs-1132432/v1.
- Bennour, A., Habes, D. & Soltani, N. (2020).** Assessment of soil quality in Annaba area (Northeast Algeria) using the earthworm *Lumbricus terrestris*: bioindicative stress reponses and heavy metal contamination. *Fresenius Environmental Bulletin*. 29(11): 9635-9643.
- Besnaci, S., Bensoltane, S. & Djekoun, M. (2019).** Oxidative stress and histological changes Induced by the nano-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in *Helix aspersa*. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 20(2): 119-133.
- Bessaoud, O., Pellissier, J.P., Rolland, J.P. & Khechimi, W. (2019).** Rapport de synthèse sur l'agriculture en Algérie. [Rapport de recherche] CIHEAM-IAMM. Pp.82.
- Bhattacharya, A. & Sahu, S.K. (2014).** Lethal effect of urea on soil biota: a laboratory study on earthworm (*Drawida willsi*). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 4(6): 64-72.
- Bhattacharya, A. & Sahu, S.K. (2015).** Toxic effect of superphosphate on soil ecosystem using earthworm *Drawida willsi* as test specimen Anindita. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 6 (4): 220-226.
- Bhattacharya, A. & Sahu, S.K. (2016).** Acute toxicity of NPK fertilizer on soil ecosystem using earthworm, *Drawida willsi* as a test specimen. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*. 5(3): 233-238.
- Board, P.G. & Menon, D. (2013).** Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1830(5): 3267-3288. Doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.019.
- Booth, L.H. & O'Halloran, K. (2001).** A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and

chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 20(11): 2494-2502. Doi: 10.1002/etc.5620201115.

**Boström, U. & Lofs, A. (1996).** Annual population dynamics of earthworms and cocoon production by *Aporrectodea caliginosa* in a meadow rescue ley. *Pedobiologia*. 40(1):32-42.

**Bouazdia, K. (2020).** Combined effect of two agrochemicals on *Aporrectodea caliginosa* in a semi-arid land. *Journal of Biological and Environmental Sciences*. 14(42): 115-126.

**Bouazdia, K. & Habes, D. (2017).** Earthworm species identified in the region of Tebessa (Eastern Algeria). *International Journal of Zoological Research*. 13 (1): 38-44. Doi: 10.3923/ijzr.2017.38.44

**Bouché, M.B. (1972).** Lombriciens de France : écologie et systématique Institut National de la Recherche Agronomique. Paris 72(2): 1-668.

**Bouché, M.B. (1977).** Stratégies lombriciennes. *Ecological Bulletins*. 122-132.

**Boyland, E. & Chasseaud, L.F. (1969).** The role of glutathione and glutathione-S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advanced Enzymology*. 32: 173-179.

**Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1-2):248-254. Doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

**Bundy, J.G., Sidhu, J.K., Rana, F., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Wren, J.F. & Kille, P. (2008).** Systems toxicology approach identifies coordinated metabolic responses to copper in a terrestrial non-model invertebrate, the earthworm *Lumbricus rubellus*. *BMC Biology*. 6(1): 1-21. Doi: 10.1186/1741-7007-6-25.

**Bustos, V., Mondaca, P., Verdejo, J., Sauvé, S., Gaete, H., Celis Diez, J.L. & Neaman, A. (2015).** Thresholds of arsenic toxicity to *Eisenia fetida* in field-collected agricultural soils exposed to copper mining activities in Chile. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 122: 448-454. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.009.

## C

**Callaham, M.A., Blair, J.M., Todd, T.C., Kitchen, D.J. & Whiles, M.R. (2003).** Macroinvertebrates in North American tallgrass prairie soils: effects of fire, mowing, and fertilization on density and biomass. *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 1079-1093. Doi: 10.1016/S0038-0717(03)00153-6.

**Cancio, I., Gwynn, I., Ireland, M.P. & Cajaraville, M.P. (1995).** The effect of sublethal lead exposure on the ultrastructure and on the distribution of acid phosphatase activity in chloragocytes of earthworms (Annelida, Oligochaeta). *The Histochemical Journal*. 27(12): 965-973.

- Carter, L.J., Ryan, J.J. & Boxall, A. (2016a).** Does uptake of pharmaceuticals vary across earthworm species?. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 97(3): 316-322. Doi: 10.1007/s00128-016-1875-7.
- Carter, L.J., Ryan, J.J. & Boxall, A.B. (2016b).** Effects of soil properties on the uptake of pharmaceuticals into earthworms. *Environmental pollution*. 213: 922-931. Doi: 10.1016/j.envpol.2016.03.044.
- Carter, L.J., Williams, M. & Sallach, J.B. (2020).** Uptake and effects of pharmaceuticals in the soil-plant-earthworm system. *Interaction and Fate of Pharmaceuticals in Soil-Crop Systems*. 103: 175-220. Doi: 10.1007/698\_2020\_617.
- Chen, K., Liu, Q., Xie, L., Sharp, P.A. & Wang, D.I.C. (2001).** Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnology & Bioengineering*, 72(1): 55-61. Doi: 10.1002/1097-0290(20010105)72:1<55:aid-bit8>3.0.co;2-4.
- Chen, X., Wang, X., Gu, X., Jiang, Y. & Ji, R. (2017).** Oxidative stress responses and insights into the sensitivity of the earthworms *Metaphire guillelmi* and *Eisenia fetida* to soil cadmium. *Science of The Total Environment*. 574: 300-306. Doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.059.
- Chevillot, F., Convert, Y., Desrosiers, M., Cadoret, N., Veilleux, E., Cabana, H. & Bellenger, J.P. (2017).** Selective bioaccumulation of neonicotinoids and sub-lethal effects in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to environmental concentrations in an artificial soil. *Chemosphere*. 186: 839-847. Doi:10.1016/j.chemosphere.2017.08.
- Choo, L.P.D. & Baker, G.H. (1998).** Influence of four commonly used pesticides on the survival, growth, and reproduction of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Lumbricidae). *Australian Journal of Agricultural Research*. 49(8): 1297-1303. Doi : 10.1071/A98021.
- Contardo-Jara, V. & Wiegand, C. (2008).** Biotransformation and antioxidant enzymes of *Lumbriculus variegates* as biomarkers of contaminated sediment exposure. *Chemosphere*. 70(10): 1879-1888. Doi : 10.1016/j.chemosphere.2007.07.072.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A. & Vasseur, P. (1997).** Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38(2): 122-131. Doi: 10.1006/eesa.1997.1582.
- Correia, F.V. & Moreira, J. C. (2010).** Effect of glyphosate and 2, 4-D on earthworm (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 85(3): 264-268. Doi: 10.1007/s00128-010-0089-7.

**Curry, J. P., Doherty, P., Purvis, G. & Schmidt, O. (2008).** Relationships between earthworm populations and management intensity in cattle-grazed pastures in Ireland. *Applied Soil Ecology*. 39(1): 58-64. Doi:10.1016/j.apsoil.2007.11.005.

---

**D**

---

**Das, P., Barua, S., Sarkar, S., Chatterjee, S.K., Mukherjee, S., Goswami, L. & Bhattacharya, S.S. (2018).** Mechanism of toxicity and transformation of silver nanoparticles: Inclusive assessment in earthworm-microbe-soil-plant system. *Geoderma*. 314: 73-84. Doi:10.1016/j.geoderma.2017.11.008.

**Dawood, M., Wahid, A., Hashmi, M.Z., Mukhtar, S. & Malik, Z. (2017).** Use of Earthworms in biomonitoring of soil xenobiotics. *Xenobiotics in the Soil Environment*. 73-88. Doi: 10.1007/978-3-319-47744-2\_6.

**Davydov, R., Sokolov, M., Hogland, W., Glinushkin, A. & Markaryan, A. (2018).** The application of pesticides and mineral fertilizers in agriculture. *MATEC Web of Conferences*. 245: 2-5. 11003. Doi:10.1051/mateconf/201824511003.

**De Coen, W.M. & Janssen, C.R. (2003).** A multivariate biomarker-based model predicting population-level responses of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22 (9): 2195-2201. Doi: 10.1897/02-223.

**Deng, S., Wu, Y., Duan, H., Cavanagh, J.A.E., Wang, X., Qiu, J. & Li, Y. (2021).** Toxicity assessment of earthworm exposed to arsenate using oxidative stress and burrowing behavior responses and an integrated biomarker index. *Science of The Total Environment*. 800: 2-8. 149479. Doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149479.

**Denoyelle, R., Rault, M., Mazzia, C., Mascle, O. & Capowiez, Y. (2007).** Cholinesterase activity as a biomarker of pesticide exposure in *Allolobophora chlorotica* earthworms living in apple orchards under different management strategies. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 26(12): 2644-2649. Doi: 10.1897/06-355.1.

**De Zwaan, A. & Zandee, D. I. (1972).** The utilization of glycogen and accumulation of some intermediates during anaerobiosis in *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 43(1): 47-54. Doi: 10.1016/0305-0491(72)90200-3.

**Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M. & Guilhermino, L. (2001).** Lactate Dehydrogenase Activity as an Effect Criterion in Toxicity Tests with *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere*. 4(4-5): 553-560. Doi: 10.1016/S0045-6535(01)00029-7.

**Ding, W., Li, Z., Qi, R., Jones, D. L., Liu, Q., Liu, Q. & Yan, C. (2021).** Effect thresholds for the earthworm *Eisenia fetida*: Toxicity comparison between conventional and biodegradable microplastics. *Science of The Total Environment*. 781: 2-10. 146884. Doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146884.

- Dittbrenner, N., Schmitt, H., Capowiez, Y. & Triebkorn, R. (2011).** Sensitivity of *Eisenia fetida* in comparison to *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris* after imidacloprid exposure. Body mass change and histopathology. *Journal of Soils and Sediments*. 11(6): 1000-1010. Doi: 10.1007/s11368-011-0397-5.
- Dittbrenner, N., Triebkorn, R., Moser, I. & Capowiez, Y. (2010).** Physiological and behavioural effects of imidacloprid on two ecologically relevant earthworm species (*Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*). *Ecotoxicology*. 19 (8): 1567-1573. Doi:10.1007/s10646-010-0542-8.
- Djoudad-Kadji, H., Benslimane, S., Chevalier, C., Kadji, B., Exbrayat, J. M. & Iguer-Ouada, M. (2011).** Visualisation des coupes histologiques des follicules ovariens de *barbus callensis* variation de fixateurs et de colorants. *Revue Française d’Histotechnologie*. 24(1) : 21 à 28.
- Donahue, S. (2001).** Agricultural management effects on earthworm populations. *Soil Quality Agronomy Technical Note*. 11: 1-8.
- Duchateau, G. & Florkin, M. (1959).** Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. 67(2):306-314. Doi:10.3109/13813455909074435.
- Duo, L., Wang, Y. & Zhao, S. (2022).** Individual and histopathological responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to graphene oxide exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 229 :113076. Doi : 10.1016/j.ecoenv.2021.113076.

---

 €
 

---

- Ebrahimzadeh, M., Heidari, B., Nazarhaghghi, F. & Valipour, A. (2021).** Physiological responses of the goldfish (*Carassius auratus*) during subacute exposure to organic pollutants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 106(5): 773-778. Doi : 10.1007/s00128-021-03164-0.
- Edwards, C.A. (1981).** Earthworm, soil fertility and plant growth. In *Proceedings of Workshop on the Role of Earthworms in the Stabilization of Organic Residues*, Kalamazoo. 1:61-85. Michigan Beach Leaf Press. Michigan.
- Edwards, C.A. (1985).** Production of feed protein from animal waste by earthworms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 310(1144): 299-307. Doi: 10.1098/rstb.1985.0120.
- El-Deeb, F.A.A., Marie, M.A.S., Hasheesh, W.S., Atef, R., Tantawy, A. & Sayed, S. (2015).** Biological studies on the effect of certain inorganic fertilizers with observations on protein electrophoretic pattern of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Advances in Environmental Biology*. 9(21): 21-29.

- El-Deeb, F.A.A., Marie, M.A.S., Hasheesh, W.S., Hussein, R.M.A. & Sayed, S.S.M. (2017).** Biomarkers of oxidative stress in *Biomphalaria alexandrina* snails for assessing the effects of certain inorganic fertilisers. *Molluscan Research*. 37(4): 289-294. Doi:10.1080/13235818.2017.1357783.
- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dörr, A.J.M. & Mantilacci, L. (2003).** Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55(2): 162-167. Doi: 10.1016/s0147-6513(02)00123-9
- El-Okki, M.E.H., Sahli, L. & Rached, O. (2014).** Distribution of earthworms in the Kebir-Rhumel Basin (North-East Algeria). *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Oligochaete Taxonomy Meeting, Advances in Earthworm Taxonomy VI*. Palmeira de Faro. Portugal. 88-97.
- Elumalai, M., Antunes, C. & Guillhermino, L. (2007).** Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. *Chemosphere*. 66(7): 1249-1255. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.030.
- Elyamine, A., Afzal, J., Rana, M., Imran, M., Cai, M. & Hu, C. (2018).** Phenanthrene Mitigates Cadmium Toxicity in Earthworms *Eisenia fetida* (Epigeic Specie) and *Aporrectodea caliginosa* (Endogeic Specie) in Soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15(11): 2-15 2384. Doi:10.3390/ijerph15112384.
- Eqani, S., Malik, R.N., Cincinelli, A., Zhang, G., Mohammad, A., Qadir, A. & Katsoyiannis, A. (2013).** Uptake of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) by river water fish: the case of River Chenab. *Science of the Total Environment*. 450: 83-91. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.052.

## F

- FAO (2017).** World fertilizer trends and outlook to 2020, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Fischer, E. (1977).** The function of chloragosomes, the specific age-pigment granules of annelids-a review. *Experimental Gerontology*. 12(1-2): 69-74. Doi: 10.1016/0531-5565(77)90035-3.
- Flohe, L. & Gunzler, W. A. (1984).** Analysis of glutathione peroxidase. *Methods. Enzymology*. 105: 114-120. Doi: 10.1016/S0076-6879(84)05015-1.
- Fonte, S.J., Winsome, T. & Six, J. (2009).** Earthworm populations in relation to soil organic matter dynamics and management in California tomato cropping systems. *Applied Soil Ecology*. 41:206-214. Doi:10.1016/j.apsoil.2008.10.010
- Frampton, G.K., Jänsch, S., Scott-Fordsmand, J.J., Römbke, J. & Van den Brink, P.J. (2006).** Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis

using species sensitivity distributions. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 25(9): 2480-2489. Doi: 10.1897/05-438r.1.

## G

**Gao, M., Song, W., Zhang, J. & Guo, J. (2013).** Effect on enzymes and histopathology in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by triazole fungicides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 35(3) : 427-433. Doi: 10.1016/j.etap.2013.02.003.

**Gaucher, A. (1968).** *Traité de pédologie agricole. Le sol et ses caractéristiques agronomiques.* 97 p.

**Gill, H.K. & Garg, H. (2014).** Pesticide: Environmental Impacts and Management Strategies. *Pesticides Toxic Aspects*. 8: 187-230. Doi: 10.5772/57399.

**Giovanetti, A., Fesenko, S., Cozzella, M.L., Asencio, L.D. & Sansone, U. (2010).** Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium. *Journal of Environmental Radioactivity*. 101 (6): 509-516. Doi: 10.1016/j.jenvrad.2010.03.003.

**Givaudan, N., Binet, F., Le Bot, B. & Wiegand, C. (2014).** Earthworm tolerance to residual agricultural pesticide contamination: field and experimental assessment of detoxification capabilities. *Environmental Pollution*. 192: 9-18. Doi:10.1016/j.envpol.2014.05.001.

**Gladyshev, V.N., Factor, V.M., Housseau, F. & Hatfield, D.L. (1998).** Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 251(2): 488-493. Doi: 10.1006/bbrc.1998.9495.

**Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F. & Toulmin, C. (2010).** Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*. 327(5967): 812-818. Doi: 10.1126/science.1185383.

**Goldsworthy, A.C., Mordue, W. & Guthkelch, J. (1972).** Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*. 18(3): 545-551. Doi: 10.1016/0016-6480(72)90034-2.

**Gowri, S. & Thangaraj, R. (2020).** Studies on the toxic effects of agrochemical pesticide (Monocrotophos) on physiological and reproductive behavior of indigenous and exotic earthworm species. *International Journal of Environmental Health Research*. 30(2): 212-225. Doi:10.1080/09603123.2019.1590538.

**Gunderson, M.P., Pickett, M.A., Martin, J.T., Hulse, E.J., Smith, S.S., Smith, L.A. & Guillette, L.J. (2016).** Variations in hepatic biomarkers in American alligators (*Alligator mississippiensis*) from three sites in Florida, USA. *Chemosphere*. 155: 180-187. Doi : 10.1016/j.chemosphere.2016.04.018.

**Guo, L., Qiu, Y., Zhang, G., Zheng, G.J., Lam, P.K. & Li, X. (2008).** Levels and bioaccumulation of organochlorine pesticides (OCPs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fishes from the Pearl River estuary and Daya Bay, South China. *Environmental Pollution*. 152(3): 604-611. Doi : 10.1016/j.envpol.2007.06.067.

---

H

**Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. (1974).** Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249(22):7130-7139. Doi: 10.1016/s0021-9258(19)42083-8.

**Hamdi-Ourfella, A. N. & Soltani, N. (2016).** Biodiversité des Gastéropodes en Algérie. Bioindicateur *Helix aperta*. Éditions universitaires européennes.

**Han, Y., Zhu, L., Wang, J., Wang, J., Xie, H. & Zhang, S. (2014).** Integrated assessment of oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to azoxystrobin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 107: 214-219. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.06.006.

**Han, X., Gelein, R., Corson, N., Wade-Mercer, P., Jiang, J., Biswas, P. & Oberdörster, G. (2011).** Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology*. 287(1-3): 99-104. Doi: 10.1016/j.tox.2011.06.011.

**Hatti Shankerappa, S. (2013).** Chemical composition like protein, lipid and glycogen of local three species of earthworms of Gulbarga city, Karnataka-India. *International Journal of Advancements in Research & Technology*. 2(7): 73-97.

**Hayes, J.D., Flanagan, J.U. & Jowsey, I.R. (2005).** Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 45(1): 51-88. Doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.

**Helling, B., Reinecke, S.A. & Reinecke, A.J. (2000).** Effects of the fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 46(1): 108-116. Doi: 10.1006/eesa.1999.1880.

**Hill, B.R. & Levi, C. (1954).** Elevation of a serum component in neoplastic disease. *Cancer Research*. 14 (7): 513-515.

**Hirano, T. & Tamae, K. (2011).** Earthworms and soil pollutants. *Sensors*. 11(12): 11157-11167. Doi: 10.3390/s111211157.

**Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E. & Van Gestel, C.A.M. (2006).** Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental pollution*. 144(2): 639-646. Doi: 10.1016/j.envpol.2006.01.019.

**Holmstrup, M., Sørensen, J.G., Overgaard, J., Bayley, M., Bindesbøl, A.M., Slotsbo, S. & Asmund, G. (2011).** Body metal concentrations and glycogen reserves in earthworms (*Dendrobaena octaedra*) from contaminated and uncontaminated forest soil. *Environmental Pollution*. 159(1): 190-197. Doi:10.1016/j.envpol.2010.09.005.

**Hould, R. & de Shawinigan, C. (1984).** Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Québec (Province). 1: 400 p.

**Howarth, J.R., Domínguez-Solís, J.R., Gutiérrez-Alcalá, G., Wray, J.L., Romero, L.C. & Gotor, C. (2003).** The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. *Plant Molecular Biology*. 51(4): 589-598.

**Huang, K., Xia, H., Cui, G. & Li, F. (2017).** Effects of earthworms on nitrification and ammonia oxidizers in vermicomposting systems for recycling of fruit and vegetable wastes. *Science of The Total Environment*. 578: 337-345. Doi :10.1016/j.scitotenv.2016.10.172.

**Huber, P.C., Almeida, W.P. & de Fátima Â. (2008).** Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Quim Nova*. 31:1170-1179. Doi: 10.1590/S0100-40422008000500046.

## I

**Ismail, S.M., Ahmed, Y.M., Mosleh, Y.Y.I. & Ahmed, M.T. (1997).** The activities of some proteins and protein related enzymes of earthworms as biomarkers for atrazine exposure. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 63(1-4): 141-148. Doi: 10.1080/02772249709358524.

**Iturbe-Requena, S.L., Prado-Ochoa, M.G., Muñoz-Guzmán, M.A., Velázquez-Sánchez, A.M., Ángeles, E. & Alba-Hurtado, F. (2019).** Toxic effects of new ethyl-carbamates on the morphology, mortality and acetylcholinesterase activity of *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 176: 219-225. Doi:10.1016/j.ecoenv.2019.03.094.

## J

**Jiang, L., Ling, S., Fu, M., Peng, C., Zhang, W., Lin, K. & Zhou, B. (2021).** Bioaccumulation, elimination and metabolism in earthworms and microbial indices responses after exposure to decabromodiphenyl ethane in a soil-earthworm-microbe system. *Environmental Pollution*. 289: 2-11. Doi:10.1016/j.envpol.2021.117965.

**Jouni, F. (2018).** Synergistic interaction earthworm-microbiota: a role in the tolerance and detoxification of pesticides?. *Agricultural sciences*. Université d'Avignon. English. NNT: 2018AVIG0699.

**Jovanović, P., Žorić, L., Stefanović, I., Džunić, B., Djordjević-Jocić, J., Radenković, M. & Jovanović, M. (2010).** Lactate dehydrogenase and oxidative stress activity in primary

open-angle glaucoma aqueous humour. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 10(1): 83-88. Doi: 10.17305/bjbms.2010.2743.

**Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J. & Cuypers, A. (2012).** Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defences. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(3) : 3145-3175. Doi:10.3390 /ijms13033145.

## K

**Kaja, S., Payne, A.J., Singh, T., Ghuman, J.K., Sieck, E.G. & Koulen, P. (2015).** An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 73: 1-6. Doi: 10.1016/j.vascn.2015.02.001.

**Kandil, M.A., El-Deeb, H.I., Mobarak, S.A. & Eweis, E.A. (2009).** Biochemical impacts of methomyl and abamectin and their binary mixtures with acetylsalicylic acid against the land snails *Eobania vermiculata* and *Monacha obstructa*. *Zeitschrift Für Die Gesamte Experimentelle Medizin*. 135: 545-561.

**Kaur, H., Sharma, S. & Vijaya, P. (2019).** Toxicological effect of Parthenium hysterophorus and milk processing industry sludge on earthworms, *Eisenia fetida*. *Environmental Science and Pollution Research*. Doi:10.1007/s11356-019-05222-x.

**Karlsson, M.V., Marshall, S., Gouin, T. & Boxall, A.B. (2016).** Routes of uptake of diclofenac, fluoxetine, and triclosan into sediment-dwelling worms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 35(4): 836-842. Doi:10.1002/etc.3020.

**Katagi, T. & Ose, K. (2015).** Toxicity, bioaccumulation and metabolism of pesticides in the earthworm. *Journal of pesticide science*. 40(3): 69-81. Doi:10.1584/jpestics.d15-003.

**Kawamura, T. & Muraoka, I. (2018).** Exercise-induced oxidative stress and the effects of antioxidant intake from a physiological viewpoint. *Antioxidants*. 7(9): 2-19. Doi:10.3390/antiox7090119.

**Ketterer, B., Coles, B. & Meyer, D.J. (1983).** The role of glutathione in detoxication. *Environmental Health Perspectives*. 49: 59-69. Doi: 10.1289/ehp.834959.

**Khalil, A.M. (2016).** Impact of methomyl lannate on physiological parameters of the land snail *Eobania vermiculata*. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 74: 1-7. Doi:10.1016/j.jobaz.2015.12.005.

**Kherbouche, D., Bernhard-Reversat, F., Moali, A. & Lavelle, P. (2012).** The effect of crops and farming practices on earthworm communities in Soummam valley, Algeria. *European Journal of Soil Biology*. 48: 17-23. Doi:10.1016/j.ejsobi.2011.09.006.

**Kierszenbaum, A.L. (2006).** Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique. De Boeck Supérieur.

**Kılıç, G.A. (2011).** Histopathological and biochemical alterations of the earthworm (*Lumbricus Terrestris*) as biomarker of soil pollution along Porsuk River Basin (Turkey). Chemosphere. 83(8): 1175-1180. Doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.091.

**Köhler, H.R. & Triebkorn, R. (2013).** Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? Science. 341 (6147): 759-765. Doi: 10.1126/science.1237591.

## L

**Lal, R. (2004).** Soil carbon sequestration to mitigate climate change. Geoderma. 123: 1-22. Doi: 10.1016/j.geoderma.2004.01.032.

**Lalthanzara, H., & Ramanujam, S.N. (2010).** Effect of fertilizer (NPK) on earthworm population in the agro-forestry system of Mizoram India. Science Vision. 10(4): 159-167.

**Lammertyn, S., Masín, C.E., Zalazar, C.S. & Fernandez, M.E. (2021).** Biomarkers response and population biological parameters in the earthworm *Eisenia fetida* after short term exposure to atrazine herbicide. Ecological Indicators. 121: 2-8 107173. Doi:10.1016/j.ecolind.2020.107173.

**Langdon, C.J., Pearce, T.G., Meharg, A.A. & Semple, K.T. (2001).** Survival and behaviour of the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrodrilus rubidus* from arsenate-contaminated and non-contaminated sites. Soil Biology and Biochemistry. 33(9): 1239-1244. Doi: 10.1016/S0038-0717(01)00029-3.

**Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K. & Basta, N. (2004).** The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. Ecotoxicology and Environmental Safety. 57(1): 39-47. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2003.08.014.

**Laskowski, R. & Hopkin, S.P. (1996).** Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 34(1): 59-69. Doi : 10.1006/eesa.1996.0045.

**Łaszczycza, P., Augustyniak, M., Babczynska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula, P. & Witas, I. (2004).** Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). Environment International. 30 (7): 901-910. Doi: 10.1016/j.envint.2004.02.006.

**Laverack, M.S. (1963).** The Physiology of Earthworms. The Macmillan Company, New York, NY.

- Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C. & Hontela, A. (2002).** Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. 60(3-4): 0-267. Doi: 10.1016/s0166-445x(02)00012-7.
- Liang, J., Xia, X., Zhang, W., Zaman, W.Q., Lin, K., Hu, S. & Lin, Z. (2017).** The biochemical and toxicological responses of earthworm (*Eisenia fetida*) following exposure to nanoscale zerovalent iron in a soil system. Environmental Science and Pollution Research. 24(3): 2507-2514. Doi: 10.1007/s11356-016-8001-6.
- Lijun, L., Xuemei, L., Yaping, G. & Enbo, M. (2005).** Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (Orthoptera Acridoidae). Environmental Toxicology and Pharmacology. 20(3): 412-416. Doi: 10.1016/j.etap.2005.04.001.
- Lin, D., Zhou, Q., Xie, X. & Liu, Y. (2010).** Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). Chemosphere 18:1328-1333. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.08.027.
- Liu, T., Chen, X., Gong, X., Lubbers, I.M., Jiang, Y., Feng, W. & Liu, M. (2019).** Earthworms coordinate soil biota to improve multiple ecosystem functions. Current Biology. 29(20): 3420-3429. Doi:10.1016/j.cub.2019.08.045.
- Liu, T., Wang, X., Chen, D., Li, Y. & Wang, F. (2018).** Growth, reproduction and biochemical toxicity of chlorantraniliprole in soil on earthworms (*Eisenia fetida*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 150: 18-25. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.010.
- Liu, J., Xiong, K., Ye, X., Zhang, J., Yang, Y. & Ji, L. (2015).** Toxicity and bioaccumulation of bromadiolone to earthworm *Eisenia fetida*. Chemosphere 135:250-256. Doi : 10.1016/j.chemosphere.2015.04.058.
- Lourenço, J., Silva, A., Carvalho, F., Oliveira, J., Malta, M., Mendo, S. & Pereira, R. (2011).** Histopathological changes in the earthworm *Eisenia andrei* associated with the exposure to metals and radionuclides. Chemosphere. 85(10): 1630-1634. Doi:10.1016/j.chemosphere.2011.08.027.
- Lowe, C.N. & Butt, K.R. (2005).** Culture techniques for soil dwelling earthworms: a review. Pedobiologia. 49:401-413. Doi: 10.1016/j.pedobi.2005.04.005.
- Lushchak, V.I. (2011).** Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology. 101(1): 13-30. Doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006.

## M

- Ma, W. & Bodt, J. (1993).** Differences in toxicity of the insecticide chlorpyrifos to six species of earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) in standardized soil tests. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 50(6): 864-870. Doi: 10.1007/bf00209951.

- Maltby, L. (1999).** Studying stress: the importance of organism-level responses. *Ecological Applications*. 9 (2): 431-440. Doi: 10.1890/1051-0761.
- Maity, S., Roy, S., Bhattacharya, S. & Chaudhury, S. (2010).** Accumulation of lead and zinc in earthworm *Lampito mauritii* (Kinberg): effect on survival, growth and acetylcholinesterase activity. *Recent Research in Science and Technology*. 2(4): 46-53.
- Maity, S., Roy, S., Chaudhury, S. & Bhattacharya, S. (2008).** Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. *Environmental Pollution*. 151(1): 1-7. Doi: 10.1016/j.envpol.2007.03.005.
- Maity, S., Poráčová, J., Dey, P., Vašková, J., Vaško, L., Sedlák, V. & Blaščáková, M.M. (2018).** Antioxidant responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* of eastern Slovakia: application of principal component analysis as a tool to identify metal contaminated areas. *Environmental monitoring and assessment*. 190(1): 1-16. Doi: 10.1007/s10661-017-6377-5.
- Mannervik, B. (1985).** The isoenzymes of glutathione transferase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 57: 357-417.
- Marino, K.B., Hoover-Miller, A., Conlon, S., Prewitt, J. & O'Shea, S.K. (2011).** Quantification of total mercury in liver and heart tissue of Harbor Seals (*Phoca vitulina*) from Alaska USA. *Environmental research*. 111(8): 1107-1115. Doi: 10.1016/j.envres.2011.07.010.
- Mathieu, C. & Peilain, F. (2003).** *Analyse chimique des sols (Méthodes choisies)*. Edition. Tec et Doc. Paris. 387 p.
- Mayer, F.L., Versteeg, D.J., McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C. & Rattner, B.A. (1992).** Physiological and nonspecific biomarkers. In *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. (Ed. R.J. Huggett), Lewis Publishers, Chelsea, MI. pp. 5-86.
- McCarthy, J.F. & Shugart, L.R. (1990).** *Biomarkers of environmental contamination* (p: 457). Boca Raton, FL: Lewis Publishers.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M. & Yu, H. (2000).** Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 19(8): 2085-2092. Doi: 10.1002/etc.5620190818.
- Marhan, S. & Scheu, S. (2005).** The influence of mineral and organic fertilizers on the growth of the endogenic earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Savigny). *Pedobiologia*. 49(3): 239-249. Doi: 10.1016/j.pedobi.2004.11.002.
- Mekahlia, M.N., Tine, S., Menasria, T., Amieur, H. & Salhi, H. (2016).** In vitro biomarker responses of earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to herbicide sekator and phosphate fertilizer. *Water, Air & Soil Pollution*. 227(1): 1-8. Doi: 10.1007/s11270-015-2712-z.

- Meyer, A.J. & Hell, R. (2005).** Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research*. 86(3): 435-457. Doi: 10.1007/s11120-005-8425-1.
- Miglani, R. & Bisht, S.S. (2019).** World of earthworms with pesticides and insecticides. *Interdisciplinary Toxicology*. 12 (2): 71-82. Doi: 10.2478/intox-2019-0008.
- Mikkelsen, U.R, Fredsted, A., Gissel, H. & Clausen, T. (2004).** Excitation-induced Ca<sup>2+</sup> influx and muscle damage in the rat: loss of membrane integrity and impaired force recovery. *The Journal of Physiology*. 559(1): 271-285. Doi: 10.1113/jphysiol.2004.067199.
- Milinović, J., Lukić, V., Nikolić-Mandić, S. & Stojanović, D. (2008).** Concentrations of heavy metals in NPK fertilizers imported in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine (Belgrade)*. 23 (3): 195-200.
- Moloney, J.N. & Cotter, T.G. (2018).** ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 80: 50-64. Doi:10.1016/j.semcdb.2017.05.023.
- Molina, M., Aburto, F., Calderón, R., Cazanga, M. & Escudey, M. (2009).** Trace element composition of selected fertilizers used in Chile: phosphorus fertilizers as a source of long-term soil contamination. *Soil and Sediment Contamination*. 18(4): 497-511. Doi: 10.1080/15320380902962320.
- Montanha, F.P., Fredianelli, A.C., Wagner, R., Sacco, S.R., Rocha, D.C.C. & Pimpão, C.T. (2014).** Clinical, biochemical and haemathological effects in *Rhombia quelen* exposed to cypermethrin. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66 (3): 697-704. Doi: 10.1590/1678-41625934.
- Moolman, L.J.H.J., Van Vuren, J.H.J., & Wepener, V. (2007).** Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 68(3): 443-450. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.12.017.
- Morowati, M. (2000).** Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm (*Pheretima elongata*) exposed to a field dose of the herbicide glyphosate. *Environmentalist*. 20: 105-111.
- Morgan, A.J., Turner, M.P. & Morgan, J.E. (2002).** Morphological plasticity in metal sequestering earthworm chloragocytes: morphometric electron microscopy provides a biomarker of exposure in field populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 (3): 610-618. Doi :10.1002/etc.5620210321.
- Morgan, A.J. & Turner, M.P. (2005).** Quantitative ultrastructure of metal-sequestering cells reflects intersite and interspecies differences in earthworm metal burdens. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 49(1): 45-52. Doi: 10.1007/s00244-004-0012-5.

**Morin, E. (2004).** Lombricompostage, une façon écologique de traiter les résidus organiques. In : Eco-quartier Peter McGill., Ed. Guide pratique. Montréal, Canada : Ministère de l'Environnement du Québec.

**Morrison, D.E., Robertson, B.K. & Alexander, M. (2000).** Bioavailability to earthworms of aged DDT, DDE, DDD, and dieldrin in soil. *Environmental Science & Technology*. 34(4): 709-713. Doi: 10.1021/es9909879.

**Mosleh, Y.Y., Ismail, S.M.M., Ahmed, M.T. & Ahmed, Y.M. (2003).** Comparative toxicity and biochemical responses of certain pesticides to the mature earthworm *Aporrectodea caliginosa* under laboratory conditions. *Environmental Toxicology*. 18(5): 338-346. Doi:10.1002/tox.10134.

**Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S. & Biagianti-Risbourg, S. (2006).** Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere*. 64(1): 121-128. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.10.045.

**Moussavou Moudouma, C.F. (2010).** Etude des mécanismes d'accumulation du cadmium chez *Arabidopsis thaliana* (écotype Wassilewskija) et chez un mélèze hybride (*Larix x eurolepis*) par des approches moléculaire et développementale. Thèse de Doctorat en Biologie de l'Environnement. Université de Limoges. 223p

**Muthukaruppan, G., Janardhanan, S. & Vijayalakshmi, G. (2005).** Sublethal Toxicity of the Herbicide Butachlor on the Earthworm *Perionyx sansibaricus* and its Histological Changes (5 pp). *Journal of Soils and Sediments*. 5(2) : 82-86.

## N

**Nathan, S.S., Kalaivani, K., Chung, P.G. & Murugan, K. (2006).** Effect of neem limonoids on lactate dehydrogenase (LDH) of the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Chemosphere*. 62(8): 1388-1393. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.07.009.

**Nayak, S., Mishra, C.S. K., Guru, B.C. & Samal, S. (2018).** Histological anomalies and alterations in enzyme activities of the earthworm *Glyphidrilus tuberosus* exposed to high concentrations of phosphogypsum. *Environmental Monitoring and Assessment*. 190(9): 1-7. Doi: 10.1007/s10661-018-6933-7.

**Nmaduka, N.J., Samuel, U.C. & Akudo, O.C. (2018).** Research Article Biomarkers in *Achatina achatina* as Ecological Risk Assessment Models of Mining Activities. *Research Journal of Environmental Toxicology* 12 (2): 63-72. Doi: 10.3923/rjet.2018.63.72.

**Novais, S.C., Gomes, S.I.L., Gravato, C., Guilhermino, L., De Coen, W., Soares, A.M.V. M. & Amorim, M.J.B. (2011).** Reproduction and biochemical responses in *Enchytraeus*

*albidus* (Oligochaeta) to zinc or cadmium exposures. *Environmental Pollution*. 159(7): 1836-1843. Doi:10.1016/j.envpol.2011.03.031.

## O

**OECD (1984).** Guideline for the testing of chemicals. No. 207. Earthworm, acute toxicity tests. Organization for Economic Co-operation and Development OECD Publishing. Paris.

**OECD (2006).** Guideline for Testing of Chemicals No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Paris.

**OECD (2016).** Guideline for the testing of chemicals. No. 222. Reproduction Test in earthworms (*Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*). Organization for Economic Co-operation and Development OECD Publishing. Paris.

**Oluah, M.S., Obiezue, R.N.N., Ochulor, A.J. & Onuoha, E. (2010).** Toxicity and histopathological effect of atrazine (herbicide) on the earthworm *Nsukkadrilus mbae* under laboratory conditions. *Animal Research International*. 7(3): 1287-1293.

**Olvera-Velona, A., Capowicz, Y., Mascle, O., Ortiz-Hernandez, L. & Benoit, P. (2008).** Assessment of the toxicity of ethyl-parathion to earthworms (*Aporrectodea caliginosa*) using behavioural, physiological and biochemical markers. *Applied Soil Ecology*. 40(3): 476-483. Doi: 10.1016/j.apsoil.2008.07.002.

**Omodeo, P., Rota, E. & Baha, M. (2003).** The megadrile fauna (Annelida: Oligochaeta) of Maghreb: A biogeographical and ecological characterization. The 7th International Symposium Onearthworm Ecology. *Pedobiologia* 47(5-6): 458-465. Doi: 10.1078/0031-4056-00213.

**Otmani, H., Tadjine, A., Moumeni, O., Zeriri, I., Amamra, R., Djekoune, S. & Berrebbah, H. (2018).** Biochemical responses of the earthworm *Allolobophora caliginosa* exposed to cadmium contaminated soil in the Northeast of Algeria. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 87 : 1-12. Doi: 10.25518/0037-9565.7331.

## P

**Padmaja, R.J. & Rao, M.B. (1994).** Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53(1): 142-148.

**Paravani, E.V., Simoniello, M.F., Poletta, G.L. & Casco, V.H. (2019).** Cypermethrin induction of DNA damage and oxidative stress in zebrafish gill cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 173: 1-7. Doi:10.1016/j.ecoenv.2019.02.004.

- Passi, M., Shukla, V. & Deswal, P. (2021).** Effect of chemical and bio-fertilizers on the life table attributes of *Eisenia fetida*. *Journal of Applied and Natural Science*. 13(4): 1524 - 1530. Doi: 10.31018/jans.v13i4.2973.
- Pavliidi, N., Vontas, J. & Van Leeuwen, T. (2018).** The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Current Opinion in Insect Science*. 27: 97-102. Doi: 10.1016/j.cois.2018.04.007.
- Peakall, D.B. & Shugart, L.R. (1993).** Biomarkers. Research and Application in the Assessment of Environmental Health. Berlin: Springer.
- Peakall, D.B. (1994).** The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*. 3(3): 157-160.
- Pelosi, C., Bertrand, C., Daniele, G., Coeurdassier, M., Benoit, P., Néliu, S. & Fritsch, C. (2021).** Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 305: 2-13. Doi: 10.1016/j.agee.2020.107167.
- Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M. & Vandenbulcke, F. (2014).** Pesticides and earthworms: a review. *Agronomy for Sustainable Development*. 34 (1):199-228. Doi: 10.1007/s13593-013-0151-z.
- Pelosi, C., Joimel, S. & Makowski, D. (2013).** Searching for a more sensitive earthworm species to be used in pesticide homologation tests – a meta-analysis. *Chemosphere*. 90 (3) : 895–900. Doi:10.1016/j.chemosphere.2012.09.034.
- Pelosi, C. (2008).** Modélisation de la dynamique d’une population de vers de terre *Lumbricus terrestris* au champ. Contribution à l’étude de l’impact des systèmes de culture sur les communautés lombriciennes. Sciences de la Terre. PhD Thesis. L’institut des Sciences et Industries du Vivant et de l’Environnement (AgroParisTech), France.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C., Leitao, M.A., Okamoto, O.K., Morse, D. & Colepicolo, P. (2003).** Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*. 39(6): 1008-1018. Doi:10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x.
- Piola, L., Fuchs, J., Oneto, M.L., Basack, S., Kesten, E. & Casabé, N. (2013).** Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. *Chemosphere*. 91(4): 545-551. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.12.036.
- Prashar, P. & Shah, S. (2016).** Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. *Sustainable Agriculture Reviews*. 19: 331-361. Doi: 10.1007/978-3-319-26777-7\_8.
- Prisa, D. (2019).** Earthworm humus for the growth of vegetable plants. *International Journal of Current Multidisciplinary Studies*. 5(2): 968-969.

## Q

**Qiu, H., Peijnenburg, W.J.G.M., van Gestel, C.A.M. & Vijver, M.G. (2014).** Can commonly measurable traits explain differences in metal accumulation and toxicity in earthworm species? *Ecotoxicology*. 23 (1): 21-32.

## R

**Radu, M., Munteanu, M.C., Petrache, S., Serban, A.I., Dinu, D., Hermenean, A. & Dinischiotu, A. (2010).** Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells. *Acta Biochimica Polonica*. 57(3): 355-360. Doi: 10.18388/abp.2010\_2416.

**Ragab, F. & Shoukry, N.M. (2006).** Influence of certain fertilizers on the activity of some molluscicides against *Biomphalaria alexandrina* and *Lymnaea natalensis* snails. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 36(3): 959-977.

**Rai, N., Ashiya, P. & Rathore, D.S. (2014).** Comparative study of the effect of chemical fertilizers and organic fertilizers on *Eisenia foetida*. *International Journal of Innovative Research in Science*. 3(5): 12991-12998.

**Rao, J.V., Pavan, Y.S. & Madhavendra, S.S. (2003).** Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54(3): 296-301. Doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00013-1.

**Ravi, K., Ramachandran, B. & Subramanian, S. (2004).** Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life sciences*. 75(22): 2717-2731. Doi: 10.1016/j.lfs.2004.08.005.

**Ravi Kiran, T. & Aruna, H.K. (2010).** Antioxidant enzyme activities and markers of oxidative stress in the life cycle of earthworm, *Eudrilus eugeniae*. *Italian Journal of Zoology*. 77(2): 144-148. Doi: 10.1080/11250000902932841.

**Reddy, N.C. & Rao, J.V. (2008).** Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71(2): 574-582. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.01.003.

**Reinecke, A.J. & Reinecke, S.A. (2004).** Earthworms as test organisms in ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems. *Earthworm Ecology*. 299-320.

**Reinecke, S.A. & Reinecke, A.J. (2007):** The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66(2): 244-251. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.10.006.

**Ribeiro, S., Guilhermino, L., Sousa, J.P. & Soares, A.M.V.M. (1999).** Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of

chemicals to soil Isopods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 44: 287-293. Doi: 10.1006/eesa.1999.1837.

**Ribeiro, S., Sousa, J.P., Nogueira, A.J.A. & Soares, A.M.V.M. (2001).** Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 49(2): 131-138. Doi: 10.1006/eesa.2001.2045.

**Richardson, J.B., Gorres, J.H. & Sizmur, T. (2020).** Synthesis of earthworm trace metal uptake and bioaccumulation data: role of soil concentration, earthworm ecophysiology, and experimental design. *Environmental Pollution*. 262: 1-46. Doi:10.1016/j.envpol.2020.114126.

**Rico, A., Sabater, C. & Castillo, M.Á. (2016).** Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. 127: 222-229. Doi:10.1016/j.ecoenv.2016.02.004.

**Riseh, N.S., Ghadamyari, M. & Motamediniya, B. (2013).** Biochemical characterisation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases and  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidases from red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Col.: Curculionide). *Plant Protection Science*. 48(2): 85-93.

**Roberts, B.L. & Dorough, H.W. (1985).** Hazards of chemicals to earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 4(3): 307-323. Doi:10.1002/etc.5620040306.

**Robert, J.B. (2008).** *Environmental Horticulture*. Institute of Food and Agriculture Sciences, University of Florida. Gainesville Florida. *Organic Farming*. 326: 11-12.

**Rodríguez-Castellanos, L. & Sanchez-Hernandez, J.C. (2007).** Earthworm biomarkers of pesticide contamination: current status and perspectives. *Journal of Pesticide Science*. 32(4) : 360-371. Doi:10.1584/jpestics.R07-14.

**Rodriguez-Mahou, M., Salcedo, M., Fernandez-Cruz, E., Tiscar, J.L.R., Bañares, R., Clemente, G. & Rodriguez-Sainz, C. (2007).** Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with GSTT1 null genotype as prognostic marker: long-term follow-up after liver transplantation. *Transplantation*. 83(8): 1126-1129. Doi : 0.1097/01.tp.0000259963.47350.da.

**Roots, B.I. (1960).** Some observations on the chloragogenous tissue of earthworms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1(3): 218-226. Doi : 10.1016/0010-406X(60)90025-6.

S

**Saleeb, N., Robinson, B., Cavanagh, J., Ross, J., Munir, K. & Gooneratne, R. (2020).** Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in *Aporrectodea caliginosa* earthworms exposed to AgNPs and AgNO<sub>3</sub> in spiked soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 39 (6): 1257-1266. Doi:10.1002/etc.4713.

**Sales Junior, S.F., da Silva, E.O., de Farias Araujo, G., Souza Soares, L.O., Parente, C.E. T. & Correia, F.V. (2021).** Antioxidant system alterations and biological health status of earthworms following long-term exposure to antibiotic-contaminated poultry litter. *Environmental Science and Pollution Research*. 1-12. Doi: 10.1007/s11356-021-17599-9.

**Sales Junior, S.F., Vallerie, Q., de Farias Araujo, G., Souza Soares, L.O., Oliveira da Silva, E., Correia, F.V. & Saggiaro, E.M. (2020).** Triclocarban affects earthworms during long-term exposure: Behavior, cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity assessments. *Environmental Pollution*. 267 : 2-9. Doi:10.1016/j.envpol.2020.115570.

**Samal, S., Mishra, C.S.K. & Sahoo, S. (2019).** Setal-epidermal, muscular and enzymatic anomalies induced by certain agrochemicals in the earthworm *Eudrilus eugeniae* (Kinberg). *Environmental Science and Pollution Research*. 26(8): 8039-8049. Doi: 10.1007/s11356-019-04204-3.

**Sanchez-Hernandez, J.C. (2006).** Earthworm Biomarkers in Ecological Risk Assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 85-126. Doi: 10.1007/978-0-387-32964-2\_3.

**Sanchez-Hernandez, J.C., Narvaez, C., Sabat, P. & Martínez Mocillo, S. (2014).** Integrated biomarker analysis of chlorpyrifos metabolism and toxicity in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Science of The Total Environment*. 490: 445-455. Doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.0.

**Sathishsekar, D. & Subramanian, S. (2005).** Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pacific journal of Clinical Nutrition*. 14(2): 153-158.

**Schon, N., Mackay, A., Gray, R., Van Koten, C. & Dodd, M. (2017).** Influence of earthworm abundance and diversity on soil structure and the implications for soil services throughout the season. *Pedobiologia*. 62: 41-47. Doi : 10.1016/j.pedobi.2017.05.001.

**Schreck, E., Geret, F., Gontier, L. & Treilhou, M. (2008).** Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa* nocturna. *Chemosphere*. 71(10): 1832-1839. Doi:10.1016/j.chemosphere.2008.02.003.

**Scott-Fordsmand, J.J. & Weeks, J.M. (2000).** Biomarkers in earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 165: 117-159. Doi: 10.1007/978-1-4612-1172-3\_3.

**Sheibani, S. & Ahangar, A. (2013).** Effect of tillage on soil biodiversity. *Journal of Novel Applied Sciences*. 2(8):273-281

**Shefali, B.L.J. & Yadav, R.G.J. (2018).** Assessment of histological alterations induced by heavy metal exposure on earthworms. *International Journal of Chemical Studies*. 6(5): 1436-1438.

- Shekari, M., Sendi, J.J., Etebari, K., Zibae, A. & Shadparvar, A. (2008).** Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 91(1): 66-74. Doi: 10.1016/j.pestbp.2008.01.003.
- Shi, Y., Shi, Y., Wang, X., Lu, Y. & Yan, S. (2007).** Comparative effects of lindane and deltamethrin on mortality, growth, and cellulose activity in earthworms (*Eisenia fetida*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 89(1):31-38. Doi: 10.1016/j.pestbp.2007.02.005.
- Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyek, C.A., Newhall, A.R. & Friedman, L. (1967).** A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, Lipid, and Glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytical Biochemistry*. 19(3): 514-528. Doi: 10.1016/0003-2697(67)90242-4.
- Shruthi, N., Biradar, A.P. & Muzammil, S. (2017).** Toxic effect of inorganic fertilizers to earthworms (*Eudrilus eugeniae*). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5(6): 1135-1137.
- Sifi, K. & Soltani, N. (2019).** Seasonal changes of two biomarkers of oxidative stress (LDH, MDA) in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia) from the Gulf of Annaba (Algeria): correlation with carbohydrate and lipid contents. *Molluscan Research*. 39(1): 44-52. Doi: 10.1080/13235818.2018.1499389.
- Simioni, C., Zauli, G., Martelli, A.M., Vitale, M., Sacchetti, G., Gonelli, A. & Neri, L.M. (2018).** Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*. 9(24): 17181-17198. Doi: 10.18632/oncotarget.24729.
- Sims, R.W. & Gerard, B.M. (1999).** Earthworms. Notes for the identification of British Species. 4th Edition. Published for the Linnean Society of London and The Estuarine and Coastal Sciences Association by the Field Studies Council. Montford Bridge. Shrewsbury. 169 p.
- Solé, M. (2020).** Biomarkers in Earthworms. *The Handbook of Environmental Chemistry*. Doi:10.1007/698\_2020\_628.
- Song, P., Ping, L., Gao, J., Li, X., Zhu, M. & Wang, J. (2018).** Ecotoxicological effects of fertilizers made from pulping waste liquor on earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 166: 237-241. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.09.092.
- Song, Y., Zhu, L.S., Wang, J., Wang, J.H., Liu, W. & Xie, H. (2009).** DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biology and Biochemistry*. 41(5): 905-909. Doi:10.1016/j.soilbio.2008.09.009.
- Smolders, R., De Boeck, G. & Blust, R. (2003).** Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 22(4): 890-899. Doi: 10.1897/1551-5028(2003)0222.0.CO; 2.

**Spurgeon, D.J. & Hopkin, S.P. (1996).** Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 35:86-95. Doi:10.1006/eesa.1996.0085.

**Stanley, J. & Preetha, G. (2016).** Pesticide Toxicity to Non-target Organisms. Doi: 10.1007/978-94-017-7752-0.

**Sun, L., Wang, J., Li, X. & Cao, C. (2019).** Effects of phenol on glutathione S-transferase expression and enzyme activity in *Chironomus kiiensis* larvae. *Ecotoxicology*. 28(7): 754-762. Doi: 10.1007/s10646-019-02071-9.

**Sun, Z. & Jiang, H. (2017).** Nutritive evaluation of earthworms as human food. *Future Food*. 37: 128-141. Doi: 10.5772/intechopen.70271.

**Świątek, Z.M. & Bednarska, A.J. (2019).** Energy reserves and respiration rate in the earthworm *Eisenia andrei* after exposure to zinc in nanoparticle or ionic form. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(24): 24933-24945. Doi: 10.1007/s11356-019-05753-3.

## T

**Taleb-Senouci, D., Ghomari, H., Krouf, D., Bouderbala, S., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A. & Bouchenak, M. (2009).** Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 16(6-7): 623-631. Doi: 10.1016/j.phymed.2008.12.004.

**Tiwari, R.K., Singh, S., Pandey, R.S. & Sharma, B. (2016):** Enzymes of earthworm as indicators of pesticide pollution in soil. *Advances in Enzyme Research*. 4 (04):113-124. Doi: 10.4236/aer.2016.44011.

**Tripathi, G., Kachhwaha, N., Dabi, I. & Bandooni, N. (2011).** Temperature-dependent alterations in metabolic enzymes and proteins of three ecophysiologicaly different species of earthworms. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 54 (4): 769-776. Doi: 10.1590/S1516-89132011000400017.

**Tripathi, G., Kachhwaha, N. & Dabi, I. (2009).** Impact of phorate on malate dehydrogenases, lactate dehydrogenase and proteins of epigeic, anecic and endogeic earthworms. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 95(2): 100-105. Doi:10.1016/j.pestbp.2009.07.004.

## V

**Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N.P. (2003).** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13(2): 57-149. Doi: 10.1016/s1382-6689(02)00126-6.

**Van der Oost, R., Lopes, S.C.C., Komen, H., Satumalay, K., van den Bos, R., Heida, H. & Vermeulen, N.P.E. (1998).** Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*): Use of a bioactivation: detoxication ratio as a Biotransformation Index (BTI). *Marine Environmental Research*. 46(1-5): 315-319. Doi: 10.1016/s0141-1136(97)00096-2.

**Van Gestel, C.A.M., Dirven-van Breemen, E.M. & Kamerman, J.W. (1992).** Beoordeling van gereinigde grond. IV. Toepassing van bioassays met planten en regenwormen op referentiegronden. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands. RIVM Rapport 216402004.

**Van Gestel, C.A.M. & Van Brummelen, T.C. (1996).** Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*. 5(4): 217-225.

**Van Gestel, C.A.M., Zaal, J., Dirven-Van Breemen, E.M. & Baerselman, R. (1995).** Comparison of two test methods for determining the effects of pesticides on earthworm reproduction. *Acta Zoologica Fennica*. 196: 278-283.

**Van Rhee, J.A. & Nathans, S. (1961).** Observations on earthworm populations in orchard soils. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 9(2): 94-100. Doi: 10.18174/njas.v9i2.17623.

**Velki, M., Hackenberger, B.K., Lončarić, Ž. & Hackenberger, D.K. (2014).** Application of microcosmic system for assessment of insecticide effects on biomarker responses in ecologically different earthworm species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104: 110-119. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.02.006.

**Vijver, M.G. (2005).** The Ins and Outs of Bioaccumulation: Metal Bioaccumulation Kinetics in Soil Invertebrates in Relation to Availability and Physiology. Febo Druk BV.

**Vogel, J. & Seifert, G. (1992).** Histological changes in the chloragogen tissue of the earthworm *Eisenia fetida* after administration of sublethal concentrations of different fluorides. *Journal of Invertebrate Pathology*. 60(2): 192-196. Doi:10.1016/0022-2011(92)90096-m.

## W

**Wang, F., Ji, R., Jiang, Z. & Chen, W. (2014).** Species-dependent effects of biochar amendment on bioaccumulation of atrazine in earthworms. *Environmental Pollution*. 186: 241-247. Doi: 10.1016/j.envpol.2013.12.012.

**Wang, Z., Li, C., Shao, Y., Xue, W., Wang, N., Xu, X., & Zhang, Z. (2021).** Antioxidant defense system responses, lysosomal membrane stability and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to perfluorooctanoic acid: an integrated biomarker approach to evaluating toxicity. *RSC Advances*. 11(43): 26481-26492. Doi: 10.1039/d1ra04097a.

**Weckberker, G. & Cory, J.G. (1988).** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemial 1210 cells in vitro. *Cancer lettres.* 40: 257-264. Doi: 10.1016/0304-3835(88)90084-5.

**Wu, J., Ren, Z., Zhang, C., Motelica-Heino, M., Deng, T., Wang, H. & Dai, J. (2020).** Effects of soil acid stress on the survival, growth, reproduction, antioxidant enzyme activities, and protein contents in earthworm (*Eisenia foetida*). *Environmental Science and Pollution Research.* 27(27): 33419-33428. Doi: 10.1007/s11356-019-04643-y.

**Wu, S.J., Wu, E.M., Qiu, L.Q., Zhong, W.H. & Chen, J.M. (2011).** Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. *Chemosphere* 83(4): 429-434. Doi : 10.1016/j.chemosphere.2010.12.082.

**Wu, S.J., Zhang, H.X., Zhao, S.L., Wang, J.L., Li, H.L. & Chen, J.M. (2012).** Biomarker responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to phenanthrene and pyrene both singly and combined in microcosms. *Chemosphere.* 87(4): 285-293. Doi : 10.1016/j.chemosphere.2011.11.055.

## X

**Xiao, N., Jing, B., Ge, F. & Liu, X. (2006).** The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere.* 62: 1366-1373. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.07.043. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.07.043.

**Xu, X. B., Shi, Y. J., Lu, Y. L., Zheng, X. Q. & Ritchie, R. J. (2015).** Growth inhibition and altered gene transcript levels in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 69(1): 1-7. Doi: 10.1007/s00244-014-0125-4.

**Xue, Y.G., Gu, X.Y., Wang, X.R., Sun, C., Xu, X.H., Sun, J. & Zhang, B.G. (2009).** The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. *Ecotoxicology.* 18 (6): 693-699. Doi: 10.1007/s10646-009-0333-2.

**Xu, Z., Yang, Z., Shu, W. & Zhu, T. (2021).** Combined toxicity of soil antimony and cadmium on earthworm *Eisenia fetida*: Accumulation, biomarker responses and joint effect. *Journal of Hazardous Materials Letters.* 2: 2-8. Doi: 10.1016/j.hazl.2-8.100018.

## Y

**Yahyaabadi, M., Hamidian, A.H. & Ashrafi, S. (2018).** Dynamics of earthworm species at different depths of orchard soil receiving organic or chemical fertilizer amendments. *Eurasian Journal of Soil Science.* 7(4): 318-325. Doi : 10.18393/ejss.454506.

**Yan, T., Teo, L.H. & Sin, Y.M. (1997).** Effect of Mercury and lead on tissue Glutathion of the Green Mussel, *Perna viridis* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 58: 845-850.

- Yao, X., Zhang, F., Qiao, Z., Yu, H., Sun, S., Li, X. & Jiang, X. (2020).** Toxicity of thifluzamide in earthworm (*Eisenia fetida*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 188: 2-10.109880. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109880.
- Yao, X., Qiao, Z., Zhang, F., Liu, X., Du, Q., Zhang, J. & Jiang, X. (2021).** Effects of a novel fungicide benzovindiflupyr in *Eisenia fetida*: Evaluation through different levels of biological organization. *Environmental Pollution*. 271:2-56. Doi: 10.1016/j.envpol.2020.116336.
- Yasmin, S. & D'Souza, D. (2007).** Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 79(5): 529-532. Doi: 10.1007/s00128-007-9269-5.
- Yasmin, S. & D'Souza, D. (2010).** Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: a review. *Applied and Environmental Soil Science*. 2-10 Doi: 10.1155/2010/678360.
- Ye, Q., Huang, J.H., Li, M., Li, H.Y., Liu, J.S., Lu, S. & Yang, W.D. (2020).** Responses of cytochrome P450, GST and MXR in the mussel *Perna viridis* to the exposure of *Aureococcus anophagefferens*. *Marine Pollution Bulletin*. 161: 2-11. Doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111806.
- Ye, X., Xiong, K. & Liu, J. (2016).** Comparative toxicity and bioaccumulation of fenvalerate and esfenvalerate to earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of hazardous materials*. 310 : 82-88. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.02.010.
- Yue, S., Huang, C., Wang, R., & Qiao, Y. (2021).** Selenium toxicity, bioaccumulation, and distribution in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to different substrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 217: 2-8. Doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112250.
- Yuvaraj. A., Karmegam. N. & Thangaraj. R. (2018).** Vermistabilization of papermill sludge by an epigeic earthworm *Perionyx excavatus*: mitigation strategies for sustainable environmental management. *Ecological Engineering*. 120: 187-197. Doi:10.1016/j.ecoleng.2018.06.008.
- Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q. & Li, P. (2020).** Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. *Nanoscale Research Letters* 15(1): 2-14. Doi: 10.1186/s11671-020-03344-7.

## Z

- Zeriri, I., Tadjine, A., Belhaouchet, N., Berrebbah, H., Djebbar, M. R. & Baha, M. (2013).** Contribution to the identification of Oligochaeta: Lumbricidae in the region of Annaba in eastern Algeria. *European Journal of Experimental Biology*. 3(6): 229-232.
- Zeriri, I., Tadjine, A., Grara, N., Belhaouchet, N., Berrebbah, H. & Djebbar, M. R. (2012).** Potential toxicity of an insecticide of the family of carbamates on a bio-indicator

model of the pollution the earthworm *Octodrilus complanatus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Annals of Biological Research. 3(11): 5367-5373.

**Zerrouki, L., Essarhane, W., Hamil, S. & Baha, M. (2019).** The Earthworm Fauna of Chréa National Park (Algeria). In Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration. Springer. Cham.1363-1368.

**Zhang, Q., Zhang, B. & Wang, C. (2014).** Ecotoxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* following exposure to soil contaminated with imidacloprid. Environmental Science and Pollution Research. 21(21): 12345-12353. Doi: 10.1007/s11356-014-3178-z.

**Zhao, S., Qiu, S. & He, P. (2018).** Changes of heavy metals in soil and wheat grain under long-term environmental impact and fertilization practices in North China. Journal of Plant Nutrition. 41(15): 1970-1979. Doi: 10.1080/01904167.2018.1485158.

**Zhao, Y., Li, G., Qi, D., Sun, L., Wen, C. & Yin, S. (2017).** Biomarker responses of earthworms (*Eisenia fetida*) to soils contaminated with perfluorooctanoic acid. Environmental Science and Pollution Research. 24(27): 22073-22081. Doi: 10.1007/s11356-017-9776-9.

**Zheng, L., Wei, H., Yu, H., Xing, Q., Zou, Y., Zhou, Y. & Peng, J. (2018).** Fish skin gelatin hydrolysate production by ginger powder induces glutathione synthesis to prevent hydrogen peroxide induced intestinal oxidative stress via the Pept1-p62-Nrf2 cascade. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66(44): 11601-11611. Doi: 10.1021/acs.jafc.8b02840.

**Zheng, X.Q., Shi, Y.J., Lu, Y.L. & Xu, X.B. (2016).** Growth inhibition and DNA damage in the earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to perfluorooctane sulphonate and perfluorooctanoic acid. Chemistry and Ecology. Doi: 10.1080/02757540.2015.1116524.

**Zhou, D. (2020).** Effects of tetracycline on the relationship between the microbial community and oxidative stress in earthworms based on canonical correlation analysis. Environmental Toxicology and Pharmacology. 76 : 2-7. Doi:10.1016/j.etap.2020.103342.

**Zhou, D., Tang, Y. & Jiang, W. (2016).** A Modified Model of Failure Mode and Effects Analysis Based on Generalized Evidence Theory. Mathematical Problems in Engineering.1-11. Doi:10.1155/2016/4512383.

**Zhou, Q.X., Zhang, Q.R. & Liang, J.D. (2006).** Toxic effects of acetochlor and methamidophos on earthworm *Eisenia fetida* in phaiozem, northeast China. Journal of Environmental Sciences. 18(4): 741-745.

**Zhou, S., Duan, C., Wang, X., Michelle, W.H.G., Yu, Z. & Fu, H. (2008).** Assessing cypermethrin-contaminated soil with three different earthworm test methods. Journal of Environmental Sciences. 20(11): 1381-1385. Doi: 10.1016/S1001-0742(08)62236-6.

**Zhu, L., Dong, X., Xie, H., Wang, J., Wang, J., Su, J. & Yu, C. (2011).** DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology. 26(5): 480-488. Doi: 10.1002/tox.20575.

**Zhu, Y., Jia, Y., Liu, M., Yang, L., Yi, S., Feng, X. & Zhu, L. (2021).** Mechanisms for tissue-specific accumulation and phase I/II transformation of 6: 2 fluorotelomer phosphate diester in earthworm (*M. guillelmi*). *Environment International*. 151 : 2-9. Doi : 10.1016/j.envint.2021.106451.

# *ANNEXES*

## VIII. ANNEXE

### PRODUCTION SCIENTIFIQUE

#### I. PUBLICATIONS INTERNATIONALES

**HALAIMIA S**, TINE S, TINE-DJEBBAR F & SOLTANI N. (2021). Potential side-effects of a fertilizer on growth, biochemical composition and biomarker responses of the grey worm (*Aporrectodea caliginosa* Savigny, 1826). Journal of Applied Ecology and Environment Research. 19(2): 1247-1266. Doi: 10.15666/aeer/1902\_12471266.

#### II. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

1. **HALAIMIA S.**, TINE S., TINE-DJEBBAR F., (2017). Growth and energy reserves of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* after exposure to two fertilizers. Biotechnology (IDB-2017). Hammamet-Tunisia (Poster).
2. **HALAIMIA S.**, TINE S., TINE-DJEBBAR F., (2018). Les effets de deux engrais chimiques sur la croissance et les réserves énergétiques d'une espèce bioindicatrice de pollution *Aporrectodea caliginosa*. Congrès International : les Rencontres de l'Agriculture et de la Biologie (RAB). Constantine-Algérie (Communication Orale)
3. **HALAIMIA S.**, TINE S., TINE-DJEBBAR F., (2019). Effet combiné de l'azadirachtine et le spinosad sur l'activité la glutathion-S-transférase (GST), et le taux du glutathion (GSH) sur *Blattella germanica* : (Dictyoptera : Blattellidae). Colloque International sur la Lutte Biologique et Intégrée en Algérie (CILBIA1). Batna-Algérie (Poster).
4. **HALAIMIA S.**, TINE S., TINE-DJEBBAR F., SOLTANI N., (2021). Effects of a Fertilizer on the antioxidant enzyme activities, and biochemical composition in earthworm *Aporrectodea caliginosa*. The 3rd Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI). Sousse-Tunisia. (Communication orale).

#### III. COMMUNICATION NATIONALES

1. **HALAIMIA S.**, TINE S., TINE-DJEBBAR F., (2019). Effet combiné de deux engrais chimiques sur une espèce bioindicatrice de pollution, *Aporrectodea caliginosa* : croissance, composition biochimique et biomarqueur de stress. Le 1er Séminaire National sur : Etat de la biodiversité dans les parcours steppiques : Inventaire et valorisation (SNBS). Tébessa-Algérie (communication orale).

2. **HALAIMIA S., TINE S., TINE-DJEBBAR F., (2021).** Assessment of the toxicity of an inorganic fertilizer to earthworm (*Aporrectodea caliginosa*) using growth, histopathological and biochemical markers. National doctoral day and research posters FSNV (DD & RP). Souk-Ahras-Algérie (communication orale).

#### IV. FORMATIONS

- Participation au workshop: "Scientific paper: How to succeed its redaction and publication?"
- Participation à la formation en biostatistique "Logiciel Graph Pad prism 7".
- Atelier de formation au niveau du centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques (Alger) pour l'initiation à la technique SAA.
- Stage d'initiation à la technique histologique à l'hôpital Professeur Nefissa Hamoud (ex Parnet). Service de biologie cellulaire.
- Stage de formation sur l'application du microscope électronique (Nanomatériaux et biologie) à l'université de Ain Chams Faculté des sciences. Caire Egypte.
- Obtention du niveau A2 de la langue anglaise au Centre d'Enseignement Intensif des Langues à l'Université Larbi Tébessi.

#### V. PROJET DE RECHERCHE

- Membre dans un projet de recherche PRFU, intitulé " **Etude de l'impact des pratiques agricoles « Engrais et Pesticides » sur les organismes non visés et la recherche de nouvelles alternatives pour la protection des produits agricoles**"

Code : "D01N01UN120120180005"

**Sous la direction du Dr. Tine Samir.**

- Membre dans un projet de recherche PRFU, intitulé " **Valorisation des Huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales locales dans le domaine agronomique et médical** "

Code : "D01N01UN120120220001"

**Sous la direction du Pr. Tine-Djebbar Fouzia.**