

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de recherche : Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et
Environnement

Structure de Recherche : Laboratoire de Biodiversité, Ecologie et Génome

Discipline : Biologie

Spécialité : Ecotoxicologie

Présentée et soutenue le 21 Décembre 2022 Par :

Hind EL JOUMANI

***Enquête sur l'utilisation du glyphosate dans la région Rabat-Salé-
Kénitra et l'évaluation de la toxicité aquatique de l'herbicide en
utilisant comme modèles biologiques Daphnia magna et Danio rerio***

JURY

Mohammed FAKHAOU	PES, Université Mohammed V, Institut Scientifique -Rabat	Président/Rapporteur
Abdelkader CHAHLAOUI	PES, Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences-Mknès	Examinateur/Rapporteur
Adnane EL HAMIDI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences -Rabat	Examinateur/Rapporteur
Amal SERGHINI	PES, Université Mohammed V, Institut Scientifique -Rabat	Examinateur/Rapporteur
Latifa MOUHIR	PES, Université Hassan II - Faculté des Sciences et techniques -Mohammedia	Examinateur
Mohammed EL ALAMI	Expert, ONEE- Branche eau -Rabat	Co- directeur de Thèse
Mariam NACIRI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Directrice de Thèse

Année Universitaire 2021/2022

DÉDICACE

A l'aide de Dieu tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A mes chères parents **Sidi Mohamed Ali El JOUMANI** et **Lalla Najat MOUSLIH**, les meilleurs au monde, qui ont toujours étaient là pour moi, apporter leurs affection, soutien et encouragement et qui ont rempli ma vie d'amour et de bonheur.

A mes frères et sœurs

A mon cher mari

A mes deux fils

A mes amis : **Imane BERREBAN**, **Younes GHAOUTI**, **Zakariae MEZAYOU**, **Lhssan EL ASKRI** et **Hind EL FILALI**.

A tout qui m'ont aidé soit de proche ou de loin.

REMERCIEMENTS

A l'issue de la rédaction de ce mémoire, je suis convaincue qu'un projet est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité et l'implication m'ont permis de progresser dans cette phase. En signe de gratitude et de reconnaissance, je réserve ces lignes à ces personnes avec un grand plaisir.

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein du Laboratoire Biodiversité, Ecologie et Génome de la Faculté des Sciences - Université Mohammed V de Rabat. Mes premiers et sincères remerciements sont adressés à Monsieur le Doyen de la Faculté des Sciences de Rabat pour l'intérêt exceptionnel qu'il accorde à la recherche scientifique et l'effort considérable qu'il déploie pour la formation de chercheurs au sein de son établissement.

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifesté à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans ce projet.

Je voudrais tout d'abord adresser mes remerciements à, Mme **Mariam NACIRI**, Professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences à Rabat, pour m'avoir assuré un bon encadrement. Je la suis reconnaissante pour sa disponibilité, ses conseils, ses remarques et son encouragement et je la prie de trouver ici l'expression de ma haute considération.

Mes chaleureux remerciements à mon Co-encadrant, Mr **Mohammed EL ALAMI**, chef de direction contrôle qualité des eaux de l'ONEE-branche eau à Rabat. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, il a été toujours là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de mon projet.

Je tiens à remercier sincèrement, Mr **Mohamed FEKHAOUI**, Professeur l'enseignement supérieur à l'institut scientifique de Rabat, d'avoir accepté de juger ce travail. Je tiens à lui exprimer ma respectueuse reconnaissance et ma haute considération pour l'honneur qu'il me fait en acceptant la présidence du Jury.

Je suis également très reconnaissant à, Mr **Abdelkader CHAHLAOUI**, Professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences à Mknès. Je lui adresse un remerciement particulier pour avoir accepté d'être rapporteur et examinateur de cette thèse.

Je suis également très sensible à la présence du, Mr **Adnane EL HAMIDI**, Professeur de l'habilité à Faculté des Sciences de Rabat. Je le prie de trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'être rapporteur et examinateur de ce travail et de siéger au jury de ce travail.

Je remercie vivement, Mme **Amal SERGHINI**, Professeur l'enseignement supérieur à l'institut scientifique de Rabat, qui a bien voulu être rapporteur et examinateur de ce travail.

J'adresse mes remerciements à, Mme **Latifa MOUHIR**, Professeur de l'enseignement supérieur à Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia, pour m'avoir honoré de leur présence en acceptant d'être examinatrice de ce travail et de siéger au jury de cette thèse.

Mes remerciements les plus respectueux et les plus chaleureux à mon frère **Sidi Brahim EL JOUMANI** pour son aide et ses encouragements durant toute la période de mes études.

Pour finir, mais j'aurais pu commencer par eux, je suis extrêmement reconnaissant envers mes parents **Sidi Mohamed Ali EL JOUMANI** et **Lalla Najat MOUSLIH**, mes frères et mes sœurs pour m'avoir donné tous les éléments qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici. Ils sont ma force, ma confiance et ma richesse. Jamais je n'aurai réussi sans eux.

Je remercie enfin tous ceux que je n'ai pas nommés et qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

RÉSUMÉ

La présente étude vise à identifier les différentes formes du glyphosate utilisés dans la région Rabat-Salé-Kénitra, et l'étude de la toxicité chronique du glyphosate chez deux espèces d'eau douce *Daphnia magna* et *Danio rerio*, afin d'évaluer le risque de cet herbicide sur les organismes aquatiques. Pour ce faire, nous avons mené une enquête, à l'aide de 70 fiches questionnaires, qui nous ont permis de collecter le maximum d'informations concernant les usages du glyphosate dans cette région. Des tests chroniques pour les deux modèles biologiques, ont été réalisés au sein du laboratoire ONEE-Branche Eau, pour déterminer des concentrations critiques pour les espèces dulçaquicoles (NOEC, LOEC, EC₅₀). De même, nos résultats soulignent l'intérêt de l'utilisation des tests multigénérations dans l'étude des effets à long terme de ces substance sur une espèce clé d'eau douce *Daphnia magna*. Les résultats montrent que la survie et la reproduction ont été réduites significativement avec l'augmentation de la concentration du pesticide chez les parents et les descendants des daphnies. L'effet toxique du glyphosate est plus prononcé chez la génération fille F4 que chez la génération parentale F0. L'analyse des résultats des tests a révélé que le glyphosate est toxique pour le poisson zèbre. Les résultats montrent que le glyphosate affecte le taux d'éclosion, le rythme cardiaque et la nage des poissons zèbres. Cet effet est significatif la concentration maximale 4 mg/L. L'étude comparative de la sensibilité de *Daphnia magna* au glyphosate par rapport à *Danio rerio*, a révélé que les poissons zèbres sont les organismes aquatiques les plus sensibles pour le paramètre de la survie. L'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt des deux modèles *Daphnia magna* et *Danio rerio* dans l'étude de la toxicité chronique des produits phytosanitaires.

Mots clés : glyphosate, région Rabat-Salé-Kénitra, toxicité aigüe, toxicité chronique, multigénérations, *Daphnia magna*, *Danio rerio*, étude comparative.

ABSTRACT

The present study aims to identify the different forms of glyphosate used in the Rabat-Salé-Kénitra region and to study the chronic toxicity of glyphosate in two freshwater species *Daphnia magna* and *Danio rerio* in order to evaluate the risk of this herbicide on aquatic organisms. To do this, we conducted a survey using 70 questionnaire forms that allowed us to collect as much information as possible concerning the uses of glyphosate in this region. Chronic tests for the two biological models were carried out in the ONEE-Branche Eau laboratory to determine critical concentrations for freshwater species (NOEC, LOEC, EC₅₀). Similarly, our results underline the interest of using multi-generation tests in the study of the long-term effects of these substances on a key freshwater species *Daphnia magna*. The results show that survival and reproduction were significantly reduced with increasing pesticide concentration in parents and offspring of daphnids. The toxic effect of glyphosate was more pronounced in the F4 daughter generation than in the F0 parental generation. Analysis of the test results revealed that glyphosate is toxic to zebrafish. The results show that glyphosate affects the hatching rate, heart rate and swimming performance of zebrafish. This effect was significant at the maximum concentration of 4 mg/L. The comparative study of the sensitivity of *Daphnia magna* to glyphosate versus *Danio rerio*, revealed that zebrafish are the most sensitive aquatic organisms for the survival parameter. All these results underline the interest of the two models *Daphnia magna* and *Danio rerio* in the study of the chronic toxicity of phytosanitary products.

Key words: glyphosate, Rabat-Salé-Kénitra region, acute toxicity, chronic toxicity, multigenerations, *Daphnia magna*, *Danio rerio*, comparative study.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2 : Facteurs d'exploitation pour l'estimation d'une PNEC eau dans l'eau douce. ...	15
Tableau 3: Classification de <i>Daphnia magna</i>	17
Tableau 4: Classification de <i>Danio rerio</i>	26
Tableau 5: Caractéristiques physico chimique du glyphosate	35
Tableau 6: Production mondiale de glyphosate	36
Tableau 7: Toxicité aigüe des plantes, algues et bactéries aquatiques	41
Tableau 8: Toxicité aigüe des invertébrés aquatiques	41
Tableau 9: Toxicité aigüe des vertébrés aquatiques (poissons)	41
Tableau 10: Toxicité chronique des plantes et algues aquatiques	42
Tableau 11: Toxicité chronique des invertébrés aquatiques	42
Tableau 12: Toxicité chronique des vertébrés aquatiques (poissons).....	43
Tableau 13 : Normes utilisant <i>Daphnia magna</i> dans les essais de toxicité aquatique.....	48
Tableau 14 : Normes recommandant <i>Danio rerio</i> pour les essais de toxicité aquatique.....	49
Tableau 15: Vue d'ensemble des données relatives aux effets de glyphosate sur <i>Daphnia magna</i> rapportées dans littérature	124
Tableau 16: Vue d'ensemble des données relatives aux effets de glyphosate sur différentes espèces rapportées dans littérature	124
Tableau 17: Aperçu des études sur l'effet du glyphosate après 48 heures d'exposition	125
Tableau 18: <i>Danio rerio</i> exposé à des concentrations mesurées du glyphosate pendant 30 jours	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Région Rabat –Salé-Kenitra	6
Figure 2: Pluviométrie annuelle par station, en millimètres	7
Figure 3: Ressources en eau de la région d'étude	9
Figure 4: Couvert forestier de la région d'étude	10
Figure 5: Position de l'écotoxicologie	12
Figure 6: a. Photo de <i>Daphnia magna</i> , femelle adulte. b. Anatomie de <i>Daphnia</i> : Antennes (1) ; Œil (2) ; Antennules (3) ; Carapace (4) ; Cœur (5) ; Appendices Thoraciques (6) ; Poche incubatrice (7) ; Anus (8) ; Appendices caudaux (9) ; Epine apicale (10)	18
Figure 7: Dimorphisme sexuel chez <i>Daphnia magna</i> , A (mâle), B (femelle). Le rectangle bleu permet d'illustrer les différences au niveau du post-abdomen.....	18
Figure 8: Cycle de reproduction chez <i>Daphnia magna</i>	19
Figure 9: Daphnie portant les éphippies.....	20
Figure 10: Photos des différents stades de développement embryonnaire chez <i>Daphnia magna</i>	21
Figure 11: Schéma représentant l'alimentation de <i>Daphnia magna</i>	22
Figure 12: Positon des daphnies dans la chaine alimentaire	25
Figure 13 : Poissons mâles adultes.....	27
Figure 14 : Développement embryonnaire.....	28
Figure 15: La vente mondiale des pesticides.....	32
Figure 16: Vente de produits phytosanitaires dans le monde	32
Figure 17: Structure chimique du glyphosate	34
Figure 18: Photos de quelques points visités dans la région d'étude	44
Figure 19: Salle d'élevage des daphnies au sein du laboratoire ONEE	50
Figure 20: Incubation des cultures algales	51
Figure 21: Préparation de la nourriture synthétique.....	51
Figure 22: Schéma de dispositif expérimental pour la réalisation de test aigue	52
Figure 23: Dispositifs expérimental de l'essai aigue sur <i>Daphnia magna</i>	53
Figure 24: Dispositifs expérimental de test chronique sur <i>Daphnia magna</i>	55
Figure 25: Salle d'élevage des poissons zèbres au sein du laboratoire ONEE	57
Figure 26: Conditionnement des géniteurs.....	58
Figure 27: Aquarium de reproduction des géniteurs	59
Figure 28: Essai de toxicité aigue des poissons zèbres en cours de réalisation	60
Figure 29: Essai chronique des poissons zèbres en cours de réalisation.....	62
Figure 30: Exemples de pesticides utilisés dans la région d'étude	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMPA : Acide AminoMéthylPhosphorique

ANESS : Agence National de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du travail

ANZECC: Australian and New Zealand Environment and Conservation Council

ARMCANZ: Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand

ASTM: American Society for Testing and Materials

CACP : Comission des Agréments pour exercer le Commerce des Pesticides

CE₁₀: Concentration Effective 10%.

CE₂₅: Concentration Effective 25%.

CE₅₀ : Concentration Effective 50%.

CEAEQ : Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec.

CEC: Commission of the European Communities.

CEE : Communauté Economique Européenne.

CE_x : Concentration Effective x%.

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CL₅₀ : Concentration Létale 50%.

DL₅₀ : Dose létale pour 50% des individus

EC: European Community

EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

FAO: Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

IMANOR : Institut National de Normalisation.

INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques.

INRA : Institut National de Recherche Agronomique.

ISO : International Standards Organisation.

J : Jours.

K₂Cr₂O₇ : Dichromate de potassium.

Kow : Coefficient de partage octanol/eau.

LCCQE : Laboratoire Central de Contrôle de Qualité des Eaux.

LD : Linges Directrices.

LMR : Limites Maximales des Résidus

LOEC : Lowest Observed Effect Concentration.

MEQEC : Ministère de l'Environnement du Québec et Environnement Canada.

NF : Norme Française

NM : Norme Marocaine

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONEE : Office National de l'Electricité et de l'Eau Potable

ONSSA : Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaire

PEC: Predicted Environmental Concentration

PMV : Plan Maroc Vert

PNEC: Prédicted No Effect Concentration

SAICM : Approche Stratégique pour la gestion Internationale des produits Chimiques

UICPA : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

UPEC: Predicted Environmental ConcentrationT Unité Toxicologique

US EPA: United States Environmental Protection Agency

WHO: World Health Organisation

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications Scientifiques :

Article publié : El Joumani H., El Alami M. et Naciri M. **Effect of Glyphosate on the Generation Parent and Four Successive Generations to *Daphnia magna*.** Toxicology International. 2021, Volume 28, Issue 4, Page 317-325.

Article publié: El Joumani H., El Alami M. et Naciri M. **Acute and Chronic Toxicity of a glyphosate on *Danio rerio*.** Research Journal of Chemistry and Environment. 2021, Volume 25, Issue 9, Page 54-60.

Article soumis: El Joumani H., El Alami M. et Naciri M. **Chronic toxicity of glyphosate in *Daphnia magna* and *Danio rerio*: A comparative study.** Journal of Environmental Biology.

Article soumis: El Joumani H., El Alami M. et Naciri M. **Survey on the use of pesticides and glyphosate in the Region of Rabat-Salé-Kénitra.** Research Journal of Chemistry and Environment.

Article soumis: El Joumani H., El Alami M. et Naciri M. **Acute and Chronic Toxicity of a Pharmaceutical Effluent in Morocco on *Daphnia magna*.** Toxicology International.

Communications:

El Joumani H., El Alami M. et Naciri M. Effet d'un effluent pharmaceutique sur *Daphnia magna*. Journées pratiques francophones des sciences analytiques. Le 28 avril 2017 à Marrakech.

El Joumani H., El Alami M. et Naciri M. Effet d'un effluent pharmaceutique après traitement sur une espèce clé d'eau douce *Daphnia magna*. 1^{er} congrès international de la société marocaine d'Eco toxicologie. Du 19 au 21 octobre 2017 à Agadir.

El Joumani H., El Alami M. et Naciri M. Effet d'un effluent pharmaceutique après traitement sur une espèce clé d'eau douce *Daphnia magna*. 6^{ème} édition du congrès international : eaux, déchets, environnement. Du 12 au 14 décembre 2017 à Béni Mellal.

El Joumani H., El Alami M. et Naciri M. Effet d'un pesticide sur les œufs du poisson zèbre « *Danio rerio* ». Workshop national « protection et valorisation des espaces littoraux et marins- Quelle vision et quelles actions pour une gestion intégrée et durable ? Le 27 juin 2018 à Rabat.

TABLE DE MATIÈRE

REMERCIEMENTS.....	II
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	V
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	X
INTRODUCTION	1
Partie I.....	5
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
CHAPITRE I : PRESENTATION DE LA REGION RABAT-SALE-KENITRA	5
I.1 Ressources hydrographiques	7
I.1.1 Eau de surface	7
I.1.2 Eau souterraine	8
I.2 Forêt	9
I.3 Activité agricole	10
CHAPITRE II : EVALUATION DE LA TOXICITE DES PRODUITS CHIMIQUES POUR LE MILIEU AQUATIQUE	12
II.1 Définition de l'écotoxicologie	12
II.2 Outils d'évaluation écotoxicologiques	12
II.3 Définition des bios essais.....	13
CHAPITRE IV : ASPECTS GENERAUX DES DEUX ESPECES ETUDIEES	17
IV.1 <i>Daphnia magna</i>.....	17
IV.1.1 Classification.....	17
IV.1.2 Anatomie.....	17
IV.1.3 Reproduction.....	18
IV.1.4 Cycle de vie et développement embryonnaire	20

IV.1.5 Alimentation.....	22
IV. 1.6 Comportement.....	23
IV.1.7 Importance écotoxicologique	23
IV. 2 Danio rerio	26
IV.2.1 Classification.....	26
IV.2.2 Anatomie.....	26
IV.2.3 La reproduction et cycle de vie	27
IV.2.4 Alimentation.....	28
IV.2.5 Comportement.....	28
IV.2.6 Intérêt écologique	28
CHAPITRE V : GENERALITE SUR LES PESTICIDES.....	30
V.1 Définition pesticide	30
V.2 Cadre réglementaire des pesticides.....	30
V.2.1 La législation des pesticides internationale	30
V.2.2 La législation des pesticides au Maroc.....	31
V.3 La consommation et la vente mondiale des pesticides	32
V.4 Glyphosate.....	33
V.4.1 Propriétés générale.....	33
V.4.2 Utilisation du glyphosate dans le monde.....	35
V.4.3 Situation actuelle de l'utilisation du glyphosate au Maroc.....	36
V.4.4 Présence du glyphosate dans l'environnement.....	36
V.4.5 Comportement du glyphosate dans l'environnement.....	37
V.4.5.1 Comportement dans le sol	37
V.4.5.2 Comportement dans l'eau	38
V.4.5.3 Comportement dans l'air	38
V.4.6 Toxicité du glyphosate	38
V.4.6.1 Toxicité chez les animaux.....	38
V.4.6.1.1 Toxicité aigue	38
V.4.6.1.2 Toxicité subchronique et chronique	39
V.4.6.2 Cancérogénicité du glyphosate	40
V.4.6.3 Toxicité chez les espèces aquatiques.....	40
Partie II	44
MATERIELS ET METHODES	44

I. ENQUETES SUR L'UTILISATION DES PESTICIDES NOTAMMENT LE GLYPHOSATE DANS LA REGION RABAT-SALE-KENITRA.....	44
I.1. Points d'enquêtes sur terrain.....	44
I.2 Fiche questionnaire et type d'informateur	44
II. SUBSTANCE ETUDIEE.....	46
II.1 Toxique de référence.....	46
II.2 Solution testée	47
III. CHOIX DES MODELES BIOLOGIQUE EN ECOTOXICOLOGIE.....	48
IV. L'ESPECE DAPHNIA MAGNA.....	50
IV.1 Conditions de culture de l'espèce	50
IV.2 Test de toxicité aigüe de <i>Daphnia magna</i>.....	52
IV. 3 Test de toxicité chronique de <i>Daphnia magna</i>.....	53
IV.4 Test de multigénérations	56
V. L'espèce <i>Danio rerio</i>	57
V.1 Condition de culture de l'espèce	57
V.2 Conditionnement des poissons zèbres adultes pour les tests de toxicité.....	58
V.3 Reproduction des géniteurs	58
V.4 Test de toxicité aigüe et chronique.....	59
VI. ANALYSE STATISTIQUE	63
Partie III.....	64
RESULTATS	64
I-ENQUÊTE SUR L'UTILISATION DES PESTICIDES ET DU GLYPHOSATE DANS LA RÉGION DE RABAT-SALÉ-KÉNITRA.....	65
II-EFFET DU GLYPHOSATE SUR LA GENERATION PARENTALE ET QUATRE GENERATIONS SUCCESSIVES de DAPHNIA MAGNA.....	76
1. Introduction	79
2. Materials and Methods	80

2.1.	Conditions for the Cultivation of <i>Daphnia magna</i> in the Laboratory.....	80
2.2.	Acute Toxicity Test of <i>Daphnia magna</i>	81
2.3.	Chronic Toxicity Test of <i>Daphnia magna</i>	81
2.4.	Statistics.....	82
3.	Results	82
3.1.	Lethal Effect of Glyphosate on <i>Daphnia magna</i>	82
3.2.	Effect of Glyphosate on <i>Daphnia</i> Reproduction.....	84
3.3.	Multi-generation Test.....	87
4.	Discussion.....	91
5.	Conclusion.....	93
6.	Acknowledgment	94
7.	Reference.....	94
	III-TOXICITE AIGUE ET CHRONIQUE DU GLYPHOSATE SUR <i>DANIO RERIO</i>	97
	IV-TOXICITE CHRONIQUE DU GLYPHOSATE CHEZ <i>DAPHNIA MAGNA</i> ET <i>DANIO RERIO</i> : ETUDE COMPARATIVE.....	110
	DISCUSSION	120
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	131
	RÉFÉRENCE	135
	ANNEXES.....	150
	Résumé	168
	Abstract.....	168

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'évolution de l'activité humaine a été accompagnée par une perturbation des différents écosystèmes, par un large spectre de substances polluantes, affectant la biodiversité hébergeant ces systèmes écologiques. Compte tenu de son état de réceptacle final, le milieu aquatique regroupe les écosystèmes les plus affectés, directement ou indirectement, par les effets toxiques de ces produits polluants (Fekhaoui *et al.*, 1994 ; El Morhit *et al.*, 2011 ; Montiel *et al.*, 2019 ; Robichaud et Rooney , 2021 ; Barathinivas *et al.*, 2022).

Les pesticides figurent parmi les substances polluantes attirant le plus l'intention de l'ensemble des acteurs (chercheurs, décideurs et législateurs) intervenant dans le domaine de l'évaluation du risque. Dans un but de prévention des problèmes de pollutions et la protection des différents écosystèmes par la définition des limites de concentrations concernant ces substances phytosanitaires. Avec la révolution verte, l'agriculture s'est intensifiée dans un but d'autosuffisance alimentaire, les pesticides ont donc été massivement utilisés pour garantir un fort rendement des récoltes. Ces produits phytosanitaires sont introduits par l'Homme dans l'environnement à travers l'industrie (chimique, pharmaceutique, agrochimie...).

Au Maroc, l'agriculture occupe une place importante sur le plan économique, social et environnemental. Le secteur agricole, à lui seul, représente 12,8 % du Pib national, entre 2008 et 2018. (Rhalem, 2020). Selon les statistiques de l'Office des Changes, l'utilisation des pesticides au Maroc a augmenté depuis 2005. Le pays importe chaque année 17 589 tonnes de produits phytosanitaires par le biais d'environ 70 sociétés phytosanitaires (El Ouilani, 2011).

Cependant, l'utilisation intensive des pesticides a laissé apparaître de conséquences environnementales graves inhérentes à leur mauvaise utilisation et à leur gestion irrationnelle. Il a été estimé que moins de 0,1 % des pesticides utilisés pour les différentes cultures atteignent leurs objectifs spécifiques, laissant de grandes quantités de déchets toxiques libres de se déplacer dans différents compartiments de l'environnement (Cattani *et al.*, 2014 ; Nguyen *et al.*, 2016).

Au cours de cette dernière décennie, les pesticides à base de glyphosate sont les produits chimiques agricoles les plus utilisés sur la terre (Baylis, 2000). Depuis l'introduction des

semences génétiquement modifiées en 1996, son utilisation mondiale a été multipliée par près de 15 fois pour s'établir à environ 826.000 tonnes (Benbrook, 2016). Le glyphosate est commercialisé sous la marque Roundup par la firme américaine Monsanto depuis 1974. Il est composé d'un acide organique faible, dérivé de la glycine, non sélectif à action systémique (Tomlin, 2009) et avec un Coefficient de partage Octanoleau ($\log K_{ow}$) de -3,2 (à 25°C et pH = 5-9) (E. C., 2002). En raison de sa nature non sélective, il est utilisé dans différentes cultures comme des cultures de maïs, de coton de soya, des céréales, des légumineuses ainsi que dans les pâturages, la foresterie, le contrôle de la végétation sur les terrains industriels et pour l'entretien domestique (EPA, 1993 ; Cox, 2004 ; Tomlin, 2009 ; Soltani *et al.*, 2013 ; Jaskulski et Jaskulska, 2014 ; Benbroug, 2016).

L'utilisation illimitée et incontrôlée de cet herbicide peut avoir de graves conséquences sur la santé humaine et l'équilibre écologique. Ce pesticide a fait objet d'une grande problématique internationale concernant le risque cancérigène de son principe actif sur la santé humaine. En Janvier 2015, le tribunal administratif de Lyon a annulé l'autorisation de la commercialisation du Roundup Pro 360 qui contient du glyphosate (OMS, 2015). Plusieurs études intervenant dans le domaine de l'évaluation du risque, ont montrés l'effet toxique de cet herbicide. Cependant, des effets indésirables du glyphosate ont été observés chez des organismes vivants à différents niveaux de la chaine trophique (les bactéries, les algues, les crustacés, les amphibiens et les poissons) (Folmar *et al.*, 1979; Cuhra *et al.*, 2013; Sihtmäe *et al.*, 2013 ; Annett *et al.*, 2014 ; Reno *et al.*, 2018). Cet pesticide peut inhiber des enzymes spécifiques chez les invertébrés tels que le phosphoénolpyruvate (Tu *et al.*, 2001), le phosphatase (Ørsted et Roslev, 2015) et peut également altérer l'expression de gènes sensibles au stress (Le *et al.*, 2010). Son exposition peut causer un stress oxydatif, une inhibition de l'acétylcholinestérase et augmente la sensibilité aux infections parasitaires (Annett *et al.*, 2014). Des études récentes ont traités les effets neurotoxiques du glyphosate sur le poisson zèbre (Faria *et al.*, 2021). Les résultats de cette étude ont révélé que les poissons zèbres exposés à ce pesticide, présentaient une déficience significative des comportements exploratoires et sociaux correspondant à une anxiété accrue.

Par ailleurs, la présence de cette substance dans les milieux aquatiques est possible (Robichaud et Rooney, 2021) sous influence de précipitations (Vereecken, 2005; Borggaard et Gimsing, 2008) de pulvérisation accidentelle et de ruissellement des terres agricoles (Struger *et al.*, 2015 ; Montiel *et al.*, 2019) . Plusieurs études ont montré que le glyphosate a

été détecté dans des eaux naturelles soit de surfaces ou souterraines de plusieurs pays (Trudeau *et al.*, 2011 ; Horth, 2012 ; Battaglin *et al.*, 2014, Majewski *et al.*, 2014 ; Giroux, 2015).

Au Maroc, la procédure d'homologation et la commercialisation des pesticides à usage agricole est régie par des textes législatifs et réglementaires stricte (Annexe 1). Cette législation vise à évaluer les données physico-chimiques, analytiques, toxicologiques et écotoxicologiques avant la mise du pesticide sur le marché marocain. Malgré cette réglementation, les produits à base de ce pesticide à usage agricole, à l'exception de celui associant le glyphosate avec le Co-formulant la POE-Tallowamine (ONSSA, 2018), sont toujours utilisés au Maroc sous le contrôle de l'ONSSA.

L'évaluation des effets des substances toxiques sur les organismes aquatiques inclue des essais à court et à long terme. Les études qui se sont penchées sur l'évaluation de l'écotoxicité chronique du glyphosate sont très rares à cause de sa demi-vie dans l'eau qui varie de quelques jours à 91 jours (Tomlin, 2009). La problématique est liée à deux difficultés : la première concerne la diversité moléculaire du glyphosate (présence sous différentes formes ioniques en fonction des conditions de pH). La détection du pesticide n'est donc pas simple s'agissant de molécules parfois différentes notamment en termes de masse, ou de charge formelle. La seconde est dans la décomposition du glyphosate dans l'environnement (en présence de certains micro-organismes) pour générer l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) (Valle *et al.*, 2019). Cependant, il existe un potentiel de contamination des eaux de surface et souterraines par les utilisations aquatiques du glyphosate et l'érosion du sol (EPA, 1993). D'autres auteurs ont montrés que la présence de cations chélateurs dans l'environnement, la demi-vie de l'herbicide augmentée dans les sédiments (Tsui *et al.*, 2008).

En prenant en compte les différents niveaux trophiques, plusieurs espèces sont utilisées dans l'évaluation de la toxicité d'une substance chimique. Cependant, les invertébrés semblent être le taxon le plus sensible parmi les organismes aquatiques (Parrish *et al.*, 1976). Le genre des *Daphnidae* et spécialement l'espèce *Daphnia magna* (espèce clé dans les écosystèmes aquatiques) a été utilisé depuis de longues années dans les tests de toxicité normalisés. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté des effets néfastes des différents polluants existant dans l'environnement comme les pesticides, les métaux lourds et les médicaments sur la reproduction chez *Daphnia magna* (Flaherty et Dodson, 2005 ; Schamphelaere *et al.*, 2007).

Cet organisme est utilisée par des instances internationales pour l'évaluation du potentiel toxique des différents polluants de l'environnement (OCDE, 1998 ; US EPA, 2002).

En plus, beaucoup d'auteurs se sont intéressés à l'étude de l'effet du glyphosate sur le poisson zèbre dans un souci de protection de la santé humaine (Bernut, 2014 ; Vincent, 2015). Les résultats obtenus des études démontrent que l'utilisation de *Danio rerio* comme modèle biologique offre de nombreux avantages motivant et validant son utilisation pour une meilleure compréhension des effets toxiques. Leur développement embryonnaire est parfaitement connu et son équivalence génétique est de 70% avec les êtres humains (Howe *et al.*, 2013 ; Rob *et al.* , 2016). Le poisson *Danio rerio* constitue l'un des modèles de recherche, les plus importants dans le domaine de la biologie du développement des vertébrés et fait partie des espèces recommandées dans les Lignes directrices 203, 204 et 210 de l'OCDE.

Le but de ce travail est d'identifier les différentes formes du glyphosate utilisés dans la région Rabat-Salé-Kénitra et d'étudier l'effet à court et long terme du glyphosate sur deux espèces clés d'eau douce *Daphnia magna* et *Danio rerio*.

Pour répondre à ces objectifs, notre travail de recherche s'est articulé autour de trois parties principales :

- Partie 1 : Une étude bibliographique sur la région Rabat-Salé et Kénitra, les aspects généraux de l'espèce étudiée et l'évaluation de la toxicité aquatique du glyphosate.
- Partie 2 : Les matériels et méthodes utilisés pour la mise en œuvre de cette étude.
- Partie 3 : Les résultats et discussions regroupés dans 4 chapitres : le premier est consacré à l'utilisation du glyphosate dans la région Rabat-Salé-Kénitra, le deuxième concerne la détermination de la toxicité du glyphosate sur les daphnies, le troisième concerne l'étude des effets de l'herbicide sur les poissons zèbres et le quatrième est consacrée à la comparaison de la sensibilité des deux organismes tests envers le glyphosate.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : PRESENTATION DE LA REGION RABAT-SALE-KENITRA (Monographie générale Région Rabat-Salé-Kénitra, 2015)

En 2015, la région de Rabat-Salé- Kénitra a été née par le nouveau découpage territorial des régions marocaines. Elle est créée de la fusion des deux anciennes régions Rabat-Salé-Zemmour-Zaer et Gharb-Chrarda-Beni-Hssen. Cette région s'étend sur une superficie de 18.194 km², soit 2,5% de la superficie totale du Royaume et compte 4.581 milliers d'habitants, représentant ainsi 13,5% de la population du Maroc. Soit la deuxième contribution à l'échelle nationale, elle participe pour 15,2% à la richesse nationale, après la région de Casablanca-Settat.

Cette région est limitée au Nord par la région de Tanger-Tétouan-Al Hoceima, au Sud par la région de Beni Mellal-Khénifra et la Région de Casablanca-Settat, à l'Est par la Région de Fès-Meknès et à l'Ouest par l'Océan Atlantique. La région se compose de trois préfectures (Rabat, Salé et Skhirate-Témara) et quatre provinces (Kénitra, Khémisset, Sidi Kacem et Sidi Slimane). Le nombre de communes de la région est de 114 (23 urbaines et 91 rurales), soit à peu près 7,6 % de l'ensemble des communes nationales.



Figure 1: Région Rabat –Salé-Kenitra

Sous les influences océaniques et continentales, le climat de la région est de type méditerranéen semi-aride. En hiver, le climat est doux et pluvieux. En été, il est humide et tempéré avec la présence des journées de Chergui. Les inégalités du relief font que le climat de la région Rabat-Salé-Kénitra subit d'importantes variations locales reconnues par une variabilité apparente (La $T^{\circ}_{\min}$ est de 4°C et la $T^{\circ}_{\max}$ est de 40°C). En été, l'atmosphère se réchauffe sensiblement, les températures maxima varient entre 16°C et 26°C en mois Juillet avec des pics de 38°C à 40°C mais à fréquence exceptionnelle. La pluviométrie de la région varie entre 900 mm et 300 mm avec une diminution de 57% entre 2008-2009 et 2011-2012.

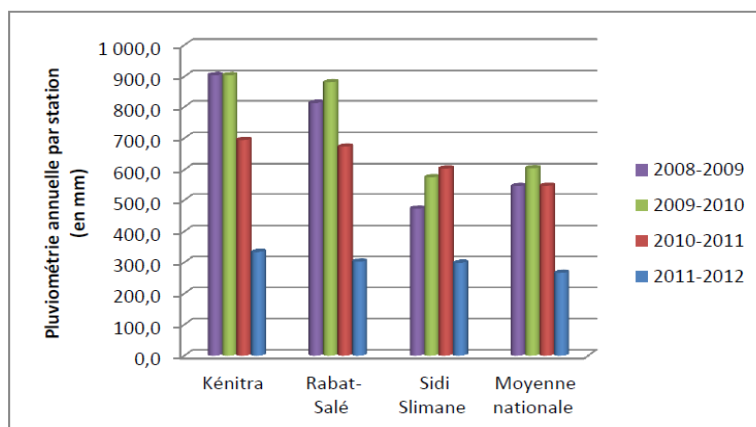


Figure 2: Pluviométrie annuelle par station, en millimètres

I.1 Ressources hydrographiques

I.1.1 Eau de surface

La région de Rabat-Salé-Kénitra s'étend sur deux principaux bassins versants : bassin hydraulique du Bouregreg et de la Chaouia et bassin hydraulique du Sebou. Ces grands bassins sont formés par plusieurs sous-bassins versants (Sous Bassin versant du Loukkos, Sous Bassin versant du Beht) avec des apports pluvionivale.

- **Bassin versant du Bouregreg** : une superficie de 10 210 km² subdivisé en deux parties :
 - Nord-Est correspond au bassin du Bouregreg (3830 km²) ;
 - Sud-Ouest correspondant au bassin de son principal affluent rive gauche, l'oued Grou, disposant lui-même de deux affluents : les oueds Korifla et Akreuch (5760 km²).
- **Bassin versant du Sebou** : l'un des bassins le plus riche en eau où on trouve les régions les mieux loties en terres irriguées et en industries avec un potentiel cultivé qui s'élève à 1.750.000 ha. L'estimation des superficies irrigables est de 375.000 ha, dont 269.600 sont actuellement irrigués.
- **Sous Bassin versant du Loukkos**: une superficie de 3 730 km² recouvrant les bassins hydrologiques des oueds Loukkos, Ouarour et Makhazine.
- **Sous Bassin versant du Beht** : une superficie de 4400 km² situant au sud-ouest du bassin du Sebou. Il reçoit son apport en eau des oueds Kharrouba, Bouaachouch, El Kell, Ouchkat, Berrajline, Duor et Chbilia qui ne coulent que pendant les périodes pluvieuses.

Le réseau hydrographique de cette région est constitué d'importants cours d'eau tels que les oueds Bouregreg, Sebou, Beht, Ouergha et Rdat. Ce réseau est composé aussi d'une centaine de petits affluents et chaâbas. Le territoire de la région renferme plusieurs barrages jouant un rôle principal dans la satisfaction des besoins en eau potable, industrielle et agricole. Le barrage Sidi Mohammed Ben Abdellah avec un potentiel en eau de surface d'environ 687 mm³/an et le barrage El Kansera avec un apport annuel de 363 mm³.

I.1.2 Eau souterraine

La région dispose des réserves hydriques en eaux souterraines importantes avec comme principales nappes :

- **La nappe du Gharb** : une superficie de 390 km², avec 126 mm³/an de ressources renouvelables et un bilan hydrique relativement équilibré. À l'échelle régionale, elle présente un intérêt hydrogéologique alimenté par une recharge importante des eaux de précipitations, d'infiltration et des bordures du bassin de Gharb.
- **La nappe de Maâmora** : une superficie de 4000 Km² avec 134 mm³/an de ressources renouvelables. Elle constitue un grand réservoir d'eau correspondant à une nappe libre alimentée uniquement par l'infiltration des précipitations en subsurface.
- **La nappe de Témara** : une superficie de 350 km² avec un apport potentiel de 17 mm³/an.
- **La nappe de Shoul** : une superficie de 200 km² considérée comme une extension naturelle de la nappe de Maâmora. Son apport potentiel est de 7,5 mm³/an.
- **La nappe de Tanoubart** : Située dans la région de Mâaziz, province de Khémisset. Elle couvre une superficie de 15 km² principalement alimentée par l'oued Tanoubert et l'affluent de l'oued Bouregreg.

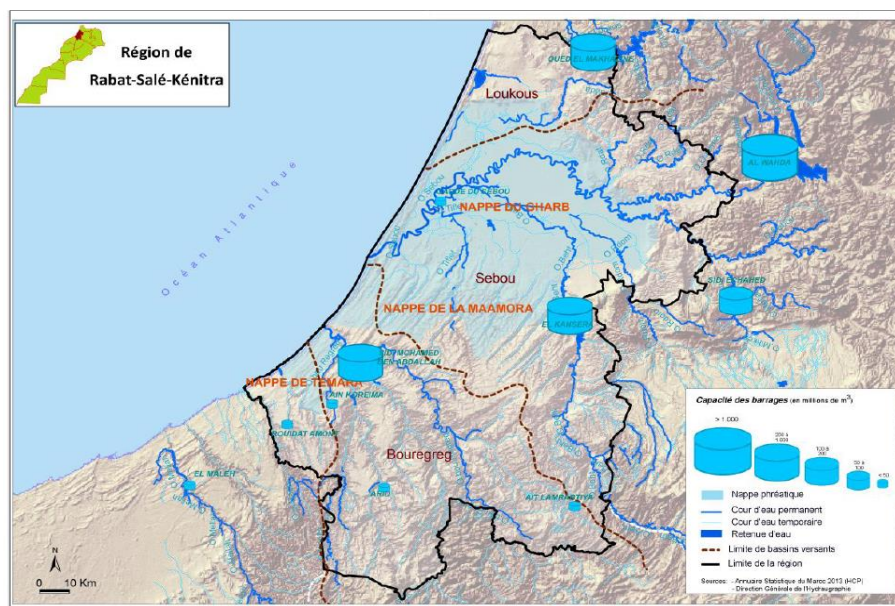


Figure 3: Ressources en eau de la région d'étude

I.2 Forêt

La région dispose d'une richesse forestière importante s'étendant sur une superficie de 351.290 hectares représentant 4% du total national. La plus importante forêt de la région est la Maâmora qui représente 70% de cette superficie forestière totale. La Région contient deux sites d'intérêt biologique et écologique, la Merja Zerga et le lac de Sidi Boughaba. Depuis 1980, ces deux zones humides sont inscrites sur la liste de la Convention de Ramsar suite à leur biodiversité élevée.

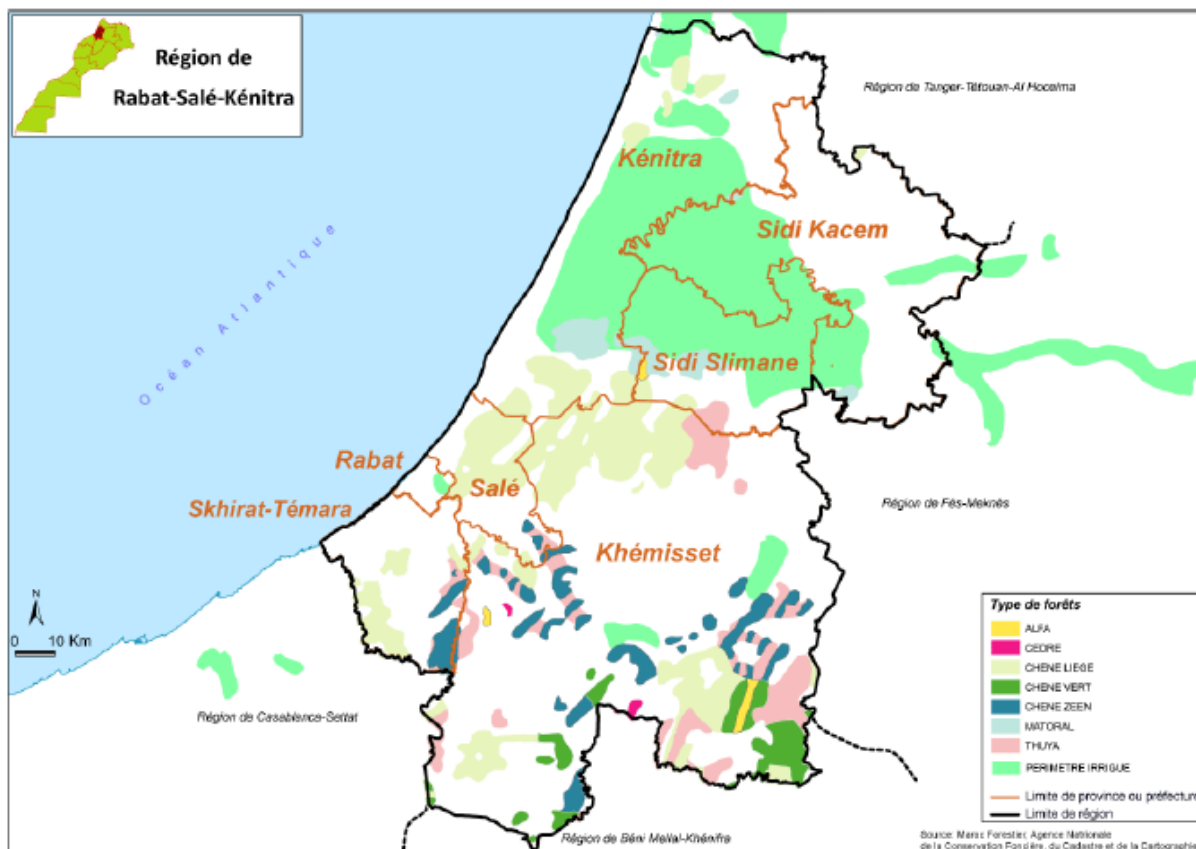


Figure 4: Couvert forestier de la région d'étude

I.3 Activité agricole

L'activité agricole constitue le principal moteur de l'économie de la région de Rabat-Salé-Kénitra. La région détient 12% de la surface agricole utile du pays avec 1.019.369 ha. Grâce à l'étendue de ses terres cultivables et à son climat relativement favorable, cette région est parmi les plus importantes régions agricoles "bour" (agriculture pluviale) du Royaume. La contribution de la région à la production céréalière représente environ 15% de la production nationale dépassant les 15 millions de quintaux.

Les terrains utilisés pour l'activité agricole sont répartis entre Rabat-Salé-Témara 68.800 ha, Khémisset 372 700 ha et Sidi Kacem (29%) et Kénitra (28%).

Cette région contribue à la production céréalière nationale avec 15 500,3²² milliers de quintaux soit 15,7% lors de la campagne 2012-2013 et couvrant une superficie de 598,2 milliers de hectares.

Parallèlement à l'agriculture, plusieurs paysans pratiquent l'élevage intensif des ovins, des bovins, des caprins et des équidés, de la basse-cour et de l'apiculture. Cet élevage est intense dans la partie bour et dans les zones irriguées. En 2013, l'effectif d'élevage compte de 2.243 milliers têtes et représente ainsi 8% de l'effectif total du pays.

La région de Rabat-Salé-Kénitra appartient à la zone maritime de l'Atlantique nord qui utilise tous les types de pêche : engins actifs (sennes tournantes, chaluts) et engins passifs (madragues, palangres, trémail, filets maillants, etc.). La région contient des zones de frai et de nurseries des poissons et des sites à intérêt bioécologique (SIBE), le plus important est la lagune de Moulay Bouselham.

CHAPITRE II : EVALUATION DE LA TOXICITE DES PRODUITS CHIMIQUES POUR LE MILIEU AQUATIQUE

II.1 Définition de l'écotoxicologie

Devant le potentiel dangereux des polluants chimiques sur l'environnement, une nouvelle discipline intégrant l'écologie et la toxicologie s'est apparue: l'écotoxicologie. Ramade (1977) définit l'écotoxicologie comme étant l'étude :

- des effets toxiques des agents polluants naturels ou artificiels produits par l'activité humaine sur les organismes et les communautés ;
- des mécanismes de transfert de ces agents, effets sur les êtres vivants qui peuplent la biosphère et leurs interactions avec l'environnement.

L'écotoxicologie est une science appliquée des notions de plusieurs disciplines de recherches toutes interdépendantes les unes des autres (chimie, génétique, biologie, ...) pouvant intervenir à différents niveaux d'organisation biologique (molécule, cellule, tissu, organisme, population, ...)

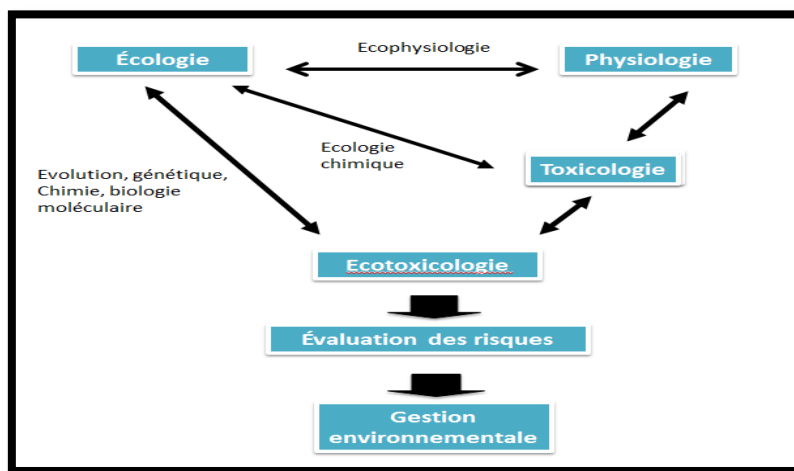


Figure 5: Position de l'écotoxicologie (Serghini, 2012)

II.2 Outils d'évaluation écotoxicologiques

Selon leurs niveaux d'altérations (moléculaire, individuelle, populationnelle), trois outils d'évaluation des effets toxiques peuvent être différenciés :

- Les biomarqueurs et les bioessais pour les niveaux d'altérations des performances individuelles et populationnelles ;

- Les bioindicateurs pour les performances au niveau des communautés.

Le bioindicateur : Blandin (1986), a dénommé un indicateur biologique ou bioindicateur « *comme un organisme ou un ensemble d'organismes qui par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications naturelles ou provoquées* ».

Le biomarqueur : Lagadic *et al.* (1997) : « *un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* ».

Pour évaluer la toxicité d'un polluant deux approches complémentaires sont utilisées. La première est chimique, consiste à doser des concentrations des toxiques dans les différentes composantes de la biosphère. Cette méthode détecte seulement la concentration de la substance sans renseigner sur sa toxicité. La deuxième est biologique, elle vise l'étude des effets des polluants sur les organismes ou les populations. Parmi les techniques adoptées dans la méthode biologique, les bioessais sont largement utilisés. Ces essais traduisent la biodisponibilité de différentes substances polluantes présentes dans les milieux étudiés. Ils étudient les interactions de tous les contaminants non détectés ou non recherchés par les analyses chimiques (Vasseur *et al.*, 1991). Les bioessais sont exigés pour la mise sur le marché de nouvelles substances et recommandés pour la surveillance des milieux aquatiques par différentes instances internationales (European commission, EPA, Environnement Canada).

II.3 Définition des bios essais

Le bioessai est un test expérimental utilisé pour identifier la toxicité d'une substance ou d'un mélange de substances par la réponse biologique de l'organisme test, et déterminer les concentrations avec effets (CE_x , LOEC...) ou sans effet (NOEC) (OCDE, 2003). Les paramètres mesurés ou observés correspondent à des paramètres biochimique ou physiologique facilement quantifiable (survie, reproduction, temps d'éclosion,...). On distingue les essais aigus réalisés sur des temps d'exposition courts (quelques heures à quelques jours) et les essais chroniques qui nécessitent un temps d'exposition plus prolongé pouvant durer tout le cycle de vie de l'espèce.

Il existe différents types de tests permettant d'évaluer la toxicité aiguë ou chronique des polluants vis à vis des différents compartiments des écosystèmes. Parmi les tests les plus utilisés en écotoxicologie dans l'étude de la toxicité à court terme, existe le test d'inhibition de la mobilité des daphnies et le test de la détermination de la toxicité aiguë des œufs de poisson-zèbre.

Le test de l'invertébré *Daphnia magna* est réalisé selon la norme marocaine ISO 6341 pour déterminer la toxicité aiguë vis-à-vis de *Daphnia magna* des substances chimiques solubles ou pouvant être maintenues en suspension ou en dispersion stable dans les conditions d'essai, des effluents industriels et domestiques, des eaux usées épurées ou non et des eaux de surface ou souterraines naturelles (ISO 6341, 2014). Le test du vertébré *Danio rerio* est appliqué selon la norme marocaine ISO 15088 pour déterminer la toxicité aiguë vis-à-vis *Danio rerio* des d'eaux résiduelles ou des substances individuelles (ISO 15088, 2014).

Pour l'évaluation de la toxicité chronique, les tests sur la croissance algale et le test de reproduction chez *Daphnia magna* restent les plus utilisés (Berrebaan, 2019). Le test algue détermine la toxicité chronique par le suivi de la croissance algale sur plusieurs générations applicable aux effluents aqueux industriels et urbains, aux lixiviats ou extraits aqueux ainsi qu'aux eaux douces de surface ou souterraines (ISO 8692, 1996). Le test de reproduction 21 jours sur *Daphnia magna* réalisé selon la norme marocaine ISO 10706 pour déterminer la toxicité chronique des substances chimiques solubles ou maintenues en suspension ou en dispersion stable dans les conditions de l'essai, des effluents industriels ou urbains traités ou non et les eaux de surface ou eaux souterraines. De même, le test chronique de l'espèce *Danio rerio* est appliqué selon les recommandations de la ligne directrice OCDE 210. Il vise à déterminer les effets létaux et sublétaux chroniques d'un produit chimique sur différents espèces de poisson. En générale, ces essais s'appuient sur des espèces représentatives des différents niveaux trophiques (Décomposeurs, producteurs, consommateurs primaires et secondaires).

CHAPITRE III : METHODE D'EVALUATION DU RISQUE DES SUBSTANCES CHIMIQUES

L'évaluation du risque d'un produit polluant, fait intervenir deux paramètres : la toxicité de la substance (concentrations et effets) et l'exposition des milieux naturels à cette substance.

Les directives européennes 93/67/EC, 793/93/EC et 1488/94/EC ont développé une méthode pour prévenir des risques des substances chimiques. Cette démarche est basée sur la comparaison entre la concentration PNEC (Predicted No Effect Concentration) et la concentration PEC (Predicted Environmental Concentration) (EC, 2003).

- **une PNEC (Predicted No Effect Concentration)** : dérivée à partir des CE_{50} et NOEC disponibles, c'est la plus forte concentration de la substance sans risque à long terme pour l'environnement. Elle est déterminée par l'application d'un facteur de sécurité (10-1000) sur les plus faibles valeurs de toxicité disponibles. Elle dépend du type de test (aigu, chronique, in situ) et du nombre de données disponibles.

Tableau 1 : Facteurs d'exploitation pour l'estimation d'une PNEC eau dans l'eau douce (EC, 2003).

Données Disponibles	Facteur d'extrapolation
Au moins un résultat de toxicité aiguë CL_{50} pour chacun des trois niveaux trophiques (poissons, daphnies et algues)	1000
Trois données de toxicité aiguë+ un résultat de toxicité à long terme (NOEC) (poissons ou daphnies)	100
Trois données de toxicité aiguë+ deux NOEC à long terme représentant deux niveaux trophiques (poissons et/ou daphnies et/ou algues)	50
Trois données de toxicité aiguë+ trois NOEC à long terme représentant trois niveaux trophiques (poissons et daphnies et algues)	10

- **une PEC (Prédicted Environmental Concentration)** : c'est la concentration possible de la substance dans l'environnement. Elle est déterminée à partir du comportement de la substance dans l'environnement, de son tonnage, son poids moléculaire, son utilisation, sa solubilité et sa volatilité pour les substances nouvelles ou à partir des concentrations mesurées dans le milieu pour les substances existantes.

La comparaison entre les valeurs des deux concentrations PEC et de PNEC permet de tirer une conclusion sur le risque qui représente une substance pour l'environnement.

- Si le rapport PNEC/PEC est supérieur à 1 : risque acceptable sur l'environnement.
- Si le rapport est inférieur à 1 : risque potentiel sur l'environnement et une réduction de l'exposition est nécessaire.

CHAPITRE IV : ASPECTS GENERAUX DES DEUX ESPECES ETUDIEES

IV.1 *Daphnia magna*

IV.1.1 Classification

La systématique de *Daphnia magna* est :

Tableau 2: Classification de *Daphnia magna*

Règne	<i>Animal</i>
Embranchement	<i>Arthropodes</i>
Classe	<i>Crustacés</i>
Sous Classe	<i>Brachiopodes</i>
Ordre	<i>Cladocère</i>
Famille	<i>Daphnidae</i>
Genre	<i>Daphnia</i>
Espèce	<i>Daphnia magna</i>

IV.1.2 Anatomie (Dieter, 2005)

Les daphnies sont des petites espèces de la classe des crustacés mesurant de un à cinq millimètres. Elles colonisent les eaux douces et stagnantes. Son corps est composé d'une tête et d'un tronc :

- La tête : comporte un bouclier céphalique pourvu de cinq paires d'appendices. La première paire (antennules) est munie d'organes sensoriels, elle définit le dimorphisme sexuel. La seconde paire (antennes) est munie de soies natatoires, elle permet la locomotion. Les dernières paires d'appendices de l'espèce abritent la glande maxillaire et les organes excréteurs de la puce d'eau. Elle possède deux yeux : un œil larvaire et un autre œil plus grand composé, impair, résultant de la fusion de deux yeux latéraux.
- Le tronc : est composé de quelques segments thoraciques avec 4 à 6 paires de pattes et d'un abdomen entouré d'une carapace et terminé par une épine apicale. Les pattes sont foliacées, elles sont munies d'appareils branchiaux et de systèmes de filtration. Par filtration, le crustacé isole les algues et les amène à sa bouche. Sur le dos, la carapace est formée par une poche incubatrice à l'intérieure de laquelle reposent les œufs et les petits avant la naissance.

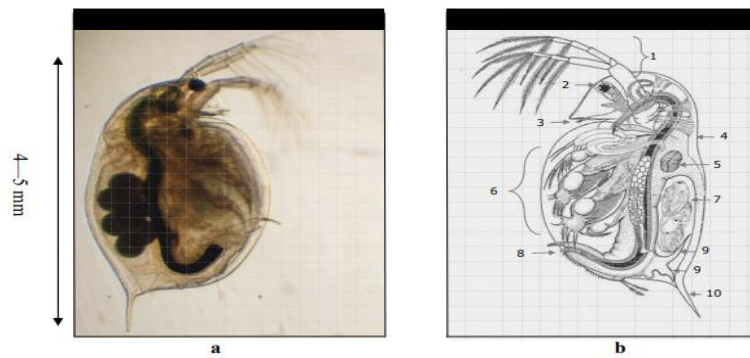


Figure 6: a. Photo de *Daphnia magna*, femelle adulte. b. Anatomie de *Daphnia* : Antennes (1) ; Œil (2) ; Antennules (3) ; Carapace (4) ; Cœur (5) ; Appendices Thoraciques (6) ; Poche incubatrice (7) ; Anus (8) ; Appendices caudaux (9) ; Epine apicale (10) (Dieter, 2005)

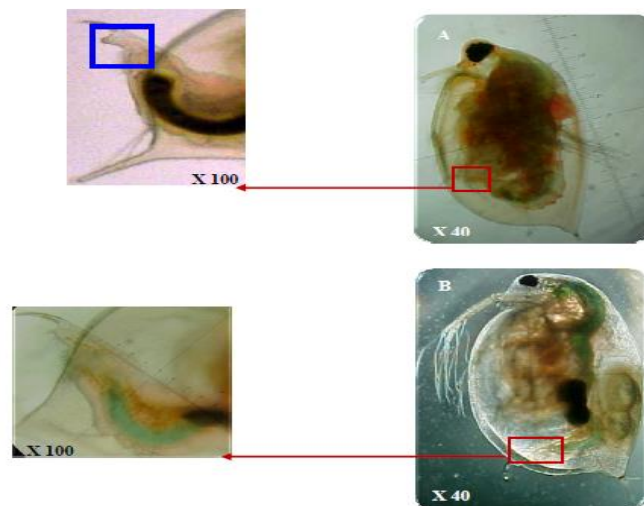


Figure 7: Dimorphisme sexuel chez *Daphnia magna*, A (mâle), B (femelle). Le rectangle bleu permet d'illustrer les différences au niveau du post-abdomen (Ebert, 2005)

IV.1.3 Reproduction

D'après Dieter (2005), *Daphnia magna* connaît deux modes de reproduction (sexuée et asexuée) :

- **Reproduction asexuée :** Ce mode prévaut quand les conditions de vie sont à l'optimum. Les daphnies femelles, sans fécondation, produisent par parthénogenèse, trois à cinquante œufs par semaine, qui vont éclore dans une « poche incubatrice »

située dans la partie dorsale de la carapace de l'espèce. Ces œufs donnent naissance à des jeunes identiques à l'adulte et qui seront directement libérés dans l'eau. Ce type de générations parthénogénétiques, sans apparition de mâles, se succède tant que les conditions du milieu restent favorables et ne donnent naissance qu'à des femelles.

- **Reproduction sexuée :** Quand les conditions de vie deviennent défavorables (manque de proies, froid, stress, forte densité de population, anoxie, ...), des mâles apparaissent. Ces derniers sont plus petits et reconnaissables à l'absence de poche incubatrice. Leur proportion est toujours très faible (<5 %) par rapport aux femelles. Il y a accouplement et les femelles fécondées portent cette fois dans la poche incubatrice un ou deux œufs noirs, nettement visibles dits « de résistance », « de survie », ou « éphippie » ou « ephippium ». Produits en petite quantité (contraire des œufs de la reproduction parthénogénétique), les éphippies résistent à une certaine pression d'écrasement, et de friction, au gel (pour certaines espèces uniquement), ainsi qu'à la dessiccation. Protégés par leur membrane, les œufs (éphippies) éclosent (éventuellement après réhydratation) si l'eau est suffisamment oxygénée et à une température suffisante. Transportés par les oiseaux, sous les pattes d'animaux ou via les inondations, ces œufs de survie sont des propagules de colonisation ou de recolonisation de mares et humides. En effet, chaque œuf donnera naissance à une femelle qui engendra une nouvelle descendance, uniquement composée de femelles tant que les conditions du milieu seront favorables pour l'espèce.

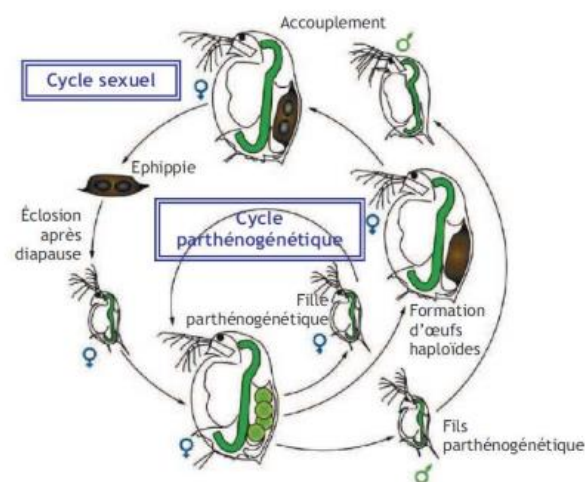


Figure 8: Cycle de reproduction chez *Daphnia magna* (Dieter, 2005)



Figure 9: Daphnie portant les épipies

IV.1.4 Cycle de vie et développement embryonnaire

Les étapes du développement d'un embryon chez les daphnies se déroulent en 6 stades distincts (Kast-Hutcheson *et al.*, 2001) :

- **Stade 1 ou de division dure :** L'embryon est parfaitement sphérique, pas de différenciation cellulaire, ce stade se déroule entre 0 et 15 heures.
- **Stade 2 ou de gastrulation:** L'embryon devient asymétrique avec présence d'un blastopore en raison du début de la différenciation cellulaire, ce stade se déroule entre 15 et 25 heures.
- **Stade 3 ou de maturation embryonnaire précoce :** Il présente une différenciation au niveau de la tête et l'antenne secondaire sont différenciés, ce stade se déroule entre 25 et 35 heures.
- **Stade 4 ou de maturation embryonnaire moyenne :** La mise en place de l'œil pigmentée et développement des antennes qui restent collés à la seconde membrane embryonnaire, ce stade se déroule entre 35 et 45 heures.
- **Stade 5 ou de maturation embryonnaire tardive :** Présence d'une rupture de la seconde membrane embryonnaire, extension partielle de l'antenne secondaire et l'épine caudale reste encore pliée sous la carapace, ce stade se déroule entre 45 et 50 heures.
- **Stade 6 ou le développement complet :** Développement complet des antennes et le décollage de l'épine de la carapace pour que le nouveau-né commence à nager.

En général, le taux de survie augmente avec la diminution de la température à cause de la diminution de l'activité métabolique (Manar, 2008). En effet, la durée de vie moyenne de *Daphnia magna* est généralement de 40 jours à 25°C et de 56 jours à 20°C .Elle est divisée en 3 phases : la première est la période embryonnaire qui est généralement brève (3 jours). Elle est suivie par la période juvénile caractérisée par une croissance maximale des jeunes daphnies lorsque les conditions sont favorables, elle varie entre 7 et 10 jours et finalement la période adulte ou la daphnie va effectuer plusieurs pontes tous les 3 jours.

A quelques minutes de la fin de chaque phase, quatre événements se succèdent : (1) la ponte des petits, (2) la mue, (3) l'augmentation de la taille et (4) l'apparition de nouveaux œufs dans la chambre incubatrice (Manar .2008).

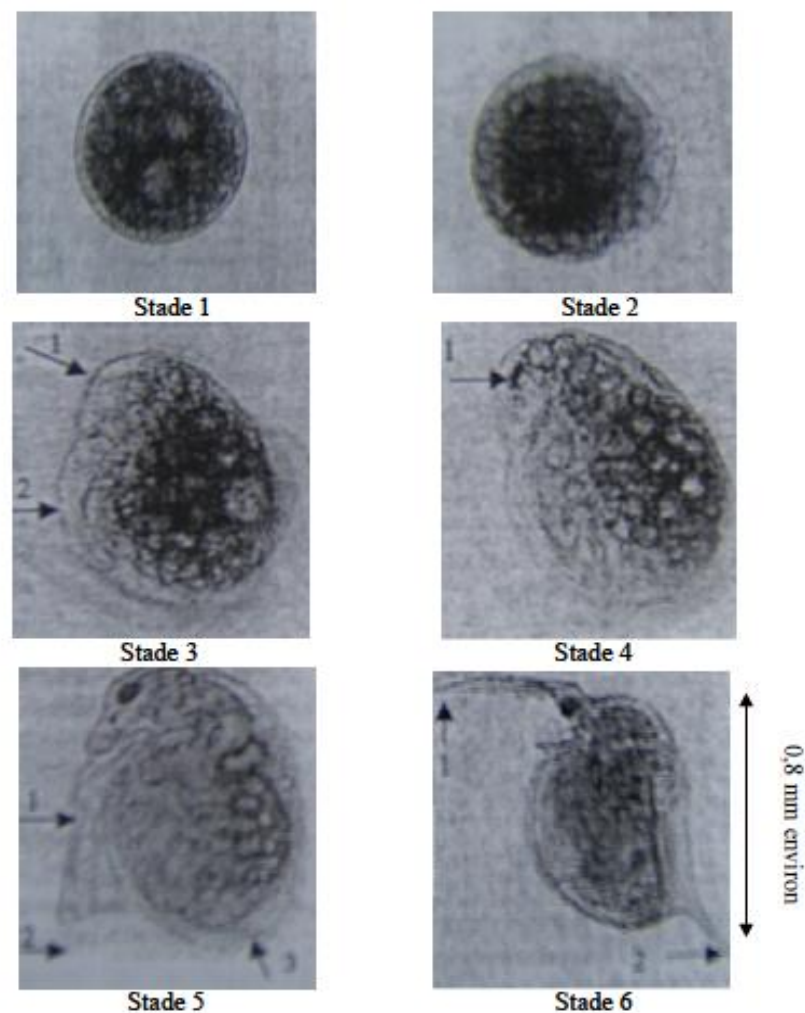


Figure 10: Photos des différentes stades de développement embryonnaire chez *Daphnia magna* (Kast-Hutcheson *et al.*, 2001)

IV.1.5 Alimentation

Les daphnies vivent dans les étangs, les lacs et les rivières. Elles ont une préférence pour les eaux lentes pourvues en végétation riveraine. *Daphnia magna* se nourrit en filtrant l'eau et retient ainsi les particules nutritives en suspension. Ces puces d'eaux douces s'alimentent principalement d'algues microscopiques, de protozoaires, de bactéries et des débris animaux et végétaux en décomposition. Les daphnies utilisent leurs appendices thoraciques pour capter les particules de la nourriture en suspension dans l'eau (Centre d'expertise en analyse environnementale, 2000).

La qualité et la quantité de la nourriture affectent la sensibilité de *Daphnia* aux polluants et son taux de reproduction (Manar, 2008) et semble aussi influencer la sensibilité des daphnies aux toxiques (Winner *et al.*, 1977 ; Enserink *et al.*, 1995). En effet, la présence d'algues dans la nourriture des daphnies augmente nettement leur production. Il a été aussi constaté que la reproduction des daphnies est plus meilleure quand elles sont alimentées avec des algues vivantes plutôt qu'avec des algues séchées sous forme de poudre.

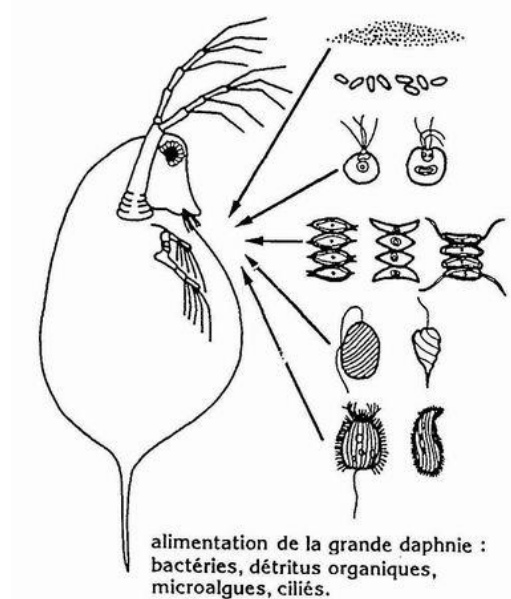


Figure 11: Schéma représentant l'alimentation de *Daphnia magna* (Arumugam et Geddes, 1988).

IV. 1.6 Comportement

Les migrations individuelles des daphnies sont dues principalement à trois facteurs :

- la teneur en gaz carbonique,
- la recherche de particules alimentaires,
- la lumière.

Dans un élevage, la teneur en gaz carbonique due à la fonction respiratoire des daphnies est proportionnelle à la densité des individus. Les daphnies ont tendance à se diriger vers les zones plus riches en oxygène si la masse d'eau le permet. En revanche, si la masse d'eau est limitée et influencée dans son volume total par une concentration élevée en CO₂, il y aura régression des pontes, suivie de l'apparition des œufs de durée.

La répartition des daphnies est très hétérogène. Les organismes ont tendance à se grouper et à former des «essaims» qui se déplacent verticalement et horizontalement tout au long de la journée. Pendant l'hiver, en l'absence d'un phytoplancton abondant, les daphnies se répartissent sur le fond pour se nourrir à partir de la couche biologique qui se développe à la surface du sédiment. Cette tendance à aller vers le fond pour se nourrir de débris de micro-organismes a aussi été notée en été lorsque les apports en micro algues sont insuffisants.

IV.1.7 Importance écotoxicologique

Les daphnies sont une source de nourriture (particulièrement riches en protéines) pour de nombreuses espèces aquatiques et semi-aquatiques et jouent ainsi un rôle majeur ou clé au sein des écosystèmes dulçaquicoles (Sperfeld et Wacker, 2009). La première publication de l'utilisation de l'espèce *Daphnia magna* comme modèle biologique dans les biotests d'écotoxicité aquatique date du début du 20^{ème} siècle (Buijtendijk, 1918). En 1948, Anderson *et al.* ont étudié l'écotoxicité de diverses substances présentes dans les effluents industriels sur *D. magna* avant même que cet organisme fasse objet de normalisation ou de lignes directrices. Les daphnies sont très utilisées dans les bio essais de toxicité aquatique et représentent l'un des trois modèles biologiques les plus utilisés, avec les algues et les poissons, dans le cadre de l'évaluation des risques écotoxiques des substances chimiques (Pereira *et al.*, 2010).

Cependant, *Daphnia magna* est utilisée pour l'évaluation :

- De l'impact potentiel des produits chimiques sur l'environnement aquatique (Soares *et al.*, 1991).
- De l'écotoxicité potentielle d'effluents au laboratoire (Antunes *et al.*, 2007).
- De lixiviats, de divers déchets (Ferard et Ferrari, 2005) et d'eaux de pluies (Sakai, 2005).
- Des pesticides tels que le chlordane (Manar, 2008), le glyphosate (Hansen et Roslev, 2016) et malathion (Montassir *et al.*, 2019)
- Des métaux lourds et des nanoparticules (Muyssen *et al.*, 2006 ; Evens *et al.*, 2011, Ribeiro *et al.*, 2014; Puerari *et al.*, 2016).
- Des médicaments anticancéreux tels que le Cyclophosphamide l'Ifosfamide , le 5-Fluorouracile ,l'Imatinib , le Tamoxifene et le Methotrexate (Białk-Bielińska *et al.*, 2017)

De plus, les daphnies contribuent à la définition des critères de qualité des eaux douces et l'établissement des normes internationales de la qualité de l'environnement (Dyer *et al.*, 2008 ; Slobodnik *et al.*, 2012). De même, cette espèce fait l'objet d'une normalisation nationale depuis l'année 2014 par Institut Marocain de Normalisation (IMANOR) : l'évaluation de toxicité à court terme (NM ISO 6341, 2014) et l'évaluation de toxicité à long terme (NM ISO 10706, 2014).

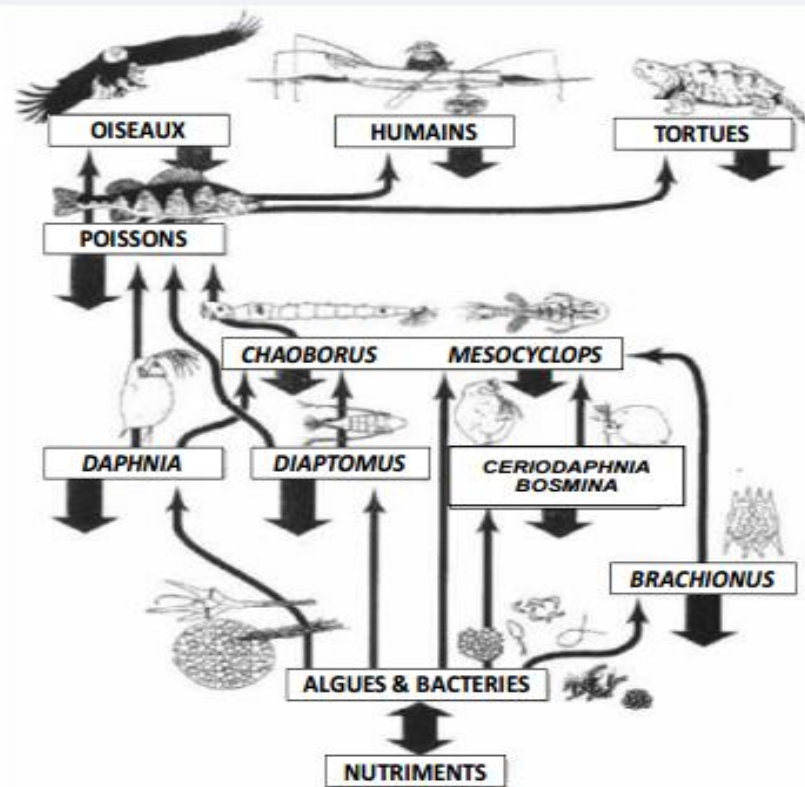


Figure 12: Positon des daphnies dans la chaine alimentaire (Dodson et Hanazato, 1995)

IV. 2 *Danio rerio*

IV.2.1 Classification

La taxonomie de *Danio rerio* est :

Tableau 3: Classification de *Danio rerio*

Règne	<i>Animal</i>
Embranchement	<i>Chordata</i>
Classe	<i>Actinopterygii</i>
Sous Classe	<i>Neopterygii</i>
Ordre	<i>Cypriniformes</i>
Famille	<i>Cyprinidae</i>
Genre	<i>Danio</i>
Espèce	<i>Danio rerio</i>

IV.2.2 Anatomie (Labrot, 1996)

Danio rerio sont des petits poissons tropicaux originaire d'Inde. En milieu naturel, le poisson zèbre peut vivre jusqu'à 5 ans et dépasser les 6 cm de long. Par contre, en aquarium, cette espèce ne vit que 3 à 5 ans et n'atteint que 4 cm de longueur. Son corps est allongé, fusiforme et très flexible ce qui facilite à l'espèce une progression rapide ainsi que des changements de direction fréquents. Il présente un dimorphisme sexuel externe bien marqué, les mâles sont plus petits et plus élancés que les femelles. Ces dernières sont reconnues par un abdomen rondouillard plus bombé doté d'un oviducte au niveau de la papille ano-urogénitale en amont de la nageoire anale.

Le poisson zèbre tient son nom aux rayures qui recouvre son corps horizontalement. La couleur du corps est bleu foncé et possède quatre bandes longitudinales jaunâtres et brillantes qui s'étendent des opercules à la nageoire caudale. La nageoire dorsale est d'une couleur bleue, l'anale est rayée, les pectorales et ventrales sont transparentes. Les opercules du poisson sont bleus avec des tâches dorées. La bouche est dirigée vers le haut et porte deux paires de barbillons insérés dans la commissure des lèvres et sur la mâchoire supérieure.

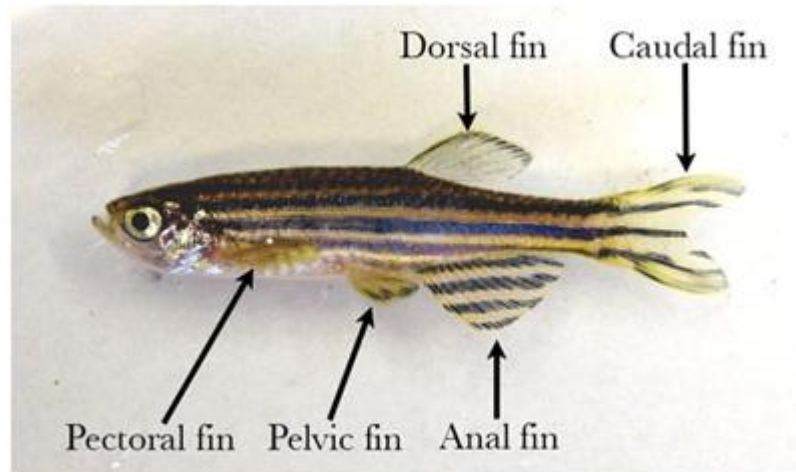


Figure 13 : Poissons mâles adultes (Gupta et Mullins, 2010)

IV.2.3 La reproduction et cycle de vie (Porcher et al., 2003)

Le *Danio rerio* est un poisson ovipare d'eau douce. La fécondation est externe. Pourchassées par les poissons mâles, les femelles libèrent leurs ovules en pleine eau et les mâles émettent leur laitance. Dans les secondes qui suivent, la fertilisation a lieu. Une femelle pond environ une centaine d'œufs d'un millimètre de diamètre. Le cycle de vie de cette espèce est court. Son développement embryo-larvaire est très rapide et se déroulent en huit stade fondamentales : le stade unicellulaire, le zygote (0 hpf, suivi des premières divisions), le stade blastula (2,25 hpf), le stade gastrula (5,25 hpf), la période de segmentation (10 hpf) et la pharyngula (24 hpf).

Après la division cellulaire, le stade d'éclosion commence à 48 hpf et la période "larve précoce" est atteinte à 120 hpf. Ensuite, la période "larve" démarre après trois jours de l'éclosion (144 hpf). La larve a pratiquement achevé sa morphogénèse et continue à grandir jusqu'à ce que le sac vitellin disparaisse peu à peu. Elle peut maintenant réagir d'une manière rapide à des stimuli par la fuite, de respirer, de rechercher de proies et de s'alimenter de manière autonome. Entre 75 à 100 jours, la maturité sexuelle est atteinte. La durée de vie moyenne du poisson dépend du milieu de vie. En général, le taux de survie augmente avec la diminution de la température. Dans son milieu naturel, le poisson zèbre peut vivre 3 ans (où la température de l'eau est généralement comprise entre 18 et 24 °C). Si l'élevage de l'organisme est maintenu dans des conditions de laboratoire, cette durée est réduite d'environ 2 ans (des températures de l'ordre de 24 à 26 °C).



Figure 14 : Développement embryonnaire (Barillet, 2007)

IV.2.4 Alimentation

Les poissons zèbres vivent dans les rivières à courant lent, les étangs, les rizières, les eaux stagnantes et les petits cours d'eau de lent débit, peu profonds et à l'eau claire (Raymond *et al.*, 2007). D'après leur morphologie buccale (une bouche en position supérieure dirigée vers le haut), ces espèces sont insectivores, omnivores. Elles ont une préférence aux proies nageant en surface ou en pleine eau. Ces organismes s'alimentent principalement de phytoplancton, zooplancton, des insectes et des larves. Lorsque leur nourriture préférentielle n'est pas disponible, ils peuvent manger des vers et des petits crustacés (Rowena, 2007).

IV.2.5 Comportement

Danio rerio est une espèce grégaire vivant en petits bancs par groupe de 10 à 20 individus au minimum. Dans leur milieu naturel, ces vertébrés vivent en eau douce, légèrement acide, peu profonde, à faible courant et proche de la surface dont la température varie de 6 à 38 °C en fonction de la saison (Engeszer *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2008). De nature très active, ces poissons préfèrent les grands espaces malgré sa petite taille. L'adaptation thermique de cette espèce est importante puisqu'on la rencontre dans des eaux dont la température varie de 10 à 40 °C. De même, ce vertébré peut supporter de larges gammes de pH (6,5 à 8) et de dureté (12 à 21 °TH).

IV.2.6 Intérêt écologique

Le poisson *Danio rerio* est le premier organisme vertébré à avoir été cloné. Connu pour ses grandes capacités régénératrices, le poisson zèbre est largement décrit dans la littérature scientifique notamment par le zoologiste Francis Buchanan Hamilton en 1822, sous le nom

de *Cyprinus rerio*. Cette espèce représente l'un des trois modèles biologiques les plus utilisés dans le cadre de l'évaluation des risques écotoxiques des substances chimiques (Pereira *et al.*, 2010). *Danio rerio* est l'un des vertébrés le plus important en pharmacologie, génétique, toxicologie, biologie développementale, neurophysiologie et dans le domaine médical (Kimmel *et al.*, 1995 ; Spitsbergen et Kent, 2003 ; Fadool et Dowling, 2008; Maximino et Herculano, 2010). Leur équivalence génétique est de 70% avec les êtres humains (Howe *et al.*, 2013 ; Rob *et al.*, 2016). Ce petit poisson est utilisé pour la détermination de la toxicité de différents pesticides tels que le glyphosate (Faria *et al.* 2021), le chlorpyrifos, le dicofol et l'atrazine (El Amrani, 2012).

Récemment, on utilise le poisson zèbre en neurophysiologie et pour l'étude du comportement (Linney *et al.*, 2004 ; Fleisch et Neuhauss, 2006; Gerlai, 2011). Depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux réalisés en génétique moléculaire ont contribué à des avancées importantes au projet de séquençage du génome du poisson zèbre .Aujourd'hui, le génome de l'espèce *Danio rerio* est entièrement séquencé (1.6.109 paires de base) (<http://zfin.org/>).

Ces organismes sont recommandés par plusieurs normes et lignes directives internationales pour les bioessais et contribuent ainsi à la définition des concentrations limites des substances chimiques et l'établissement des normes internationales de la qualité de l'environnement.

CHAPITRE V : GENERALITE SUR LES PESTICIDES

V.1 Définition pesticide

D'après la directive européenne 91/414/CEE du 15 juillet 1991, les pesticides appelés aussi les produits phytosanitaires désignent un mélange contenant une ou plusieurs substances actives, ayant pour action de :

- Protéger les végétaux contre toute espèce nuisible.
- Assurer la conservation des organismes végétaux.
- Détruire des végétaux ou parties de végétaux.
- Exercer une action de régulateur de croissance sur les processus vitaux des végétaux.

Parmi les pesticides les plus utilisés on trouve :

- Herbicide : un produit chimique utilisé pour détruire les mauvaises herbes ou les plantes indésirables.
- Fongicide : un produit chimique utilisé pour lutter contre les moisissures et les différents champignons.
- Insecticide : un produit chimique utilisé pour détruire ou repousser les insectes ou d'autres invertébrés

V.2 Cadre réglementaire des pesticides

V.2.1 La législation des pesticides internationale

L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ont créé la Commission du Codex Alimentarius, dont le but de protéger la santé des consommateurs et de choisir des pratiques loyales en matière de commerce de produits alimentaires. Ce code alimentaire est un recueil de normes, de lignes directrices, de recommandation, de codes d'usages des produits alimentaires et textes apparentés internationalement adoptés et présentés de manière uniforme. Dans ce document, on trouve des normes Codex pour les résidus des pesticides dans les aliments. Ces normes définissent les limites maximales de ces résidus (LMR) pour contribuer à la sécurité et à la qualité des denrées alimentaires tout en facilitant un commerce loyal et international des aliments. Actuellement, la Commission du Codex Alimentarius compte de 189 membres (188 pays et 1 une organisation qui est l'Union européenne). Le Maroc est parmi les états membres de ce code alimentaire.

V.2.2 La législation des pesticides au Maroc

La loi marocaine concernant les pesticides est semblable dans ses grandes lignes à la réglementation Européenne. Au Maroc, la loi N°42-95 relative au contrôle et à l'organisation du commerce des produits phytosanitaires (pesticides) à usage agricole. Elle vise à fixer les conditions pour l'homologation, le renouvellement d'homologation, les conditions pour l'agrément des personnes pour exercer les activités de fabrication, d'importation, de distribution et de la vente des substances. (Akchati, 2018). Pour être importé et commercialisé au Maroc, un pesticide est soumis à une procédure d'homologation qui vise à garantir l'efficacité, la sélectivité et l'innocuité du produit envers l'humain et l'environnement.

Les produits pesticides à usage agricole sont soumis à l'homologation conformément à la loi 42-95 et de ses textes d'application. Cette homologation est accordée après avis de la commission des pesticides à usage agricole de l'Office National de Sécurité Sanitaire des Aliments (ONSSA) instituée par le Décret N°2-01-1343. Pour l'importation ou la fabrication des pesticides, les sociétés agréées sont tenues de déposer leurs demandes d'homologation auprès de l'ONSSA. Après son étude, chaque demande d'agrément est soumise à l'avis de la Commission des Agréments pour exercer le Commerce des Pesticides (CACP) (ONSSA, 2015). Au Maroc, la mise en œuvre de cette loi paraît difficile en raison de l'analphabétisme et le savoir des techniques de la bonne pratique.

Un certain nombre de conventions et de codes internationaux ont été mis en place pour la gestion viable des pesticides au Maroc. Ces instruments internationaux visent à réduire le risque de ces polluants, protéger les travailleurs dans le secteur agricole, uniformiser le transport international de ces marchandises dangereuses par mer, interdire l'utilisation des substances périmés et à encourager l'élimination de ces toxiques d'une manière écologique et rationnelle. Les principaux instruments sont : la Convention de Rotterdam 1998, la convention Bâle 1992, la Convention de Stockholm 1997, la Convention sur la sécurité et la santé dans l'agriculture 2001, le Code maritime international des marchandises dangereuses 1965, le Code de conduite international sur la gestion des pesticides 2013, l'Approche stratégique pour la gestion internationale des produits chimiques (SAICM) en 2006.

V.3 La consommation et la vente mondiale des pesticides

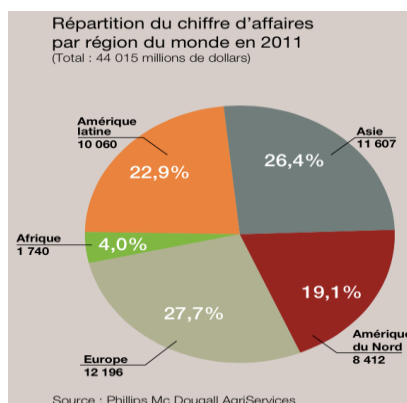


Figure 15: La vente mondiale des pesticides (Union des Industries de la Protection des Plantes, 2013)

D'après la figure 15, L'Europe prend la première position dans le marché mondial de vente des pesticides suivi par l'Asie, puis l'Amérique latine, l'Amérique du Nord et finalement l'Afrique. La répartition de ce marché entre les différentes catégories des pesticides montre la prédominance des herbicides avec 47% des ventes, suivies des insecticides qui représentent près de 29 % et les fongicides 18 % (ACTA, 2002).

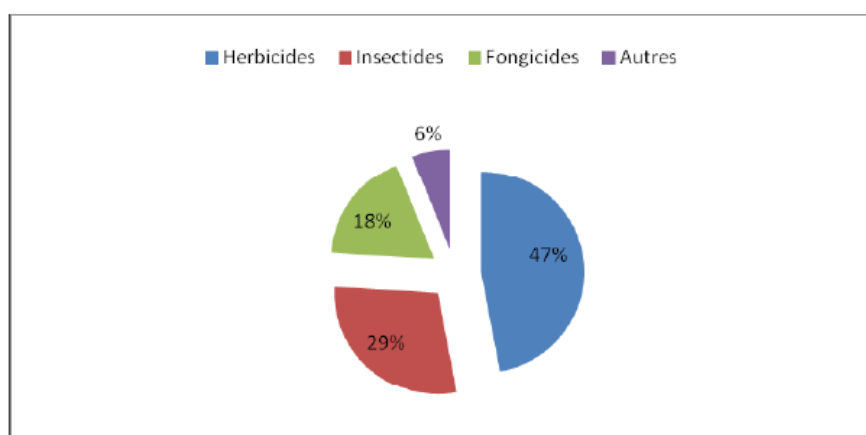


Figure 16: Vente de produits phytosanitaires dans le monde (ACTA, 2002)

Depuis les années quarante, la consommation mondiale de pesticide est en constante augmentation, passant ainsi de 490 g/ha en moyenne en 1961 à 2 kg/ha en 2004. (Mouileh, 2011). En 2014, cette consommation a atteint 3013,97 millions de kg. La chine est le pays le plus consommant du produit phytosanitaire suivie par l'Argentine et le Mexique (agence de statistique de l'organisation pour l'alimentation et agriculture FAO).

D'après le Chiffre d'affaires des ventes de pesticides pour l'Europe 2010, la France est le premier consommateur européen de pesticides. Ceci peut être expliqué par l'emplacement qu'occupe la France au niveau agriculture. Ce pays est le premier producteur agricole européen avec 20 millions d'hectares de terres cultivables.

En tant que pays en voie de développement, le souci principal du Maroc est d'atteindre l'autosatisfaction alimentaire. Le pays ne cesse de développer les moyens et les infrastructures nécessaires pour améliorer ses systèmes de production agricole. L'utilisation des pesticides au Maroc a augmenté depuis 2005. Selon l'Office National de la Santé et de la Sécurité sanitaire des aliments (ONSSA), le marché marocain des pesticides repose principalement sur les importations. L'absence d'unité de fabrication des produits phytosanitaires au Maroc pousse ce dernier à importer près de 95% des pesticides. Le pays importe chaque année 17 589 tonnes de produits phytosanitaires par le biais d'environ 70 sociétés phytosanitaires (El Ouilani, 2011). En 2018, le nombre de matières actives en commercialisation a remonté jusqu'au 379 avec 5179 produits et 1316 formulations (MAPM, 2010). Selon ONSSA, les insecticides prédominent le marché marocain suivis par les fongicides ensuite viennent les herbicides. Actuellement, plus de 600 produits phytosanitaires sont importés et commercialisés au Maroc. Mais cela ne représente que 0,017% de l'utilisation mondiale de ces produits chimiques. Le Maroc reste un faible utilisateur de ces substances dans le classement des consommateurs répertorié par la FAO (FAO, 1978).

La vente des pesticides au marché marocain est entre 10 % et 15 % de la contrebande. Ceci à un impact sur l'économie nationale, l'environnement et surtout représente un danger pour la santé des utilisateurs et des consommateurs (El Ouilani, 2011).

V.4 Glyphosate

V.4.1 Propriétés générale

Le nom de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA) pour le glyphosate est N-(phosphonométhyl) glycine. Il est un dérivé de la glycine. C'est un herbicide systémique foliaire non sélectif. Son principe actif pénètre dans la plante par ses feuilles jusqu'aux racines et détruit la totalité de la plante (Tomlin, 2009). C'est un acide organique faible qui appartient à la famille des aminophosphonates. Les formulations de cet herbicide comprennent un acide, un sel de monoammonium, un sel de diammonium, un sel

d'isopropylamine, un sel de potassium, un sel de sodium et un sel de triméthylsulfonium ou de trimésium (EPA, 1993).

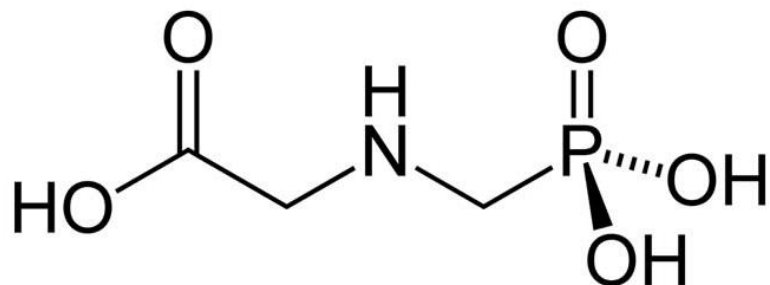


Figure 17: Structure chimique du glyphosate

Le mode d'action du glyphosate est simple. Cet herbicide interfère, en bloquant une enzyme spécifique avec la voie du shikimate qui produit certains acides aminés spécifiques chez les végétaux. En inhibant l'action de cette enzyme, le shikimate s'accumule dans les tissus de la plante, perturbe ainsi les apports en énergie et nutriments et conduit à court terme à une destruction du végétal.

Le tableau 5 montre les paramètres physico chimiques du glyphosate :

- La solubilité : l'herbicide est modérément soluble dans l'eau (10 à 12 g/L à 20°C et pH 2) et insoluble dans la plupart des solvants organiques.
- La réactivité : le glyphosate est un produit chimique stable. Cet herbicide peut réagir vivement avec les bases fortes ; la réaction est exothermique. Cette substance chimique attaque le fer et l'acier galvanisé en libérant de l'hydrogène.
- La décomposition : par la combustion, ce pesticide se décompose en dégageant des fumées toxiques contenant notamment des oxydes d'azote, des oxydes de phosphore et des oxydes de carbone.

Le glyphosate est modérément soluble dans l'eau .Pour accroître sa solubilité, l'industrie chimique prépare les spécialités en dispersion aqueuse diluée sous forme de sel isopropylamine de N-(phosphonométhyl) glycine. Cette substance est très soluble dans l'eau (1050 g/L à 25°C).

Tableau 4: Caractéristiques physico chimique du glyphosate (Worthing et Hance, 2000)

Caractéristiques	Identifications/Valeurs
Non chimique	N- (phosphonométhyl) glycine
Forme	Cristal
Couleur	Blanc
Odeur	Inodore
Formule chimique	$C_3H_8NO_5P$
Masse moléculaire (g/mole)	169.1
Densité (g/mole)	1.74
Point de fusion (°C)	200
Point d'éclair (°C)	>93 (vision)
Pression de vapeur (mm Hg à 25°C)	$<7.5 \cdot 10^{-8}$
Solubilité dans l'eau (mg/l à 25°C)	12000
Solubilité dans les solvants organiques	Insoluble dans la plupart des solvants organiques
Coefficient d'adsorption (K)	16.5
Constante de dissociation (pka)	<2 ; 2.6 ; 5.6 et 10.6

V.4.2 Utilisation du glyphosate dans le monde

En 1950, le glyphosate est synthétisé pour la première fois par un chimiste suisse Dr Henri Martin (Benbrook, 2016). C'est en 1970 que John Franz, chimiste employé de Monsanto, a identifié l'activité herbicide du glyphosate puis il a été introduit sur le marché sous le nom commercial de Roundup dès 1974.

Pendant plus de deux décennies, le glyphosate est resté l'un des herbicides les plus utilisés et les plus vendu au monde (Baylis, 2000) avec une production de 1 065 000 t/an en 2017 (Tableau 6). Le glyphosate est utilisé en agriculture, en horticulture, viticulture, sylviculture et en maintenance des jardins et espaces vert. Sa consommation mondiale a été multipliée par près de 10 depuis la moitié des années 90, passant ainsi, de 56.296 tonnes d'ingrédient actif en 1994 à 825 804 tonnes métriques en 2014 (Benbrook, 2016).

En États-Unis uniquement, plus de 1,6 milliard de kilogrammes de glyphosate actif ont été exploités, soit 19 % de l'utilisation mondiale de cet herbicide. De même, le glyphosate est l'herbicide le plus vendu au Canada (Santé Canada, 2016) et au Québec (Mathieu et Faucher,

2016). En 2017, ce pesticide représentait près de 27% des herbicides employés en Belgique, ce qui correspond à près de 2334 tonnes de glyphosate. En 2017, la production mondiale du glyphosate atteignait 1.065.000 tonnes. La production de ce produit phytosanitaire se concentrait en Chine et en Inde (Research and Market, 2018). Selon The Global Glyphosate Market, pour la période prévisionnelle 2019-2024, le marché mondial du glyphosate devrait atteindre 12,54 milliards de dollars d'ici 2024, avec un TCAC de +6,8 %. Entre 2019 et 2024, on estime que la croissance de marché sera la plus rapide en Amérique du Nord. Le marché le plus grand pour ce pesticide est sur la région Asie Pacifique. L'Europe reste un marché faible pour le glyphosate.

Tableau 5: Production mondiale de glyphosate (IARC, 2015 ; Research and Market, 2018)

Année	2008	2011	2012	2017
Volume de glyphosate en tonne	600 000	650 000	720 000	1 065 000

V.4.3 Situation actuelle de l'utilisation du glyphosate au Maroc

Au Maroc, le glyphosate est parmi les herbicides les plus employés en agriculture. Une enquête menée par Maftouh *et al.*, 2017 a montré que le glyphosate est parmi les substances actives les plus exploitées dans la région du Gharb. De même, ce produit phytosanitaire est le plus utilisé dans la province de Meknès occupant la première place avec 15,22% (Maldani *et al.*, 2017).

Au Maroc, le glyphosate est utilisé pour le traitement non sélectif des vergers d'oliviers, d'agrumes et d'arbres fruitiers ainsi que des parcelles en post récolte des cultures céréales, betterave à sucre, maraîchage (Baye *et al.*, 2007). Cet herbicide est généralement utilisé pour le désherbage total avant remise en culture et pour lutter contre les plantes parasites comme l'orobanche de la fève et la morelle jaune (Janati , 1976; Schmitt *et al.* 1979 ; Schlüter et Aber 1980 ; Mabsout et Saadaoui , 1996).

V.4.4 Présence du glyphosate dans l'environnement

L'usage massif, non contrôlé et mal maîtrisée du glyphosate peut engendrer la contamination de l'environnement par ces substances chimiques. Ceci a des effets néfastes sur la faune et la flore qui hébergent ces écosystèmes. En raison de l'utilisation irrationnelle du glyphosate, certains végétaux ont progressivement engendré une résistance croissante face à cet herbicide.

La présence du glyphosate dans les sols est possible. Les études Laitinen et al. (2006) et Mamy et al. (2008), ont montré que le glyphosate peut persister dans les sols plusieurs semaines. Les résultats de l'étude Silva et al. (2018), ont montré une présence élevée du glyphosate dans la partie superficielle des sols avec 21% dans les échantillons étudiés.

Par ailleurs, d'autres études ont démontré la présence du glyphosate dans les milieux aquatiques (Robichaud et Rooney, 2021) sous influence de précipitations (Vereecken, 2005; Borggaard et Gimsing, 2008) de pulvérisation accidentelle et de ruissellement des terres agricoles (Struger *et al.*, 2015 ; Montiel-León *et al.*, 2019) . Plusieurs études ont montré que le glyphosate a été détecté dans des eaux naturelles soit de surfaces ou souterraines de plusieurs pays (Trudeau *et al.*, 2011 ; Horth, 2012 ; Battaglin *et al.*, 2014, Majewski *et al.*, 2014 ; Giroux, 2015).

En France, des mesures menées entre 2014-2018 pour le glyphosate, ont relevé des concentrations supérieures à la limite comprise entre 0,01 et 5µg/L dans les eaux de surface (Inris, 2020). De même, cet herbicide a été détecté dans les eaux souterraines avec des dépassements annuels de la norme de qualité de l'eau souterraine pour les pesticides. (ANESS, 2018).

Selon l'OMS, 1994, le glyphosate est peu soluble dans l'air en raison de sa faible pression de vapeur saturante (inférieure à 10^{-5} Pa à 25 °C). Mais on peut le trouver sous forme d'aérosol ou fixé sur des poussières issues de sol poudreux. En 2011, les résultats de l'étude Chang et al., ont montré une fréquence de détection du glyphosate variant de 60 à 100 % dans l'air .Le taux de glyphosate dans l'air variait de moins de 0,01 à 9,1 ng/m³ dans l'air.

V.4.5 Comportement du glyphosate dans l'environnement

La majeure partie des quantités de pesticides apportées, lors du traitement des cultures, atteint le sol suite à l'application directe de ces substances phytosanitaires ou le lessivage de la pluie. Le sol occupe une position principale dans la régulation du devenir des pesticides dans l'environnement (Barriuso *et al.*, 1996).

V.4.5.1 Comportement dans le sol

Les conditions pédologiques et climatiques affectent la présence et la persistance du glyphosate dans le sol (Tomlin, 2009). Des valeurs comprises entre 2 et 197 jours de la demi-vie médiane du glyphosate ont été rapportées (Giesey, 2000). Cet herbicide est relativement

stable à la décomposition chimique et photographique (RED, 1993). Le glyphosate se dégrade seulement sous l'action microbienne du sol produisant ainsi de produits principaux : l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) et l'acide glyoxylique. Ces deux composants sont ensuite dégradés en dioxyde de carbone (Roberts, 1998).

V.4.5.2 Comportement dans l'eau

L'herbicide glyphosate a un faible potentiel de contamination des eaux souterraines en raison de ses fortes propriétés d'adsorption. Selon la littérature, cette substance chimique peut contaminer les eaux de surface par l'érosion du sol (EPA, 1993), les précipitations (Vereecken, 2005; Borggaard et Gimsing, 2008) les pulvérisation accidentelle et le ruissellement des terres agricoles (Struger *et al.*, 2015 ; Montiel-León *et al.*, 2019). La demi-vie médiane du glyphosate dans l'eau varie de quelques jours à 91 jours (Tomlin, 2009).

V.4.5.3 Comportement dans l'air

Le glyphosate est stable et peu soluble dans l'air. Selon l'OMS, 1994, sa pression de vapeur saturante est inférieure à 10^{-5} Pa à 25 °C. (Allant de $1,84 \times 10^{-7}$ mmHg à $6,75 \times 10^{-8}$ mmHg à 25 °C).

V.4.6 Toxicité du glyphosate

V.4.6.1 Toxicité chez les animaux

V.4.6.1.1 Toxicité aiguë

De nombreuses études ont été menées pour déterminer l'effet du glyphosate chez les animaux. Les deux études Fink et Beavers (1978), ont révélé une CL_{50} alimentaire sur 8 jours supérieurs à 4000 ppm pour les canards colverts et les colins de Virginie. Le glyphosate a une légère toxicité sur les deux espèces étudiées.

Les principaux signes de toxicité aiguë observés chez le rat sont des difficultés respiratoires (la CL_{50} est supérieure à 5 mg/L d'air inhalé pour une exposition de 4 heures), une dépression cardiaque (la DL_{50} orale du POEA est de 1200 mg/kg) une réduction de l'activité. (Picque, 2016). Par voie cutanée, le glyphosate associé à son sel d'isopropylamine, ont une DL_{50} supérieure à 2000 mg/kg de poids corporel chez le rat et le lapin (Picque, 2016).

De même, le glyphosate affaibli la capacité de l'abeille domestique à s'orienter pouvant causer sa mort par inanition (Balbuena *et al.*, 2015). L'étude Vencill (2002) montre que la

CL₅₀ des vers de terre dans le sol est supérieure à 5000 ppm pour le produit formulé par Monsanto, le Roundup®.

Selon littérature scientifique, les résultats des études montrent que le glyphosate présente une faible toxicité aiguë vis-à-vis les animaux.

V.4.6.1.2 Toxicité subchronique et chronique

Une exposition par voie orale chez une population de rats et de souris pendant 13 semaines, a montré des lésions microscopiques au niveau des glandes salivaires, avec des altérations cytoplasmiques et des hypertrophies des cellules acineuses. De même, les expérimentations ont révélé que le glyphosate a un effet toxique sur les deux systèmes hépatobiliaire et gastro-intestinal. L'étude a rapporté une augmentation du poids du foie, la présence d'acides biliaires dans le sérum, l'augmentation des phosphatases alcalines et des transaminases (ALAT, ASAT), la présence de diarrhée et réduction du poids des individus. (Chan et Mahler, 1992)

Pendant 21 jours, l'application cutanée du glyphosate, chez le lapin à une dose journalière de 5000 mg/kg et chez le rat à une dose journalière de 1000 mg/kg, a révélé une irritation cutanée à partir de 1000 mg/kg/j chez le rat et de 5000 mg/kg/j chez le lapin (Cox, 1995).

Les études de l'évaluation de la toxicité chronique du glyphosate (exposition pendant 2 ans), montrent que l'herbicide a un effet toxique à long terme. Des rats ont été nourris avec un régime alimentaire contenant du glyphosate. Des effets toxiques ont été observés pendant la durée d'exposition. Une diminution du gain de poids corporel, une augmentation du poids du foie avec des troubles hépatiques (diminution de pH urinaire, une inflammation chronique des reins) une augmentation des signes de cataractes et d'anomalies du cristallin ont été rapportés dans l'étude Stout et Ruecker (1990). La NOEC est de 362 mg/kg/jour pour les mâles et de 457 mg/kg/jour pour les femelles.

Pendant deux ans, des rats ont été nourris avec des régimes qui contiennent cet herbicide à des doses de 0, 100, 300 ou 1000 mg/kg/jour. Après 52 semaines, on a observé que certains rats ayant reçu la dose la plus élevée présentait des glandes salivaires hypertrophiées avec des modifications cellulaires. La NOEC est de 100 mg/kg/jour (Atkinson *et al.*, 2004).

V.4.6.2 Cancérogénicité du glyphosate

En mars 2015, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé le glyphosate comme étant probablement cancérogène pour l'homme (Groupe 2A). L'évaluation de la cancérogénicité du glyphosate a été déterminée par des 17 experts de 11 pays au centre CIRC à partir de la littérature (Guyton *et al.*, 2015). De même, en mars 2015, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a classé le glyphosate comme substance « probablement cancérogène pour l'homme ». (World Health Organization, 2015 ; International Agency for Research on Cancer, 2017).

L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) introduit pour la première fois une Dose Aiguë de Référence (la quantité pouvant être ingérée sur une courte période sans effet nocif pour la santé) qui a été fixée à 0,5 mg/kg de poids corporel par jour.

En 30 juin 2021, l'Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale) affirme qu'il existe un lien entre l'exposition professionnelle du glyphosate et six maladies graves. Parmi ces pathologies, on trouve trois types de cancer (prostate, lymphomes non hodgkiniens, myélomes multiples), la maladie de Parkinson, les troubles cognitifs et la BPCO qui est une maladie respiratoire évolutive (Inserm, 2021).

V.4.6.3 Toxicité chez les espèces aquatiques

Malgré les fortes doses nécessaires du glyphosate pour déterminer un effet létal chez plusieurs vertébrés aquatiques et terrestres, certaines espèces de poissons et d'invertébrés aquatiques sont plus sensibles à l'exposition de cet herbicide (Bradberry *et al.*, 2004). Ci-dessous, les tableaux résument quelques études concernant la toxicité aiguë et chronique du glyphosate chez différentes espèces vivant dans les milieux aquatiques.

Tableau 6: Toxicité aigüe des plantes, algues et bactéries aquatiques

Milieu	Espèce	Concentration d'effet	Valeur mg/L	Référence
Eau douce	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	EC ₅₀ (96h)	3,5	UK Environmental Agency, 2010
	<i>Navicula pelliculosa</i>	EC ₅₀ (120h)	17	US EPA, 2013
	<i>Pseudokirchneriella costatum</i>	EC ₅₀ (120h)	14	US EPA, 2013
		EC ₅₀ (14j)	12,4	US EPA, 2013
	<i>Lemna gibba</i>	EC ₅₀ (48h)	8,1	Zhang <i>et al.</i> , 2018
	<i>Microcystis aeruginosa</i>			
Milieu marin	<i>Skeletonema costatum</i>	EC ₅₀ (168h)	0,77	US EPA, 2013

Tableau 7: Toxicité aigüe des invertébrés aquatiques

Milieu	Espèce	Concentration d'effet	Valeur mg/L	Référence
Eau douce	<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ (48h)	8,9	Hansen et Roslev , 2016
	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	EC ₅₀ (40h)	648	Tsui et Chu, 2003
Milieu marin	<i>Americamysis bahia</i>	LC ₅₀ (96h)	40	E.C., 2002
	<i>Acartia tonsa</i>	EC ₅₀ (48 h)	35,3	Tsui et Chu, 2003
		EC ₅₀ (48 h)	62	Folmar, 1979
	<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>			

Tableau 8: Toxicité aigüe des vertébrés aquatiques (poissons)

Milieu	Espèce	Concentration d'effet	Valeur mg/L	Référence
Eau douce	<i>Clarias gariepinus</i>	LC ₅₀ (96h)	300	Erhunmwunse <i>et al.</i> , 2018

	<i>Lepomis macrochirus</i>	LC ₅₀ (96h)	45	US EPA, 2013
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LC ₅₀ (48h)	140	US EPA, 1993
		EC ₅₀ (48h)	17,5	Rodrigues <i>et al.</i> , 2016
Milieu marin	<i>Cyprinodon variegatus</i>	LC ₅₀ (96h)	240	US EPA, 2013

Tableau 9: Toxicité chronique des plantes et algues aquatiques

Milieu	Espèce	Concentration d'effet	Valeur mg/L	Référence
Eau douce	<i>Lemna gibba</i>	NOEC (168 h)	7,56	US EPA, 2013
	<i>Navicula pelliculosa</i>	NOEC (168 h)	19,1	US EPA, 2013
	<i>Pseudokirchneriella costatum</i>	NOEC (120 h)	10	US-EPA, 2013
Milieu marin	<i>Skeletonema costatum</i>	NOEC (168 h)	0,28	US EPA, 2013

Tableau 10: Toxicité chronique des invertébrés aquatiques

Milieu	Espèce	Concentration d'effet	Valeur mg/L	Référence
Eau douce	<i>Daphnia magna</i>	NOEC (21j)	1.35	Cuhra <i>et al.</i> , 2013

Tableau 11: Toxicité chronique des vertébrés aquatiques (poissons)

Milieu	Espèce	Concentration d'effet	Valeur mg/L	Référence
Eau douce	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NOEC (21j)	150	AGRITOX, 2013
	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (254j)	25,7	US-EPA, 1993

MATERIELS ET METHODES

Partie II

MATERIELS ET METHODES

I. ENQUETES SUR L'UTILISATION DES PESTICIDES NOTAMMENT LE GLYPHOSATE DANS LA REGION RABAT-SALE-KENITRA

I.1. Points d'enquêtes sur terrain

Malgré les difficultés rencontrées lors de nos enquêtes, nous avons pu rassembler le maximum de renseignements sur l'usage des pesticides utilisés par les agriculteurs de la région de Rabat-Salé-Kénitra. Le choix de ces points d'étude est basé sur la forte densité de production agricole. Points d'enquêtes sur terrain sont : Ain Aouda, Rommani, El Oulja, Sehoul, Dar Sekka, Safae, Nkhakhsa, Dzira, Wade zayane, Wlade laarbi, Mnassera, Sidi Yahya Lgharb, Sidi Alal Tazi, Kammouni, Lalla Mimouna, Souk larbaa et Moulay Bousselham.



Figure 18: Photos de quelques points visités dans la région d'étude

I.2 Fiche questionnaire et type d'informateur

Pour que nos résultats soient plus significatifs, nos enquêtes ont été réalisées à l'aide de 70 fiches questionnaires durant l'année 2019.

Notre fiche questionnaire (Annexe 2) comporte le numéro de série, la date, une partie concernant le profil de l'informateur à savoir son niveau d'étude et son revenu mensuel. Une autre partie concernant le pesticide à savoir le genre utilisé, la dose utilisée, le type de maladie.

Lors de nos enquêtes, nous avons essayé de questionner plusieurs types d'informateurs :

- Les agriculteurs qui ont hérité leurs connaissances agricoles de leurs parents,
- Les ingénieurs agricoles qui ont reçu une formation scientifique,
- Les vendeurs locaux car certains agriculteurs n'arrivaient pas à se souvenir du nom des pesticides utilisés.

Un traitement informatique à l'aide de Microsoft Office Excel 2007, nous a permis d'analyser les données recueillies lors de nos enquêtes dans la ville de Rabat-Salé-Kénitra.

II. SUBSTANCE ETUDIEE

Pour ce travail, nous avons utilisé une substance de référence le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$), d'autre part un herbicide contenant 480 g/L du glyphosate qui représente le sujet de ce mémoire.

Les substances de référence sont essentiellement destinées à servir de base comparative avec les mesures biologiques pratiquées sur les échantillons complexes dont la composition est très imparfaitement connue.

Le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) a été utilisé comme substance de référence pour la validation du test des daphnies (selon la norme ISO 6341, 2014) et le test des poissons zèbres (selon la norme ISO 15088, 2007). Cette substance est utilisée pour le contrôle de la sensibilité du réactif biologique et de l'applicabilité du mode opératoire.

Le glyphosate a été utilisé dans les tests de toxicité aquatique au sein de notre laboratoire pour définir son impact sur l'environnement aquatique en utilisant deux espèces *Daphnia magna* et *Danio rerio*.

II.1 Toxique de référence

Afin de vérifier la sensibilité des organismes tests et la conformité d'application des modes opératoires au sein du laboratoire centrale de contrôle de qualité des eaux ONEE-branche eau, des vérifications régulières ont été établies avec la substance de référence le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$). Des analyses par cette substance ont été réalisés ou au moins deux fois par ans pour réaliser le diagramme de contrôle en calculant les limites inférieures et supérieures de surveillance.

La substance de référence est préparé à partir de dichromate de potassium (Sigma-Aldrich, pureté > 99%). La solution mère est préparée sur la base de 100 mg de substance diluée dans 1L d'eau distillée, soit une concentration finale de 100 mg /L. Cette solution est ensuite homogénéisée par l'agitation magnétique pendant 10 minutes et stockée dans un flacon en verre ambré et conservée à 4°C. L'ajout de 1 mL de solution d'acide chlorhydrique (HCl) est nécessaire pour tamponner le pH (Annexe 3).

Des bioessais préliminaires sont réalisés avec $K_2Cr_2O_7$ en vue de définir la gamme de dilution définitive à tester.

Pour les bioessais définitifs, une gamme de six concentrations est retenue pour les deux tests *Daphnia magna* (0 mg/L; 0,1 mg/L; 0,2 mg/L; 0,4 mg/L; 0,6 mg/L; 0,8 mg/L et 1,6 mg/L) et *Danio rerio* (120-156-203-264-343-446 mg/L).

II.2 Solution testée

Dans cette étude, le glyphosate utilisé est une solution aqueuse d'un herbicide qui contient 480 g/L de glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine vendu dans le marché marocain. Le choix de cet herbicide est dû à son utilisation massive par les agriculteurs et les sociétés agricoles.

- Fournisseur : Coopérative agricole Dow Agrosiences (Drusenheim, France)
- Distributeur : société agricole PROMAGRI (Casablanca, Maroc).

Pour préparer une solution mère de concentration (100 mg/L), nous avons pris un volume de 20 µL de l'herbicide commerciale, que nous avons dilué directement dans 100 mL d'eau distillée. Les différentes dilutions sont faites quant à elles avec le milieu d'élevage de chaque espèce. La solution mère (100 mg/L) est fraîchement préparée avant chaque renouvellement du milieu d'essai.

III. CHOIX DES MODELES BIOLOGIQUE EN ECOTOXICOLOGIE

L'utilisation d'un organisme dans le domaine de la recherche scientifique pour l'évaluation de l'écotoxicité aquatique suppose qu'il répond à certains critères : La sensibilité, la facilité d'élevage, la rapidité, la simplicité de mise en œuvre, la répétabilité et la reproductibilité.

Le choix de l'utilisation de *Daphnia magna* est favorisé par la facilité de son élevage au niveau des laboratoires, sa visibilité à l'œil nu, sa production de jeunes régulière est assez élevée, sa reproduction asexuée par parthénogenèse qui permet d'assurer une population génétiquement stable, sa sensibilité vis-à-vis les polluants toxiques (Adema., 1978; Slooff *et al.*, 1983 ; Kimerle., 1985, Persoone et Janssen, 1993) et son cycle de vie assez court qui permet de suivre l'effet des polluants sur plusieurs générations.

Tableau 12 : Normes utilisant *Daphnia magna* dans les essais de toxicité aquatique

Stage de vie	Points toxicologiques	Caractères toxicologiques	Temps	Norme	Année
Juvéniles	Inhibition de la mobilité	Lethal	24h-48h	AFNOR ASTM OCDE 211 ISO 6341 CEAEQ	1996 2012 2012 2014 2016
Juveniles-adulte	Croissance de la population et la reproduction	Lethal Sub-lethal	21 jours	OCDE 211 ISO 10706	2011 2014

Par ailleurs, le choix du poisson *Danio rerio* est favorisé par la simplicité de l'élevage en aquarium (coût d'installation faible suite à la petite taille des poissons zèbres), un cycle de vie court (maturité sexuelle en trois mois), une fertilité grande (plusieurs œufs par ponte), la transparence des œufs qui facilite leur manipulation en tests de toxicité , la perméabilité du chorion aux produits toxiques , la rapidité de l'embryogénèse (éclosion entre 48-72 heures), la sensibilité envers les substances toxique (Hill *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2008; Strähle *et al.*, 2012).

Plusieurs normes recommandent cette espèce comme modèle biologique pour l'évaluation de la toxicité d'effluent et de substances chimiques (Tableau 14).

Tableau 13 : Normes recommandant *Danio rerio* pour les essais de toxicité aquatique

Stage de vie	Points toxicologiques	Caractères toxicologiques	Temps	Norme	Année
Embryo	Coagulation des œufs Développent des somites Détachement de la queue Battement du cœur	Lethal	48h-96h	DIN38415-T6 OECD ISO15088 OECD236	2002 2006 2007 2013
Embryo Pré-larve	Mortalité cumulative Eclosion Pré-larve taille et poids Anomalie	Lethal Sub-lethal	8-10 jours	OECD 212 ISO 12890	1998 1999
Embryo Pré-larve larve	Mortalité cumulative Eclosion Pré-larve taille et poids Anomalie	Lethal Sub-lethal	30-32 jours	OECD 210 ASTM E1241-98	1992 1992
Poisson adulte	Vitellogenin	Détection de certains endocrines actives substances	21 jours	OECD230	2009

IV. L'ESPECE DAPHNIA MAGNA

IV.1 Conditions de culture de l'espèce

L'élevage de *Daphnia magna* utilisées dans les bioessais est maintenue dans le laboratoire ONEE-branch eau accrédité conformément à la norme NM ISO 17025 depuis 2005. Les daphnies du clone 5 ont été obtenues à partir d'une culture du laboratoire de toxicologie et d'écotoxicologie de MEDZ (France).

L'utilisation des daphnies dans les bio-essais nécessite une planification avancée pour l'élevage :

- Un contrôle de la lumière, pH et la température,
- Une quantité de nourriture nécessaire pour la croissance de l'espèce,
- Une eau d'élevage de bonne qualité.



Figure 19: Salle d'élevage des daphnies au sein du laboratoire ONEE

Dans le laboratoire des analyses écotoxicologiques de la direction de contrôle de la qualité des eaux, les conditions d'élevage sont les suivantes :

- **Eau d'élevage :** L'eau d'élevage doit avoir un pH de 7.8 ± 0.2 , une dureté totale de $250 \pm 25\text{mg/L}$ et une concentration en oxygène dissous supérieur à 80% de la saturation dans l'air (Annexe 4).
- **Température :** L'élevage se fait dans une salle à température contrôlée en mesure de fournir une température de $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.
- **Lumière :** L'éclairage au niveau de notre laboratoire est un éclairage naturel.

- **Alimentation :** Les daphnies sont nourries quotidiennement avec une nourriture naturelle constituée de culture algales et une nourriture synthétique (Annexe 5).
 - **Nourriture algale :** Dans notre laboratoire, deux espèces sont utilisées combinées : 9.10^6 cellules de *Chlorella pyrenoidosa* / jour /daphnie et $1,25.10^6$ cellules de *Scenedesmus subspicatus* / jour /daphnie.



Figure 20: Incubation des cultures algales

- **Nourriture synthétique :** Elle est constituée d'un mélange de volume de trois solutions : Solution de Tetramin (nourriture de poisson broyée), solution de levure sèche et solution de cerophylle (feuilles de céréales déshydratées).

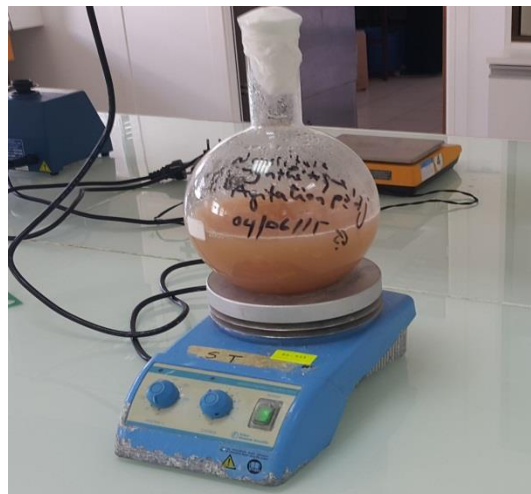


Figure 21: Préparation de la nourriture synthétique

- **Renouvellement** : Trois fois par semaine le milieu d'élevage des daphnies est complètement renouvelé. Le renouvellement a pour objectif d'améliorer la qualité des daphnies et éliminer tous genre de risque.

IV.2 Test de toxicité aigüe de *Daphnia magna*

Le test d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* a été réalisé en appliquant les recommandations de la norme marocaine ISO 6341 (2014) (Annexe 6-1). Les tests sont réalisés en utilisant des juvéniles âgés de moins de 24h.

C'est un test de toxicité à court terme qui vise à déterminer la concentration provoquant l'immobilité chez les daphnies au bout de 24 heures d'exposition.

On place cinq néonates dans un tube de verre de 15 ml contenant 10 ml de l'eau d'élevage et la concentration de toxique désirée.

Pour chaque concentration, quatre répliquas sont réalisés en plus du témoin. L'essai se déroule dans un système statique (sans renouvellement) et les jeunes daphnies ne sont pas alimentées. Cette exposition se déroulera sous un cycle jour/nuit de 16 h/8h.

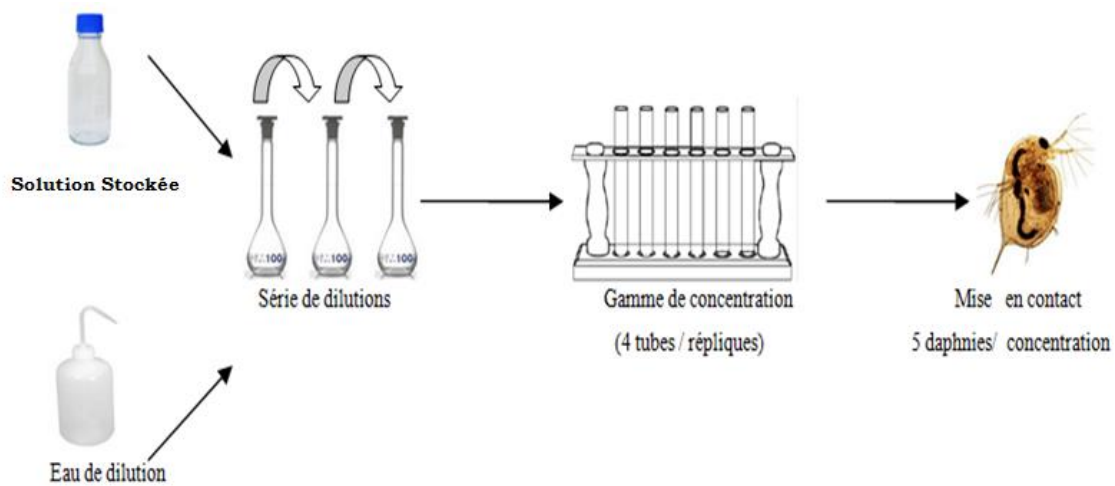


Figure 22: Schéma de dispositif expérimental pour la réalisation de test aigüe (*Daphnia magna*)

Après 24h et 48h d'exposition, on observe l'immobilité. Les daphnies sont considérées immobiles si elles ne bougent plus après 15 secondes d'une légère agitation du tube même si elles remuent les antennes (Environnement Canada, 2007).

La validité de l'essai de toxicité aiguë dépend de trois critères :

- La teneur en oxygène dissous doit être supérieure à 2 mg/l à la fin du test.
- Le pourcentage d'immobilisation dans les témoins doit être inférieur à 10%.
- La concentration effective qui induit l'immobilité de 50% des daphnies CE_{50} (24h) pour la substance de référence (Bichromate de potassium) doit être comprise entre 0,6 et 1,7 mg/l.

Selon la norme, la gamme de concentrations mesurées des substances toxiques dans le test aiguë est :

- Pour le Bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$): 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 et 1,6 mg/L.
- Pour le glyphosate: 0, 8, 10, 11, 12, 14, 16,18 mg/L.



Figure 23: Dispositifs expérimental de l'essai aiguë sur *Daphnia magna*

IV. 3 Test de toxicité chronique de *Daphnia magna*

La norme marocaine ISO 10706 (2014) a mis en place des tests d'écotoxicité pour la détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus, qui permet d'évaluer l'effet d'un toxique sur la reproduction et le taux de croissance chez la

population de l'espèce, sur une période de 21 jours d'exposition (Annexe 6-2). Les tests sont réalisés en utilisant des jeunes femelles de *Daphnia* âgées de moins de 24h.

On place les néonates individuellement dans des récipients en verre contenant 50 ml de l'eau d'élevage, de la nourriture et de la concentration de l'élément toxique désirée. Les daphnies sont nourries par une algue verte *Scenedesmus subspicatus* /jour/daphnie (10^7 cellules/daphnie/jour), et 50 µl de la nourriture synthétique chaque fois que les solutions sont renouvelées.

Pour chaque concentration, 10 répliquas sont réalisés en plus de témoin. Le milieu est renouvelé 3 fois par semaines pendant toute la durée du test. L'exposition se déroule sous un cycle jour/nuit avec une photopériode de 16 h.

Cependant la gamme de concentrations mesurées des substances utilisées dans le test chronique est : 0, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 mg/L.

Les paramètres exploités à partir de cet essai sont :

- Le taux de survie des animaux parents (les daphnies mères vivantes après 21 jours),
- Le jour de la première ponte,
- Le nombre total de descendants produit par animal parent,
- Le nombre de pontes par mère,

La survie, la croissance et la capacité reproductrice des parents exposés aux substances toxiques sont comparées à celles des témoins, afin de déterminer la concentration minimale avec effet observé (LOEC) et la concentration sans effet observé (NOEC) pour chaque paramètre.

La validité du test chronique dépend des critères suivants :

- La mortalité des animaux parents ne dépasse pas 20% à la fin de l'essai,
- Le nombre moyen de descendants produits par animal survivant à la fin de l'essai est ≥ 60 .

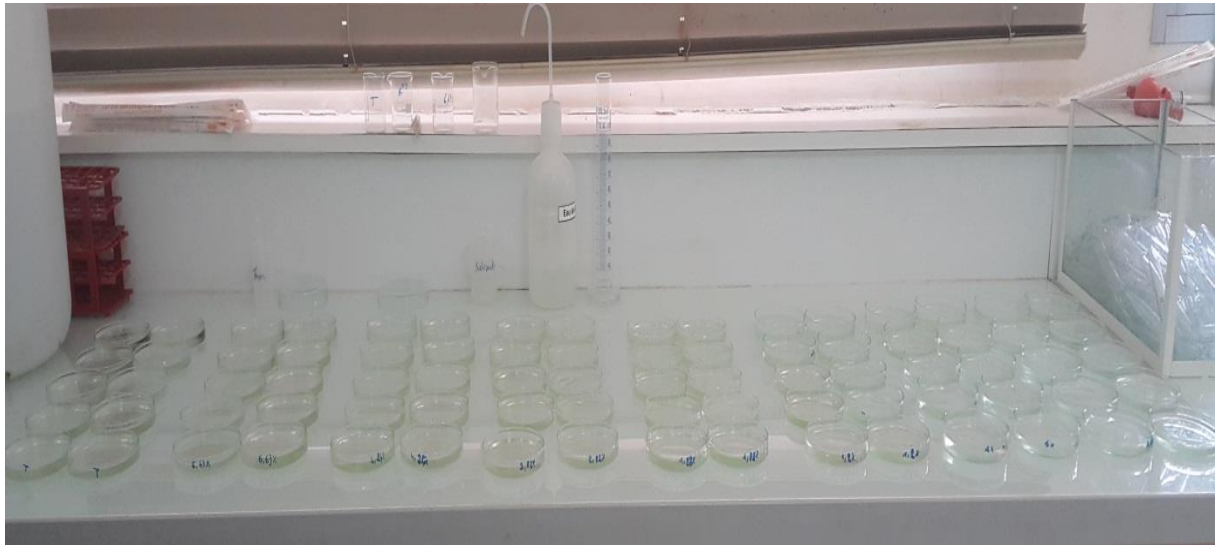


Figure 24: Dispositifs expérimental de test chronique sur *Daphnia magna*

6 Concentrations

Dix Répliques

Une Daphnie / Concentration / Témoin

10^7 cellules de *Scenedesmus subspicatus* / daphnie / jour

50 μ l de nourriture synthétique

N.B : Les daphnies sont incubées dans les mêmes conditions que celle pour les cultures mères (mêmes conditions d'élevage).

IV.4 Test de multigénération

L'introduction des pesticides dans les milieux aquatiques peut avoir des effets chroniques à la fois au niveau de l'individu et de la population entraînant probablement une perturbation de la santé de ces écosystèmes. Dans le test standard de la reproduction chez *Daphnia magna*, l'évaluation de la toxicité des substances chimiques se manifeste chez la population mais ils ne prennent pas en considération l'état de santé de la descendance. Le lancement d'un nouveau test de reproduction sur des individus de la deuxième génération serait nécessaire pour mieux approcher l'effet du toxique de la substance testée sur la population (Hammers-Wirtz et Ratte., 2000).

Pour cette raison, la toxicité chronique de l'herbicide glyphosate a été évaluée à travers cinq générations du crustacé. Les individus de la génération parentale (F0) et des générations descendants (F1, F2, F3, F4) sont exposés au glyphosate à des concentrations de 1,5 à 5,5 mg/L.

La génération parentale (F0) est obtenue par exposition de 10 néonates (<24h) par concentration de glyphosate et par témoin. On place les néonates individuellement dans des récipients en verre contenant 50 ml de l'eau d'élevage, de la nourriture et de la concentration de l'élément toxique désirée. Les daphnies sont nourries par une algue verte *Scenedesmus subspicatus* /jour/daphnie (10^7 cellules/daphnie/jour), et 50 µl de la nourriture synthétique chaque fois que les solutions sont renouvelées.

Pour chaque concentration, 10 répliquas sont réalisés en plus de témoin. Le milieu est renouvelé 3 fois par semaines pendant toute la durée du test. L'exposition se déroule sous un cycle jour/nuit avec une photopériode de 16 h.

Les populations des générations filles (F1, F2, F3, F4) sont obtenues à partir de la 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et de la 5^{ème} ponte des mères de la génération parentale (F0). La même démarche est réalisée pour les tests des générations filles. Pour la génération parentale F0, l'exposition dure 21 jours. Pour les générations filles le temps d'exposition est réduit à 14 jours.

La survie et la reproduction sont suivies pour mesurer les effets sur les différentes générations.

V. L'espèce *Danio rerio*

V.1 Condition de culture de l'espèce

L'élevage des poissons *Danio rerio* utilisées dans les tests est maintenu dans le laboratoire ONEE-branche eau accrédité conformément à la norme NF ISO 15088 (2007).



Figure 25: Salle d'élevage des poissons zèbres au sein du laboratoire ONEE

Dans le laboratoire des analyses écotoxicologiques de la direction de contrôle de la qualité des eaux, les conditions d'élevage sont les suivantes :

- **Eau d'élevage :** L'eau d'élevage doit avoir un pH de $7,8 \pm 0,2$, une dureté totale de 300 mg/L et une concentration en oxygène dissous supérieur à 90% de la saturation dans l'air. Dans notre laboratoire l'eau de culture est une eau déchlorée.
- **Température :** L'élevage se fait dans une salle à température contrôlée en mesure de fournir une température de $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.
- **Lumière :** L'éclairage au niveau de notre laboratoire est un éclairage naturel.
- **Alimentation :** Les poissons zèbres sont nourris quotidiennement avec une nourriture naturelle constituée de daphnies et une nourriture synthétique (1g/60poissons/jour).
- **Renouvellement :** Un système de différents types de filtres est utilisé pour éliminer les impuretés et maintenir la qualité de l'eau d'élevage. L'excès de la nourriture et les

déchets des poissons sont nettoyés chaque jour (Voir la norme ISO15088). Une fois par mois l'eau des aquariums des poissons zèbres est complètement renouvelée.

V.2 Conditionnement des poissons zèbres adultes pour les tests de toxicité

Les géniteurs mâles et femelles utilisés dans les essais sont stockés dans deux aquariums différents de 100 litres contenant de l'eau d'élevage à une température de $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, un pH de $7,8 \pm 0,2$, un rythme fixe lumière-obscurité 16/8h et une concentration en oxygène dissous supérieur à 80%.

Les poissons sont nourris quotidiennement jusqu'à 24h avant le début de l'essai, avec une nourriture vivante (*Daphnia magna*) et une nourriture commerciale sèche (Tetramin).

Selon les recommandations de la norme ISO 15088, le conditionnement des poissons utilisés dans les tests de toxicité a duré au minimum 12 jours avant le début de l'essai. Au bout de 2 semaines, les mâles ont un reflet doré profond et les femelles sont plus grandes distendues par des ovules.



Figure 26: Conditionnement des géniteurs

V.3 Reproduction des géniteurs

Les poissons zèbres adultes utilisés pour la reproduction suivent les critères suivants :

- âgés de 6 mois à 12 mois
- une longueur moyenne de 30 ± 5 mm
- un poids humide moyen égal à $0,3 \pm 0,1$ g

- un ratio de 2:1 (males : femelles)

L'aquarium de reproduction est rempli d'eau fraîche déchlorée d'une température de 27 °C. À l'intérieur du bac, on installe un récipient reposant au fond de chaque aquarium recouvert d'un grillage laissant aux poissons un espace de nage d'un volume d'environ 1 litre. Ce système permet aux œufs de tomber au fond du récipient et de les conserver de la prédation des géniteurs. Dans l'aquarium de reproduction, on ajoute les femelles le matin et les males le soir. On nourrit les poissons avec des daphnies.

Le frai est induit par la lumière du matin et s'achève après l'allumage des lumières. Les œufs de la ponte sont recueillis une demi-heure après l'éclairage de la pièce. Les œufs utilisés pour les tests de toxicité sont vivants et exempts d'anomalies.



Figure 27: Aquarium de reproduction des géniteurs

V.4 Test de toxicité aigüe et chronique

Dans cette étude, nous avons réalisé les tests aigus selon la NF ISO 15088 (2007) pour évaluer la toxicité à court terme du glyphosate (Annexe 6-3). C'est un test qui vise à déterminer la concentration provoquant la mortalité chez les embryons du poisson zèbre au bout de 48 heures d'exposition. Un embryon est considéré comme mort :

- Il est coagulé
- La queue n'est pas détachée du jaune
- Le rythme cardiaque n'est pas détectable

On place les œufs individuellement dans des tubes en verre contenant 2 mL de l'eau d'élevage et de la concentration de l'herbicide désirée. Pour chaque concentration, 10 répliquas sont réalisés en plus de témoin. L'essai se déroule dans un système statique (sans renouvellement) et sans apport de nourriture. L'exposition se déroule sous un cycle jour/nuit avec une photopériode de 16 h.

La validité de l'essai de toxicité aiguë dépend des critères suivants :

- La teneur en oxygène dissous doit être supérieure à 60% à la fin du test.
- Les concentrations de la substance d'essai sont stables tout au long de l'essai.
- La mortalité des poissons témoins ne dépasse pas 10 % par réservoir.
- La proportion de poissons témoins présentant un comportement anormal ne dépasse pas 10 % par réservoir.
- La CL_{50} sur 24 heures du produit chimique de référence ($K_2Cr_2O_7$) pour le stock de poissons était en accord raisonnable avec les résultats de l'étude.

Cependant la gamme de concentrations mesurées des substances toxiques dans le test aiguë est :

- Pour le Bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$): 120-156-203-264-343-446 mg/L.
- Pour le glyphosate: 0, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L.



Figure 28: Essai de toxicité aiguë des poissons zèbres en cours de réalisation

Ensuite, nous avons réalisé des tests d'exposition au glyphosate durant 10 jours selon la norme NF ISO 12890 (1989) (Annexe 6-4). Ce test vise à évaluer les effets létaux et sublétaux d'une substance chimique et déterminer ainsi la concentration minimale avec effet observé (LOEC), la concentration sans effet observé (NOEC) et la CE_x . Les paramètres déterminés à partir de cet essai sont:

- Le pourcentage de mortalité
- Le taux d'éclosion
- Le pourcentage de l'arrêt cardiaque
- Le pourcentage de poisson zèbre nageant
- Les malformations

Pour la réalisation des tests, on place 10 œufs dans des aquariums en verre contenant 5L de l'eau d'élevage et de la concentration du glyphosate testée. Les poissons sont nourris par une nourriture sèche après la disparition du sac vitellin chaque fois que les solutions sont renouvelées.

Pour chaque concentration, 3 répliquas sont réalisés en plus de témoin. Le milieu est renouvelé 2 fois par semaine pendant toute la durée du test. L'exposition se déroule sous un cycle jour/nuit avec une photopériode de 16 h. La gamme de concentrations mesurées du glyphosate est : 0, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L.

Pour évaluer la toxicité à long terme (30 jours après l'éclosion), des tests chroniques ont été réalisés selon les recommandations de la ligne directrice OCDE 210 (2013) (Annexe 6-5). Ces essais visent à déterminer l'effet toxique d'un produit chimique dissout dans l'eau. La réalisation de ces tests, nous permet de définir des concentrations importantes dans le domaine de l'évaluation de la toxicité d'une substance chimique (NOEC, LOEC, EC_{10} , EC_{50}). Les paramètres déterminés à partir de cet essai sont les mêmes décrites pour l'exposition de 10 jours au glyphosate.

Pour la réalisation des tests chroniques, on place 10 œufs dans des aquariums en verre contenant 5L de l'eau d'élevage et de la concentration du glyphosate. Les poissons sont nourris par une nourriture sèche après 3 jours d'éclosion chaque fois que les solutions sont renouvelées.

Pour chaque concentration, 3 répliquas sont réalisés en plus de témoin. Le milieu est renouvelé 2 fois par semaine pendant toute la durée du test. L'exposition se déroule sous un

cycle jour/nuit avec une photopériode de 16 h. La gamme de concentrations mesurées du glyphosate utilisés dans cet essai est : 0, 1, 2, 3, 4 mg/L.

Pour la validité des tests chroniques, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

- la concentration d'oxygène dissous doit être $> 60\%$ tout au long de l'essai ;
- la température de l'eau ne doit varier de plus de $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ entre les différentes enceintes expérimentales ou entre deux jours consécutifs ;
- le dosage analytique des concentrations expérimentales est obligatoire ;
- le taux de survie des œufs fécondés dans les groupes témoins doit être supérieur ou égal 70% à l'éclosion et 75% après éclosion.



Figure 29: Essai chronique des poissons zèbres en cours de réalisation

VI. ANALYSE STATISTIQUE

Pour l'analyse statistique des résultats obtenus de cette étude, nous avons utilisé trois programmes statistiques :

- Le logiciel Microsoft Excel : Pour effectuer plusieurs représentations graphiques en se basant sur les résultats des enquêtes effectués dans la région de Rabat-Salé-Kénitra concernant l'utilisation des pesticides et notamment le glyphosate.
- Le logiciel Probit (PROBIT version 1.5, USEPA, OH, USA) a été utilisé pour déterminer des concentrations importantes dans l'évaluation de la toxicité d'un produit chimique :
 - CE₅₀ désigne la concentration de la substance chimique qui cause la mortalité de 50 % des organismes durant une période d'exposition définie.
 - CE₁₀ est la concentration de la substance chimique qui cause la mortalité de 10 % des organismes durant une période d'exposition définie.

Probit est un modèle de régression où la variable expliquée est quantitative. Cette méthode statistique est très utilisée car elle permet la modélisation des variables binaires ou la somme de ces variables. Elle est très utilisée en sociologie, en épidémiologie, en finance pour la modélisation de risques (scoring), en marketing quantitatif (achat ou non de services ou de produits suite à une action) et dans le domaine médical (guérison ou non d'un patient) (Manar, 2008).

- Le logiciel Statistica (STATISTICA version 6 pour Windows, Statsoft, Tulsa, OK, USA) a été utilisé pour une interprétation statistique des résultats obtenus lors de cette étude. Ce logiciel détermine deux concentrations permettant de quantifier l'effet chronique de la substance chimique testée : la NOEC et la LOEC.

La détermination des différences significatives entre les groupes contrôles et les différentes concentrations du glyphosate testées varie selon les données. Si les conditions sont remplies, on utilise un test paramétrique, ANOVA à un seul facteur, suivi par le test post hoc de Dunnett. Par contre si l'une des conditions n'est pas établie, on utilise un test non paramétrique, le test de Kruskal-Wallis suivi par le test U de Mann-Whitney. La signification statistique est établie à $p < 0,05$.

La comparaison entre les différentes générations (FO, F1, F2, F3, F4) est effectuée par le test exact de Fisher (unilatéral $P < 0,05$).

RESULTATS

Partie III

RESULTATS

Présentation générale des travaux

L'ensemble des travaux entrepris dans cette étude avait comme but l'évaluation de l'effet chronique du glyphosate sur le milieu aquatique en utilisant comme modèles biologiques *Daphnia magna* et *Danio rerio* et la définition du mode d'utilisation des pesticides surtout le glyphosate dans la région Rabat-Salé-Kénitra.

Ce travail comporte quatre parties :

I- ENQUÊTE SUR L'UTILISATION DES PESTICIDES ET DU GLYPHOSATE DANS LA RÉGION DE RABAT-SALÉ-KÉNITRA

- Définition du mode d'utilisation des différents pesticides dans la région étudiée.
- Utilisation massive du glyphosate dans la zone étudiée.
- Prédominance de la forme sel d'isopropylamine.

II- EFFET DU GLYPHOSATE SUR LA GENERATION PARENTALE ET QUATRE GENERATIONS SUCCESSIVES de *DAPHNIA MAGNA*

- Evaluation de la toxicité aiguë et chronique de l'herbicide glyphosate (480/L) sur la survie et la reproduction de *Daphnia magna*, une espèce recommandée par la norme ISO comme étant une espèce clé représentatif du milieu aquatique. Des concentrations de toxicité importantes telles que la NOEC et la LOEC relatives à la survie et à la reproduction sont dérivées de ce travail et proposées pour pallier au manque de données chroniques pour l'évaluation du risque relatif au glyphosate.

- Evaluation de la toxicité chronique sur quatre générations successives de l'organisme test : La génération parentale (F0) et quatre populations filles (F1, F2, F3, F4) sont exposée à différentes concentrations de glyphosate. Pour la génération parentale F0, l'exposition dure 21 jours. Pour les générations filles le temps d'exposition est réduit à 14 jours.

III- TOXICITE AIGUE ET CHRONIQUE DU GLYPHOSATE SUR *DANIO RERIO*

- Evaluation de la toxicité aiguë subchronique et chronique du glyphosate (480g/L) sur la survie, le taux d'éclosion, le rythme cardiaque et la nage du modèle biologique *Danio rerio*.

Cette étude a mis en action la présence d'une nouvelle malformation (absence de nageoire) et déterminer des concentrations importantes pour l'évaluation de la toxicité aquatique du glyphosate.

IV- TOXICITE CHRONIQUE DU GLYPHOSATE CHEZ *DAPHNIA MAGNA* ET *DANIO RERIO* : ETUDE COMPARATIVE

- Utilisation des deux modèles (test de *Daphnia magna* 21j et test de *Danio rerio* 30j) pour l'évaluation de la toxicité chronique du glyphosate. Le but de cette partie étant la comparaison de la sensibilité de ces deux espèces envers ce produit phytosanitaire.

I-ENQUÊTE SUR L'UTILISATION DES PESTICIDES ET DU GLYPHOSATE DANS LA RÉGION DE RABAT-SALÉ-KÉNITRA

(Survey on the use of pesticides and glyphosate in the region of Rabat-Salé-Kénitra)

L'objectif de cette partie d'étude consiste à évaluer le mode d'utilisation des pesticides surtout l'herbicide glyphosate par les agriculteurs de la région Rabat-Salé-Kénitra à l'aide de 70 fiches questionnaires.

L'analyse des résultats a montré que les herbicides prennent la 1^{ère} classe en usage des pesticides dans la zone d'étude avec 36%. En effet, les agriculteurs utilisent ces produits phytosanitaires pour lutter contre les plantes adventices monocotylédones et dicotylédones. Les insecticides viennent au second ordre, ils sont utilisés par 33% des agriculteurs interrogés. Ces produits chimiques sont utilisés pour lutter surtout contre des insectes de la mineuse et la mouche blanche. La 3^{ème} position appartient aux fongicides avec 31%. Les agricultures les utilisent principalement pour lutter contre les champignons de l'oïdium, mildiou et la rouille jaune et brune.

Dans la région Rabat-Salé-Kénitra, les résultats que le glyphosate est l'herbicide le plus utilisé par les agriculteurs (50%). L'usage massif de cet herbicide peut être expliqué par l'efficacité de ce produit agricole contre les plantes adventices monocotylédones et dicotylédones.

De plus, 45% des agriculteurs utilisent le glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine à cause de sa forte solubilité dans l'eau. Les sels d'ammonium viennent au second ordre, ils sont utilisés par 35% des agriculteurs interrogés. Pour la forme sel de potassium, son usage est de 20%.



Figure 30: Exemples de pesticides utilisés dans la région d'étude

Survey on the use of pesticides and glyphosate in the Region of Rabat-Salé-Kénitra

El Joumani H.*¹, El Alami M.² and Naciri M.¹

¹Laboratory of Biodiversity, Ecology and Genome, Faculty of Sciences, Mohamed V University, Rabat, Morocco.

²Laboratory of Hydro-biological Bacteriological analyzes and Ecotoxicology, National Office of Electricity and Drinking Water (ONEE), Rabat, Morocco.

*hind.eljoumani@gmail.com

Abstract

In this study, a survey was conducted among farmers in order to evaluate the use of pesticides (herbicides, fungicides and insecticides) in a general way and the use of glyphosate in a specific way. In order to achieve this goal, we conducted a field survey using 70 questionnaires that allowed us to collect as much information as possible about the use of pesticides in the Rabat-Salé-Kénitra region. A computer processing using Microsoft Office Excel 2007, allowed us to highlight the different groups of pesticides used and the most used form of glyphosate in the studied region.

Keywords: Survey-pesticide- glyphosate-use-Rabat.

Introduction

Currently, the immediate response to the increasing demand of food production is the massive use of agrochemicals to ensure high crop yields. To achieve these objectives, pesticides have been widely used to protect crops from different pests³.

In the last decade, glyphosate-based herbicides are the most widely used in the world². Because of its non-selective nature, this herbicide is used in different crops (corn, cotton, cereals, legumes) as well as in pastures, forestry, vegetation control on industrial lands and for domestic maintenance^{3, 6, 10,16,28,30}. Studies have reported toxic effects of glyphosates on invertebrates and vertebrates in aquatic environments^{8, 11}.

However, the intensive use of pesticides has shown serious environmental consequences inherent to their misuse and irrational management. It has been estimated that less than 0.1% of pesticides used on different crops achieve their specific objectives, leaving large amounts of toxic waste free to move into different environmental compartments^{5, 20}.

Human health and the environment can therefore be directly affected by the residues of these plant protection products. These chemicals accumulate in the environment and contaminate water and soil sources and influence the biodiversity hosting these ecosystems^{25, 29}.

According to the statistics of the Office of Foreign Exchange, imports of phytosanitary products in Morocco have not stopped increasing since 2005⁹. This use reached more than 1.6 million tons in 2020²².

Agricultural activity is the main driver of the economy of the Rabat-Salé-Kénitra region. The region holds 12% of the country's useful agricultural area with 1,019,369 ha. Thanks to the extent of its

cultivable land and its relatively favorable climate, this region is among the most important agricultural regions of the Kingdom. The contribution of the region to the cereal production represents about 15% of the national production exceeding 15 million quintals.

The objective of our study is to evaluate the use of pesticides, especially the herbicide glyphosate, by farmers in the Rabat-Salé-Kénitra region. In order to achieve this goal, we conducted a field survey using 70 questionnaires that allowed us to collect as much information as possible about the use of pesticides in this region.

Materials and methods

Survey points: Despite the difficulties encountered during our surveys, we were able to gather as much information as possible on the use of pesticides by farmers in the Rabat-Salé-Kénitra region. The choice of these study points is based on the high density of agricultural production.

Survey points:

- | | |
|--------------|-----------------------|
| 1-Ain aouda | 8- Dzira |
| 2- Rommani | 9- Wade zayane |
| 3- El Oulja | 10-Wlade laarbi |
| 4- Sehoul | 11- Mnassera |
| 5- Dar sekka | 12- Sidi Alal Tazi |
| 6- Safae | 13- Kammouni |
| 7-Nkhakhsa | 14- Moulay bousselham |

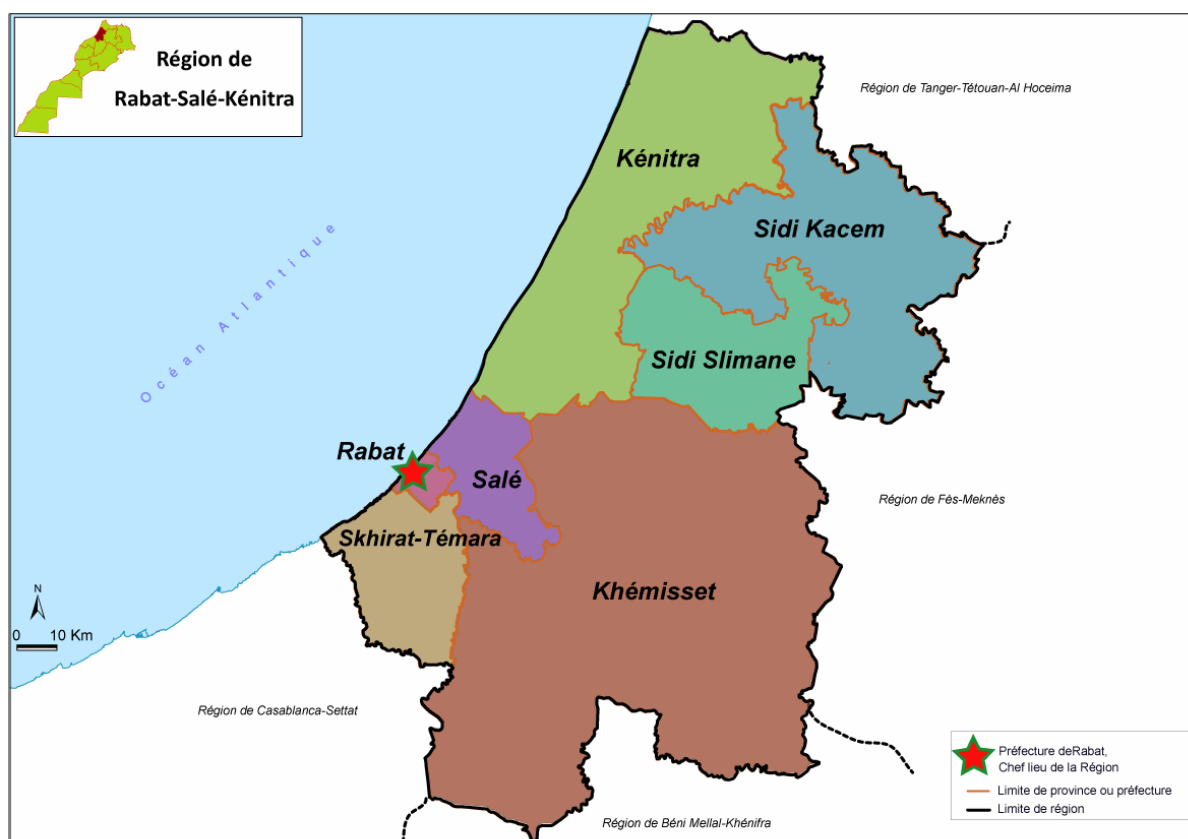


Figure 1 : Study region

Questionnaire sheet and informant type: In order to make our results more meaningful, our surveys were conducted using 70 questionnaire sheets during 2019.

Our questionnaire form includes the serial number, the date, a part concerning the informant's profile namely his level of study and his monthly income. Another part concerning the pesticide namely the type used, the dose used, the type of disease.

During our surveys, we tried to question several types of informants:

- Farmers who have inherited their agricultural knowledge from their parents.
- Agricultural engineers who have received scientific training.
- Local vendors because some farmers could not remember the names of the pesticides used.

Computer processing using Microsoft Office Excel 2007, allowed us to analyze the data collected during our surveys in the city of Rabat-Salé-Kénitra.

RESULTS AND DISCUSSION

Classification of pesticides by use in the Rabat-Salé-Kénitra region: Figure 2 shows that herbicides take the 1st class in pesticide use in the study area with 36%. Indeed, farmers use these plant protection products to control monocotyledonous and dicotyledonous weeds. Insecticides come in second order, being used by 33% of the farmers interviewed. These chemicals are used to control mainly insects such as leafminer and whitefly. The third position belongs to fungicides with 31%. Farmers use them mainly to control powdery mildew, downy mildew and yellow and brown rust.

In the study area, pesticides are used in a random manner (Figure 4). Indeed, 42% of the farmers do not respect the prescribed doses. This can be explained by the ignorance of the farmer due to his level of education (62% illiterate) (Figure 3) and the purchase of outdated local pesticides that are not effective. In Morocco, the problem of the use of anti-banding products has been mentioned in several studies. This leads to adverse consequences on agriculture, economy, human health and environment⁹. Moreover, 42% of farmers respect the prescribed dose advised by the seller.

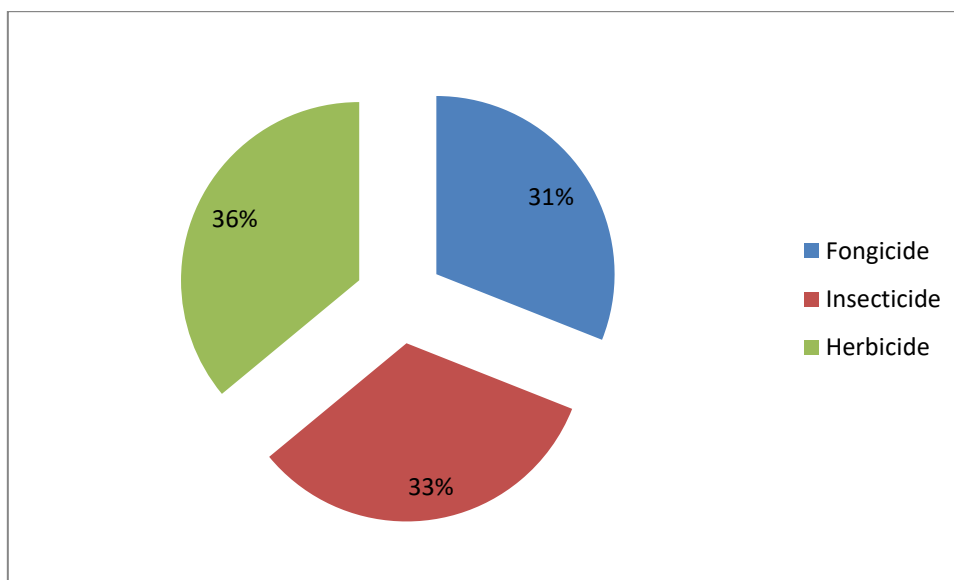


Figure 2: Distribution of pesticide use in the study area

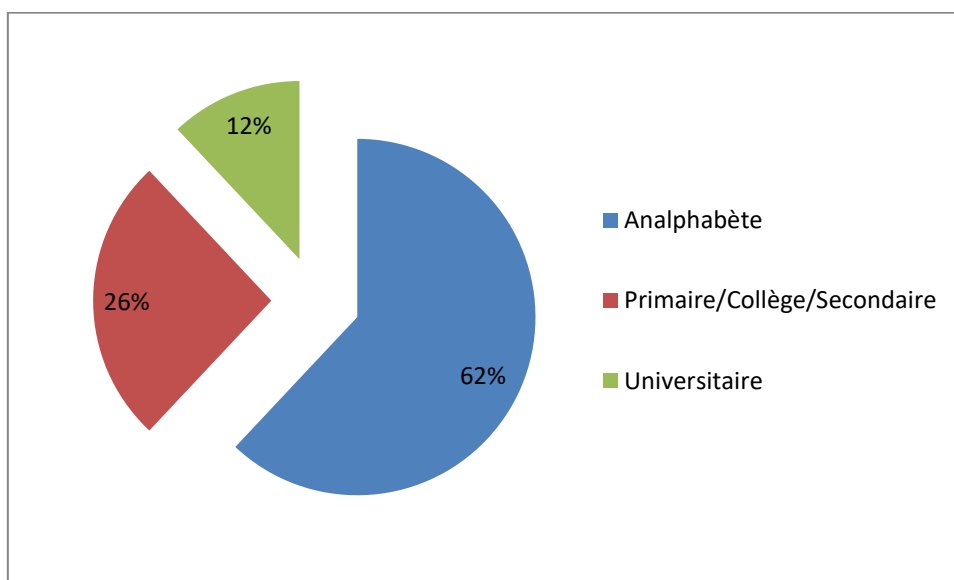


Figure 3: The level of training of the farmer

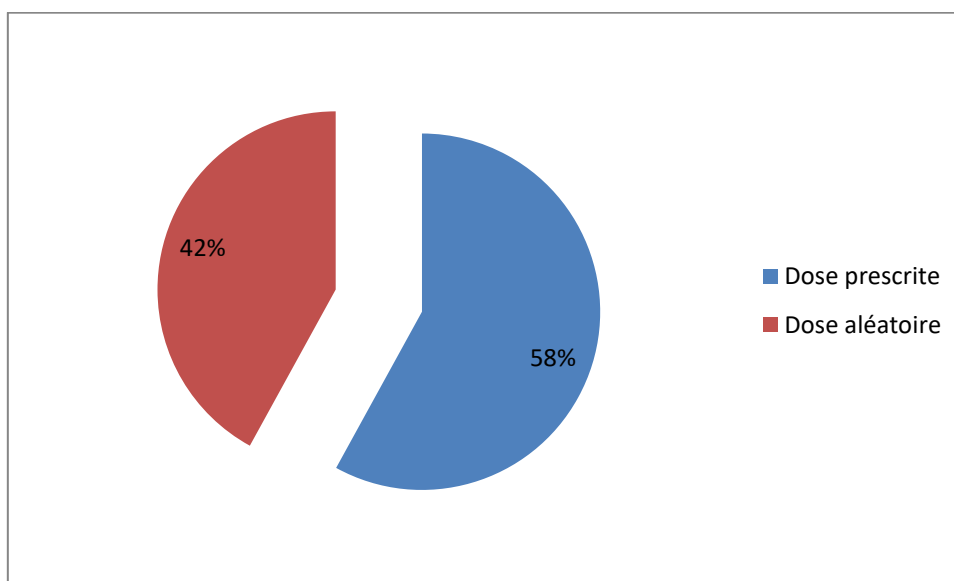


Figure 4: Use of pesticides according to the dose by the farmer

Classification of glyphosate according to the form used in the Rabat-Salé-Kénitra region: For the Rabat-Salé-Kénitra region, the analysis of the results showed that the most used pesticides are herbicides. Glyphosate is a plant protection product used as a herbicide. Depending on its specific use, it can be found in pure form or as an ammonium salt, potassium salt or isopropylamine salt. Figure 5 shows the predominance of glyphosate use in the study area with 50%. The massive use of this herbicide can be explained by the effectiveness of this agricultural product against monocotyledonous and dicotyledonous weeds.

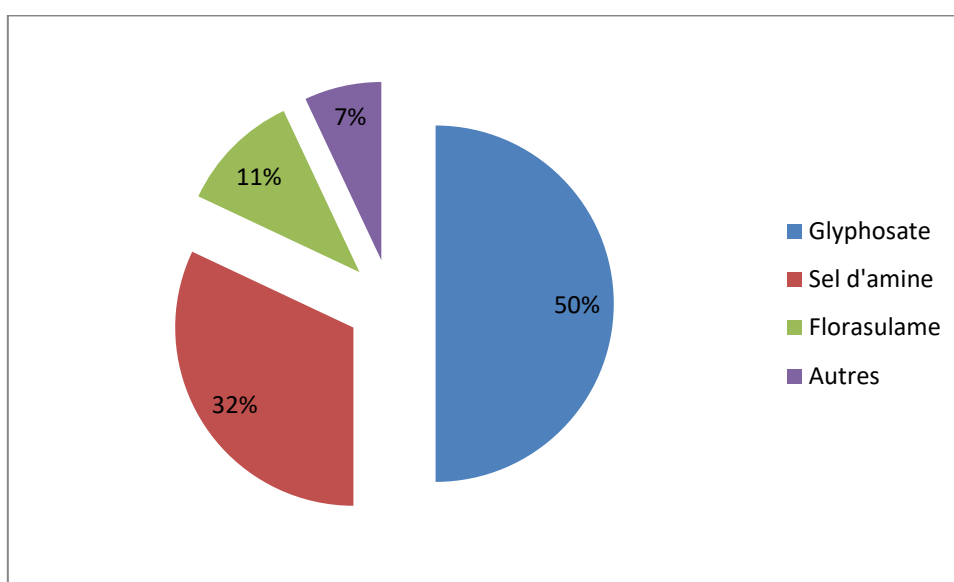


Figure 5: Most commonly used herbicides in the study area

Figure 6 shows that 45% of farmers use glyphosate in the form of isopropylamine salt. This can be explained by the high solubility of this form in water. Ammonium salts are the second most used form, used by 35% of the farmers surveyed. For the potassium salt form, its use is 20%.

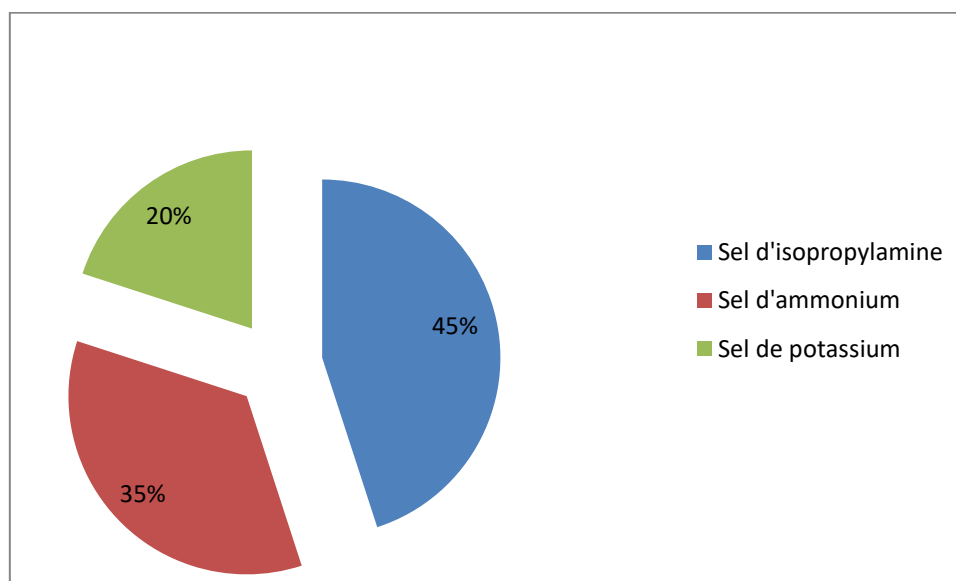


Figure 6: Use of glyphosate according to the form used in the study area

The majority of the farmers interviewed in our surveys do not know the exact way of using pesticides and the precautions to take when handling these chemicals. The high rate of illiteracy among this population (62%), combined with a lack of awareness, could be the cause of the lack of consideration of the precautionary use of these phytosanitary products, which threatens the sustainability of agriculture in the Rabat-Salé-Kénitra region. The failure of farmers to respect the prescribed dose for each pesticide favors the development of resistant populations of pests²⁶. Pesticides will become less and less effective which will push farmers to put an additional amount.

Several studies have reported acute toxic effects to humans from pesticide exposure that can take many forms. The symptoms most often described are lesions, irritation, headaches, nausea, vomiting, fatigue, dizziness, neurological disorders, loss of appetite²³, illnesses including cancer, reproductive effects, endocrine, immune and neurological disruption¹³.

These irrational practices constitute a real danger for the environment. Moreover, the presence of these substances in aquatic environments is possible under the influence of precipitation and leaching. Aquatic species may be susceptible to the cumulative effects of mixtures of the quantities of free toxic waste found in water²⁰. Taking the herbicide glyphosate as an example, several studies have shown that this pesticide has been detected in either natural surface or groundwater from several countries^{14, 15, 18, 31}. Furthermore, adverse effects of glyphosate have been observed in living organisms at different levels of the trophic chain (bacteria, algae, crustaceans, amphibians and fish)^{1,7,12,24,27}. This pesticide can inhibit specific enzymes in invertebrates such as phosphoenolpyruvate³², phosphatase²¹ and can also alter the expression of stress-responsive genes¹⁷. Its exposure can cause oxidative stress, inhibition of acetylcholinesterase and increases susceptibility to parasitic infections¹.

In France, a study by Morilon¹⁹ found that education level plays an important role in knowledge of pesticide use instructions. The higher the level of study the farmer has, the higher the handling knowledge regarding these chemicals. These farmers are more aware of the danger of these agricultural products and therefore pay special attention to the precautions to be taken when using them.

In addition, the results showed that some local vendors may sell counterfeit outdated pesticides to farmers, which increases the danger of these products on the environment.

Finally, massive use of pesticides due to lack of information, training, sufficient coordination between the concerned ministry and farmers, regulations and controls regarding the proper use of these products are factors that could harm the quality of aquatic ecosystems. This constitutes a serious threat to the biodiversity hosting the Rabat-Salé-Kénitra region as well as to human health.

Conclusion

At the end of this study in the region of Rabat-Salé- Kenitra and after the analysis of the information obtained during the surveys, we have gathered the maximum of information on the use of pesticides in the studied region.

According to our field studies and with the help of 70 questionnaires, we found that herbicides take the 1st position in the use in the study area with 36%.

The analysis of the results obtained revealed that 50% of the farmers use glyphosate as an active ingredient to destroy the weeds that threaten their crops. It is also noted that glyphosate in the form of isopropylamine salt is the most used in the study area with 45%. This can be explained by its high solubility in water.

This study carried out in the region of Rabat-Salé-Kénitra, allowed us to note that glyphosate is still used by the farmers of the study area in spite of the great international problematic concerning the carcinogenic risk of its active principle on the human health.

Reference

1. Annett R., Habibi H.R. and Hontela A.H., Impact of glyphosate and glyphosate based herbicides on the freshwater environment, *J. Appl. Toxicol.*, **34**(5), 458-479 (2014)
2. Baylis A. D., Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects, *Pest. Manag. Sci.*, **56**, 299-308 (2000)
3. Benbrook C. M., Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally, *Enviro. Sci Eur.*, **28**(1), 3 (2016)
4. Carvalho F.P., Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Pol.*, **9**, 685– 692 (2006)
5. Cattani D., Oliveira D. L., Cavalli V.L., Heinz Rieg C.E., Domingues J.T., Dal-Cim T., Tasca C.I., Mena F.R. , Barreto Si and Zamoner A., Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity, *Toxicology*, **320**, 34-45 (2014)
6. Cox C., Herbicide factsheet Glyphosate, *Jour. Pest. Ref.*, **24**(4), 10-15 (2004)
7. Cuhra M., Traavik T. and Bohn T., Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*, *Ecotoxicology*, **22**(2), 251-262 (2012)
8. Díaz-Martín R. D. , Valencia-Hernandez J. D. , Betancourt-Lozano M. and Yanez-Rivera B., Changes in microtubule stability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after glyphosate exposure, *Heliyon* , **7**(1), e06027 (2021)
9. El Ouilani B., Article sur le marché des produits phytosanitaires au Maroc, (2011) Accessible <http://www.abhatoo.net.ma/maalama-textuelle/developpement-economique-et->

social/developpement-economique/agriculture/ technique-culturelle/article-sur-le-marche-des-produits-phytosanitaires-au-maroc

10. Environmental Protection Agency (EPA) : Facts. Glyphosate. Washington, D. C. États-Unis, **(1993)** Accessible www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-417300_1-Sep-93.pdf.
11. Faria M., Bedrossiantz J., Ramírez J. R. R. , Mayol M. , García G. H. , Bellot M., Prats E. , Garcia-Reyero N. , Gómez-Canela C. , Gómez-Oliván L. M. and Raldúa D. , Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety, *Environ. Int.*, **146**, 106253 **(2021)**
12. Folmar L.C., Sanders H.O. and Julin A.M., Archives of Environmental Contamination and Toxicology Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates, *Arch. Environ. Contain., Toxicol.*, **8**, 269-278 **(1979)**
13. Giroux I., La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec. Québec, ministère de l'Environnement du Québec, **(2004)**
14. Giroux I., Présence de pesticides dans l'eau du Québec-Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya 2011 à 2014, Ministère du Développement durable de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques Québec, **(2015)**
15. Horth H., Survey of glyphosate and AMPA in groundwaters and surface waters in Europe. Monsanto Europe, **(2012)**
16. Jaskulski D. and Jaskulska I., The effect of pre-harvest glyphosate application on grain quality and volunteer winter wheat, *Romanian Agricultural Research*, **31**, 283-289 **(2014)**
17. Le T.H., Lim E.S., Lee S.K., Choi Y.W., Kim Y.H. and Min J., Effects of glyphosate and methidathion on the expression of the Dhb, Vtg, Arnt, CYP4 and CYP314 in *Daphnia magna*, *Chemosphere*, **79(1)**, 67-71 **(2010)**
18. Majewski M. S., Coupe R.H., Foreman W.T. and Capel P.D, Pesticides in Mississippi air and rain: A comparison between 1995 and 2007, *Environ. Toxicol. Chem*, **33(6)**, 1283-1293 **(2014)**
19. Morillon A., Les risques liés à l'utilisation des pesticides: Enquête auprès des agriculteurs du Poitou- Charentes. Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en pharmacie, **(2016)**
20. Nguyen, M.H., T.H.N. Nguyen, I.C. Hwang, C.B. Bui and H.J. Park : Effects of the physical state of nanocarriers on their penetration into the root and upward transportation to the stem of soybean plants using confocal laser scanning microscopy. *Crop Protection*, **87**, 25-30 (2016).
21. Ørsted M. and Roslev P., A fluorescence-based hydrolytic enzyme activity assay for quantifying toxic effects of Roundup® to *Daphnia magna*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **34(8)**, 1841-50 **(2015)**
22. PCN, Plan Cadre National pour les MCPD. Plan sectoriel «agriculture et alimentation durables» Maroc, **(2016)**
23. Regnault-Roger C., Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, *Sc. Appl. Ecol.*, **14**, 115–125 **(2005)**
24. Reno U., Doyle S.R., Momo F.R., Regalado L. and Gagneten A.M., Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species , *Ecotoxicologie*, **27(7)**, 784-793 **(2018)**
25. Sabatier R., Meyer K., Wiegand K. and Clough Y., Non-linear effects of pesticide application on biodiversity-driven ecosystem services and disservices in a cacao agroecosystem: a modelling study, *Basic Appl. Ecol.*, **14**, 115–125 **(2013)**

26. SAgE pesticides, Utilisation rationnelle et sécuritaire des pesticides. In SAgE pesticides. Site de SAgE pesticides, **(2011)** Accessible <http://www.sagepesticides.qc.ca/Infos/UtilisationRationnelle.aspx>
27. Sihtmäe M., Blinova I., Kunnis-Beres K., Kanarbik L., M. Heinlaan M. and Kahru A., Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations, *Applied Soil Ecology*, **72**, 215-224 **(2013)**
28. Soltani N. , Blackshaw R.E. , Gulden R.H., Gillard C.L. , Shropshire C., Sikkema P.H., Desiccation in dry edible beans with various herbicides, *Canadian Journal of Plant Science*, **93(5)**, 871-877 **(2013)**
29. Syberg K., Backhaus T., Banta G., Bruce P., Gustavsson M., Munns Jr., W.R., Rämö R., Selck H. and Gunnarsson J., Toward a conceptual approach for assessing risks from chemical mixtures and other stressors to coastal ecosystem services, *Integr. Environ. Assess. Manag.*, **13**, 376–386 **(2016)**
30. Tomlin C. D. S., The pesticide manual: A world compendium (14e édition), Hampshire, British Crop Protection Council, **(2009)**
31. Trudeau V. Rondeau M. and Simard A., Pesticides aux embouchures de tributaires du lac Saint-Pierre (2003-2008), Environnement Canada, Direction des sciences et de la technologie de l'eau, **(2011)**
32. Tu M., Hurd C. and Randall J.M., Weed Control Methods Handbook: Tools and Techniques for Use in Natural Areas, The Nature Conservancy, **(2001)**

II-EFFET DU GLYPHOSATE SUR LA GENERATION PARENTALE ET QUATRE GENERATIONS SUCCESSIVES de DAPHNIA MAGNA

(Effect of glyphosate on the generation parent and four successive generations to *Daphnia magna*)

Cette partie de l'étude a pour but d'évaluer l'effet toxique de l'herbicide glyphosate sur les invertébrés aquatiques d'eau douce, en utilisant comme modèle biologique *Daphnia magna*, dans des conditions d'expositions s'approchant de l'environnement. Le choix de ce cladocère a été favorisé par son rôle dans la chaîne trophique (consommateur primaire), sa sensibilité et sa représentativité de la faune aquatique (norme ISO). Ces caractéristiques et son cycle de vie assez court ont permis de suivre l'effet du produit testé sur plusieurs générations. Nous avons évalué la toxicité aiguë et chronique du glyphosate sur *Daphnia magna*. La survie et la reproduction ont été définies dans le test chronique et le test de multi générations.

La toxicité aiguë a été évaluée durant 24 et 48 heures. Le temps d'exposition influence la toxicité du glyphosate vis-à-vis *Daphnia magna*, on a observé que les concentrations mesurées induisant l'immobilisation de 50% des daphnies sont de 9.53 (7,16-10,96) mg/L après 24 h et de 8.61 (7,62-9,30) mg/L après 48h. Lors du test chronique, *Daphnia magna* a été exposée à la gamme des concentrations de glyphosate suivantes (0, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 mg/L) durant 21 jours. Il apparaît que l'exposition chronique de l'herbicide a un effet toxique sur la survie et la reproduction de l'espèce étudiée. Des effets significatifs sur les deux fonctions physiologiques ont été observés dès la concentration 3.5 mg/L. Cet effet toxique dépend de la dose et du temps d'exposition. En effet, le pourcentage d'inhibition augmente significativement, avec l'accroissement des concentrations de glyphosate, jusqu'à atteindre 100% pour la concentration maximale 5,5 mg/L. Les mères sont mortes massivement au cours des 6 derniers jours d'exposition pour cette concentration.

Ainsi, une diminution significative de la fécondité a été observée à partir de la concentration 3,5 mg/L. Cette réduction est marquée par une diminution significative du nombre de petits produits par mères et le nombre de pontes pour les concentrations 3,5, 4,5, 5,5 mg/L. Une diminution significative de la taille de ponte est observée aux deux concentrations maximales 4,5 et 5,5 mg/L.

La concentration en glyphosate testée sans effet significatif (NOEC) sur tous les paramètres étudiés chez *Daphnia magna* après 21 jours d'exposition, par comparaison aux témoins est de

1.5 mg/L. Le paramètre le plus sensible dans la reproduction est le nombre de ponte. La EC_{10} 21j pour ce paramètre est de 2,30 (0,33-3,13) mg/L.

L'introduction des pesticides dans les milieux aquatiques peut avoir des effets chroniques à la fois au niveau de l'individu et de la population entraînant probablement une perturbation de la santé de ces écosystèmes. Nos résultats soulignent l'intérêt de l'utilisation des tests multigénérations dans l'étude des effets à long terme de ces substance sur une espèce clé d'eau douce *Daphnia magna*. Dans cette étude, l'analyse des résultats a montré que le glyphosate affecte la survie et la reproduction du l'organisme teste. Le temps d'exposition et la dose du pesticide augmente la toxicité du glyphosate vis-à-vis *Daphnia magna*.

En comparant avec la génération F0, les résultats montrent que la survie a été plus affectée dans les générations filles que dans la génération parentale. En effet, la survie diminue de façon significative ($p \leq 0,05$) à partir de 1,5 mg/L pour les générations filles F2, F3 et F4. Cet effet est plus accentué pour la concentration maximale 5,5 mg/L, le pourcentage de la survie diminue jusqu'à atteindre 0% pour les générations F2, F3, F4. Pour la génération fille F1, la survie est similaire avec la génération parental F0.

La différence du paramètre de la reproduction entre la génération parentale et les générations filles est significative à partir de la concentration 1,5 mg/L. La diminution de la reproduction (nombre de petits par femelle) est similaire entre la génération F0 et les deux générations F1 et F2 pour la concentration maximale (5,5 mg/L). En comparant avec les contrôles, cette diminution devient toutefois significative à partir de 3,5 mg/L pour les parents F0 et à partir de 1,5 mg/L pour les descendants F1, F2, F3, F4. La reproduction est totalement arrêtée aux fortes concentrations pour les générations F3 (dès la concentration 4,5 mg/L) et F4 (dès la concentration 2,5 mg/L). Après 14 jours d'exposition à l'herbicide, les résultats obtenus montrent qu'une courte période (deux semaines) est déjà indicative des effets toxiques chroniques du glyphosate dans les différentes générations. Les effets observés du glyphosate sur les descendants révèlent que les quatres générations filles F1, F2, F3 et F4 sont plus sensibles que la génération parentale F0. L'effet toxique du glyphosate est plus prononcé chez la génération fille F4 que chez la génération parentale F0.

L'analyse des résultats obtenues des tests aigues, nous a permis de définir le degré de toxicité du glyphosate vis à vis *Daphnia magna*. Selon la classification Persoone et al., 2003, la toxicité à court terme du glyphosate appartient à la 4^{ème} classe et présente une forte toxicité pour l'espèce étudiée (TU-24h= 10,49 et TU-48h= 11.61).

Ce travail a permis de dégager une valeur chronique pour les invertébrés de l'eau douce

(EC₁₀ 21j de 2,30 (0,33-3,13) mg/L) qui peut être utilisé pour l'affinement des valeurs guides pour la protection de la vie aquatique.

En se basant sur la réglementation européenne, on a pu obtenir une PNEC (predicted no effect concentration) de 15 µg/L en appliquant un facteur de sécurité de 100 sur la NOEC reproduction (1,5 mg/L). Une valeur plus protectrice de 3,3 µg/L a été obtenue en se basant sur la limite inférieure de la EC₁₀ 21j.

En comparant cette valeur avec celle exigée par l'agence national de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail 2019 (PNEC = 60 µg/L), la valeur de cette présente étude peut être intégrée pour réduire la PNEC préconisée par cette agence en France.

Effect of glyphosate on the generation parent and four successive generations to *Daphnia magna*

El Joumani H.*¹, El Alami M.² Naciri M.¹

¹Laboratory of Biodiversity Environment and Genome University Mohamed V Faculty of Science, Avenue Ibn Batouta, BP 1014, Rabat Morocco *e-mail: hind.eljoumani@gmail.com

²Laboratory of Hydro-biological Bacteriological analyzes and Ecotoxicology Office National of Electricity and Drinking water (ONEE), Avenue Belhassan El ouazzani BP.Chellah 10002, Rabat Morocco

Abstract

This present study focuses on assessing the toxicity of glyphosate on *Daphnia magna*. The first part of this work was devoted to evaluate the acute and chronic toxicity of the herbicide studied according to the Moroccan standards ISO 6341 and ISO 100706. Analysis of the test results revealed that glyphosate is toxic to *D. magna*. This effect is marked by short-term responses at high concentrations, immobility of juveniles (24h), and chronic disturbances (21d) on the growth and reproduction of this species. Then, the second part was dedicated to evaluating the toxicity of glyphosate over four successive generations from the F0 mother generation to the F4 daughter generation. The results show that the toxic effect of glyphosate was more pronounced in the F4 daughter generation than in the F0 parent generation.

Keywords: *D. magna*- acute toxicity- chronic toxicity-four successive generations.

1. Introduction

Pesticides are introduced by humans into the environment through different industries (chemical, agrochemical) to increase agricultural production and achieve global food sufficiency. Given its status as a final receptacle, the aquatic environment includes the ecosystems most affected, either directly or indirectly, by the harmful effects of these substances^{14, 25}.

Over the past decade, glyphosate-based pesticides have been the most widely used agricultural chemicals on earth². Since the introduction of genetically modified seeds in 1996,

the global use of pesticides has increased almost 15-fold amounting to 826,000 tons³. Due to its non-selective nature, it is used in a variety of crops such as corn, cotton, soybeans, cereals, legumes as well as in pasture, forestry, vegetation control on industrial land, and for domestic maintenance^{3, 5, 12, 28, 30, 22}.

In response to the dangerous potential that glyphosate represents for wildlife and human health⁴, several studies in the risk assessment field, have shown the toxic effect of this herbicide. However, adverse effects of glyphosate have been observed in living organisms at different levels of the food chain (bacteria, algae, crustaceans, amphibians and fish)^{1,6,8,23,27}. This pesticide can inhibit specific enzymes in invertebrates such as phosphoenolpyruvate³², and phosphatase¹⁷. In addition, it can also alter the expression of stress-sensitive genes¹³. Exposure to glyphosate can cause oxidative stress, inhibition of acetylcholinesterase and increases susceptibility to parasitic infections¹. Such pesticide has been the subject of a major international issue concerning the carcinogenic risk of its active ingredient on human health. In January 2015, the administrative court of Lyon canceled the marketing authorization of Roundup Pro 360, which contains glyphosate.

In Morocco, the approval procedure and the marketing of pesticides for agricultural use is governed by laws and regulations. This legislation aims to evaluate physio-chemical, analytical, toxicological, and eco-toxicological data prior to placing the pesticide on the Moroccan market. Despite this strict regulation and the classification in 2015 of glyphosate as a carcinogen by the World Health Organization, products based on this pesticide for agricultural use, with the exception of the one combining glyphosate with the Co-formulant POE-Tallowamine²⁴, are still used in Morocco market under the control of ONSSA.

The aim of this work is the evaluation of the acute and chronic toxicity of the herbicide glyphosate using *Daphnia magna* as a biological model. This invertebrate represents the most sensitive taxon among aquatic organisms¹⁹ and has been widely used in bioassays to assess aquatic toxicity.

2. Materials and Methods

2.1. Conditions for the Cultivation of *Daphnia magna* in the Laboratory

The *D. magna* used in the bioassays is maintained in the ONEE-water branch laboratory accredited according to NM ISO 17025¹¹ since 2005. The *Daphnia* of clone 5 was obtained

from a culture from the MEDZ toxicology and ecotoxicology laboratory. . The breeding was carried out in a room temperature controlled to adjust at $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. The water culture have a pH of 7.8 ± 0.2 , a total hardness of $250 \pm 25\text{ mg/L}$ and a concentration of dissolved oxygen greater than 80% of the saturation in the air. *D. magna* were fed daily with a synthetic food (Tetramin) and natural food containing a mixture of algal culture ($9.106\text{ cells of } Chlorella\text{ pyrenodoisa /day/Daphnia}$ and $1.25.106\text{ cells of } Scenedesmus\text{ subspicatus /day/Daphnia}$). The breeding environment of daphnia was completely renewed three times a week.

2.2. Acute Toxicity Test of *Daphnia magna*

The stock solution of glyphosate used in this work is an aqueous solution of herbicide that contains 480 g/L of glyphosate IPA salt. Before each renewal of the test medium, dilutions were prepared from this solution.

In this study, we performed acute tests according to NM ISO 6341³⁴ to evaluate the short-term toxicity of the herbicide. It is a test to determine the concentration causing immobility in *D.magna* after 48 hours of exposure. Five neonates (less than 24 hours old) are placed in a 15 mL glass tube containing 10 mL of the water culture and the desired concentration of toxicant. For each concentration, four replicates were prepared in addition to the control. Daphnia was not fed and the test takes place in a static system (no renewal). This exhibition will take place under a day/night cycle of 16h/8h. After 24 and 48 hours of exposure, the immobility was observed. The concentration range used in the test: 0, 8,10,11,12,14,16,18 (mg/L).

2.3. Chronic Toxicity Test of *Daphnia magna*

To evaluate the long-term toxicity of the pesticide on *D. magna*, we performed the chronic test according to NM ISO 10706³³. This test evaluates the effect of a toxic effluent on the reproduction and growth rate in the population of the species over a 21-days exposure period. The neonates (less than 24 hours old) were individually placed in a glass containing 50 mL of the water culture, the food and the concentration of the desired toxic element. For each concentration, 10 replicates were made in addition to the control. The medium was renewed 3 times per week throughout the test. The exposure takes place under a day/night cycle with a 16 h photoperiod. The concentration range used in the test: 0, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, and 5.5 (mg/L).

The introduction of pesticides into aquatic environments can have chronic effects on individuals and the population as a whole, leading to a disruption in the health of these ecosystems. Our results underline the interest of using multi-generation tests to study the long-term effects of these substances on a key freshwater species *Daphnia magna*. For this reason, the chronic toxicity of the herbicide glyphosate was evaluated across five generations of the crustacean. Individuals from the parental generation (F0) and the offspring (F1, F2, F3, F4) are exposed to glyphosate at concentrations of 1.5 to 5.5 mg/L. Survival and reproduction are monitored to measure the effects on the different generations.

These tests follow the same conditions as the chronic tests except the exposure time that is reduced to 14 days for the daughter generations (F1, F2, F3).

2.4. Statistics

For an interpretation of the results of the statistical tests, two software packages were used; Probit (Probit version 1.5, USEPA, OH, USA); and Statistica (STATISTICA version 6 for Windows, Statsoft, Tulsa, OK, USA). The determination of significant differences between the control groups and the different glyphosate concentrations tested varied according to the data. If the conditions are met, a single-factor ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test is used. However, if one of the conditions is not established, a non-parametric method, the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U-test, is used. Statistical significance is established at $p < 0.05$.

The comparison between the different generations is performed by Fisher's exact test (one-tailed $P < 0.05$).

3. Results

3.1. Lethal Effect of Glyphosate on *Daphnia magna*

Acute exposure has shown that glyphosate has a lethal effect on *D. magna*. Compared to controls, the percentage of immobility, increases significantly with the increase in concentration levels of the pesticide, reaching 100% at the maximum concentration of 18 mg/L (Figure1). Indeed, the time of exposure influences the toxicity of glyphosate with respect to *D. magna*. It was observed that the EC_{50} value decreased from 9.53 mg/ L after 24 hours to 8.61 mg/ L after 48 hours.

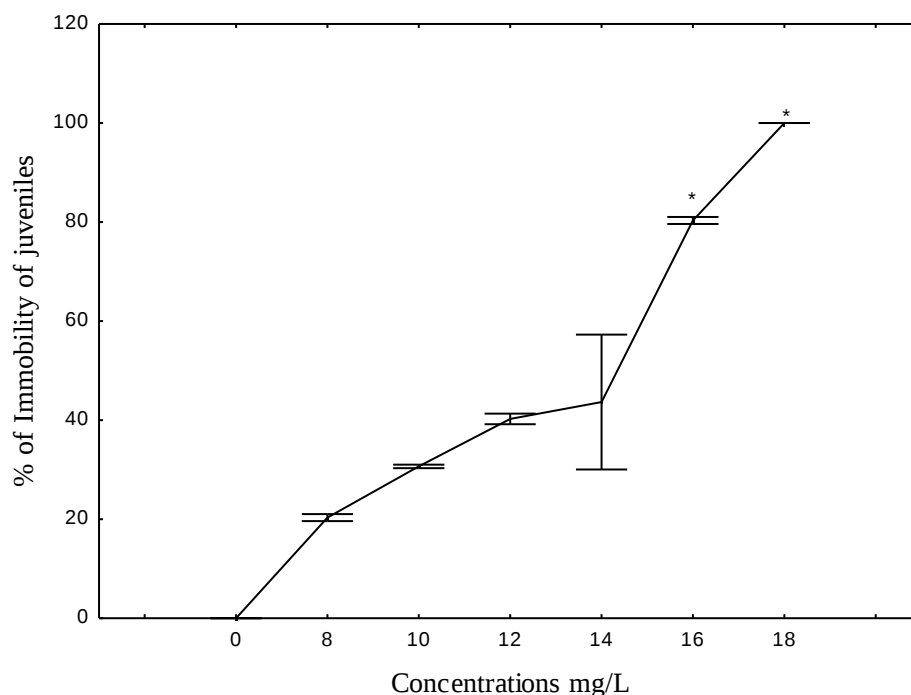


Figure 1: Effect of glyphosate on survival of *Daphnia magna* after 48h of exposure

To assess the short-term risk of this herbicide, we defined the concentration inhibiting 10% of the *Daphnia* population (48h-EC₁₀= 6.59 (4.96 - 7.49) mg/L), the lowest observed effect concentration (LOEC= 4.45 mg/L), and the highest no observed effect concentration (NOEC= 3.13 mg/L).

It appears that the chronic (21 days) exposure to the herbicide has a toxic effect on the survival of the species studied. This effect is significant for the three concentrations tested 3.5; 4.5 and 5.5 mg/L. The percentage of inhibition increases significantly with the increase in glyphosate concentrations, reaching 100% for the maximum concentration 5.5 mg/L. The mothers died massively during the last 6 days of exposure with this concentration. Compared to controls, *daphnia*'s mortality was not significant at low concentrations (Figure 2).

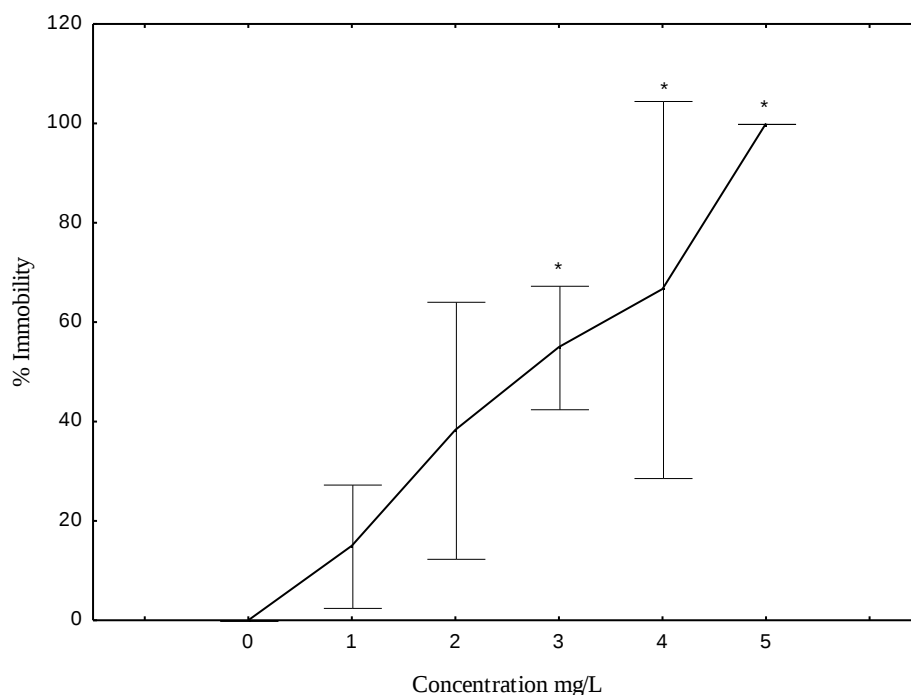


Figure 2: Effect of glyphosate on survival of *Daphnia magna* after 21 days of exposure

The performance of the chronic tests for the survival parameter allowed us to define concentrations important for the evaluation of glyphosate toxicity. The effective concentration inhibiting 50% of the *D. magna* population during glyphosate exposure was 3.13 mg/L (2.45-3.84, the NOEC concentration is 1.40 mg/L and the LOEC concentration was 1.65 mg/L.

3.2. Effect of Glyphosate on *Daphnia* Reproduction

The production was significantly reduced from the 3.5 mg/L concentration, but at the low concentrations (1.5 mg/L and 2.5 mg/L) it was more or less similar to the controls (Table 1). This reduction was marked by a significant decrease in the number of offspring per mother (Figure 3) and the number of eggs laid (Figure 4) for concentrations 3.5, 4.5, 5.5 mg/L. According to Figure 5, a significant decrease in egg-laying size was observed at the two maximum concentrations 4.5 and 5.5 mg/L.

Table 1: Size, longevity and reproduction of *Daphnia magna* exposed to measured concentrations of glyphosate in a 21-day life study

Glyphosate mg/L	Longevity in days	Days to first brood	Number of neonates per female	Brood size	Number of broods
0	21±0	8.1±0.3	97.2±2.0	19.7±4.0	5.3±0.9
1.5	19.4±1.5	8.5±0.7	100.0±4.3	19.6±4.6	5.2±0.9
2.5	18.7±1.3	8.2±0.6	98.0±1.8	18.2±5.6	4.8±0.9
3.5	18.0±1.3*	8±0	79.5±13.9*	17.0±2.4	4.0±0.6*
4.5	17.0±1.4*	9.1±0.8*	46.0±9.3*	12.5±1.4*	2.4±0.7*
5.5	13.9±0.8*	10±0*	20.6±10.0*	7.7±1.4*	2.0±0.6*

Values are means ± standard deviation; * $p < 0.05$.

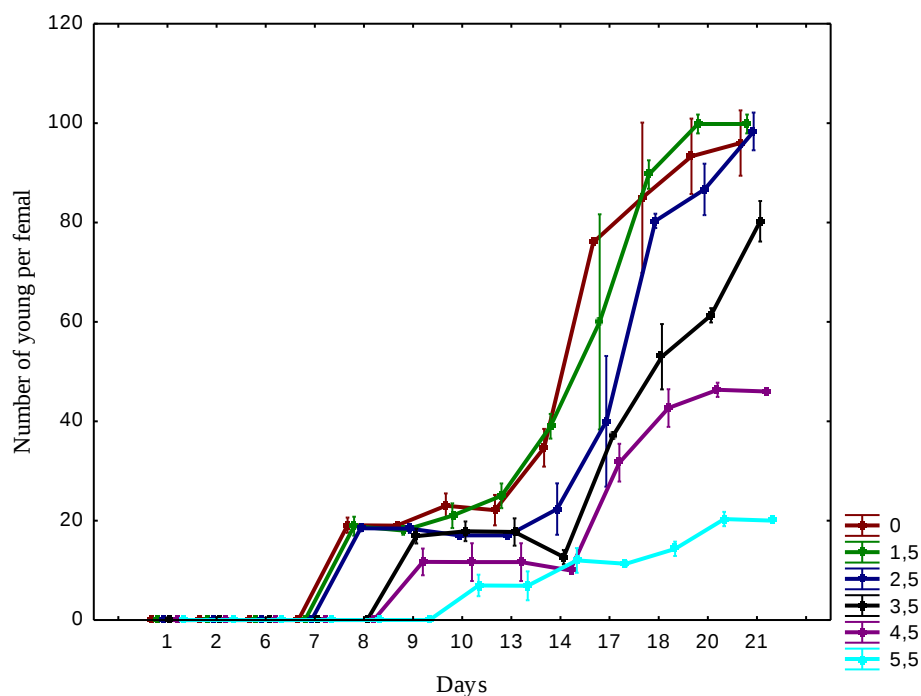


Figure 3: Effects of glyphosate on the number of neonates per female of *Daphnia magna* exposed for 21 days (n=10/concentration)

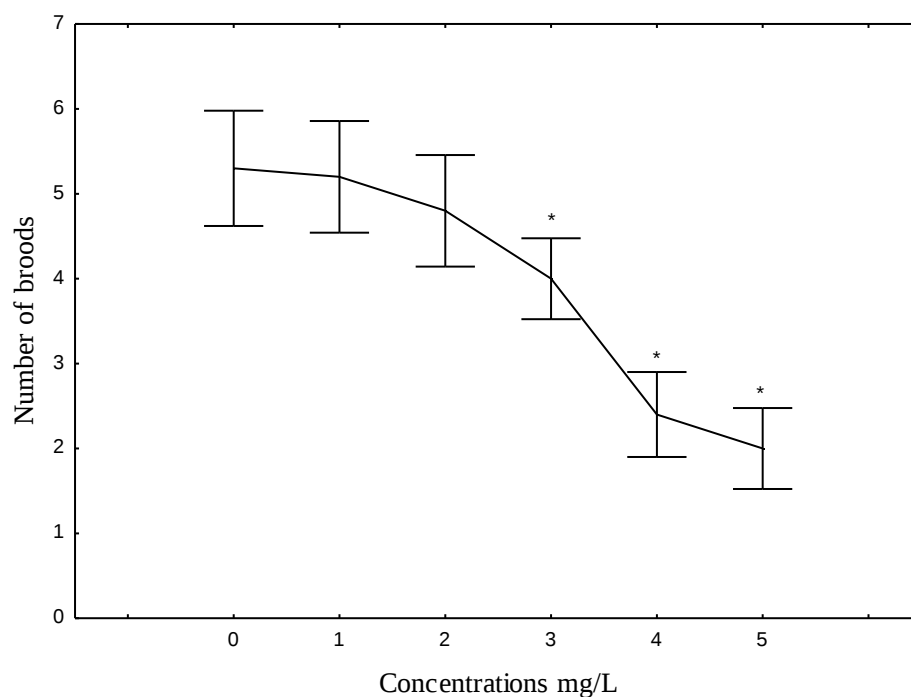


Figure 4: Effects of glyphosate on the number of broods exposed for 21 days
(n=10/concentration)

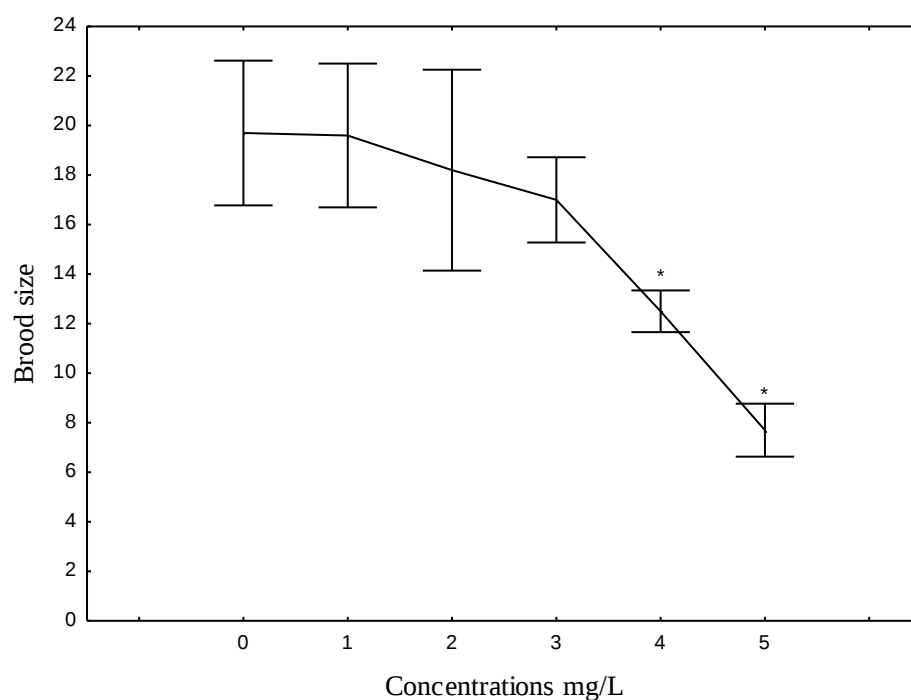


Figure 5: Effects of glyphosate on brood size exposed for 21 days (n=10/concentration)

In addition, a significant delay in maturity was observed at these two concentrations 4.5 and 5.5 mg/L. Compared to the controls, the first brood occurred on approximately day 9 for the

4.5 mg/L concentration and day 10 for the 5.5 mg/L concentration (Table 1). In comparison with the controls, malformations were observed in juveniles at the highest glyphosate concentration (5.5 mg/L) in the form of a curvature of the apical spine.

The NOEC concentration of glyphosate tested on all parameters studied in *D. magna* after 21 days of exposure compared to controls was 1.5 g/L. The most sensitive parameter in reproduction is the number of eggs laid. The 21-day EC₁₀ for this parameter is 2.30 (0.33-3.13) mg/L (Table 2).

Table 2: EC₁₀ and EC₅₀ of several parameters (mg/L) estimated at *Daphnia magna* following exposure to glyphosate during 21 days. (Values represent EC_x with 95% confidence intervals)

Parameters	EC ₁₀	Confidence intervals	EC ₅₀	Confidence intervals
Number of broods	2.30	0.33-3.13	4.39	3.29-9.18
Brood size	3.16	2.23-3.65	5.02	4.45-6.27
Number of neonate per female	3.65	1.77-4.18	4.53	3.75-5.44

3.3.Multi-generation Test

For the F0 parental generation, the results of 21-day exposure to glyphosate were similar to the results of acute and chronic tests (see chapters 1 and 2). The pesticide has a toxic effect on survival and fertility (Figures 6 and 7).

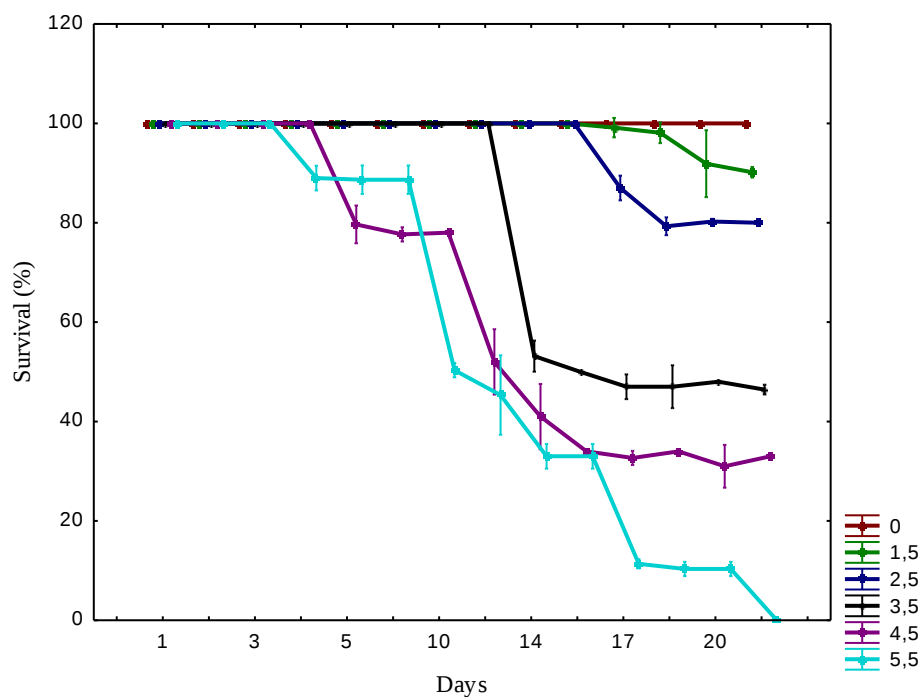


Figure 6: Effects of glyphosate on the survival of *Daphnia magna* (F0) exposed for 21 days (n=10/concentration)

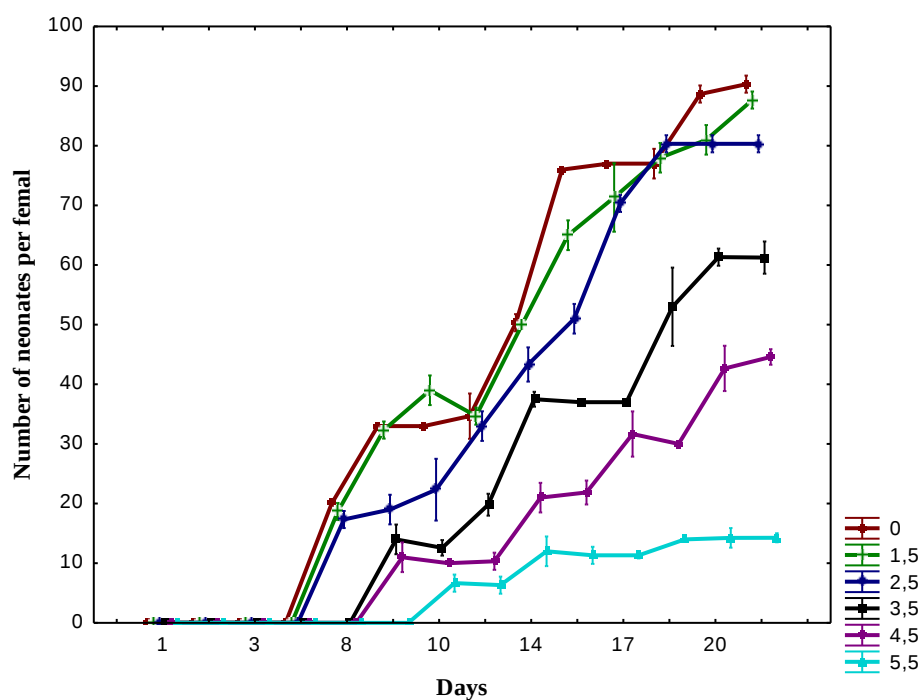


Figure 7: Effects of glyphosate on the number of young per adult of *Daphnia magna* (F0) exposed for 21 (n=10/concentration)

Comparing with the F0 generation, the results show that survival was more affected in the daughter generation than in the parent generation. In effect, survival decreased significantly ($p \leq 0,05$) starting 1.5 mg/L for the F2, F3 and F4 daughter generations (Figure 8). This effect is more pronounced for the maximum concentration of 5.5 mg/L in which the percentage of survival decreases to 0% for the F2, F3, and F4 generations. For the F1 daughter generation, survival was similar with the F0 parental generation.

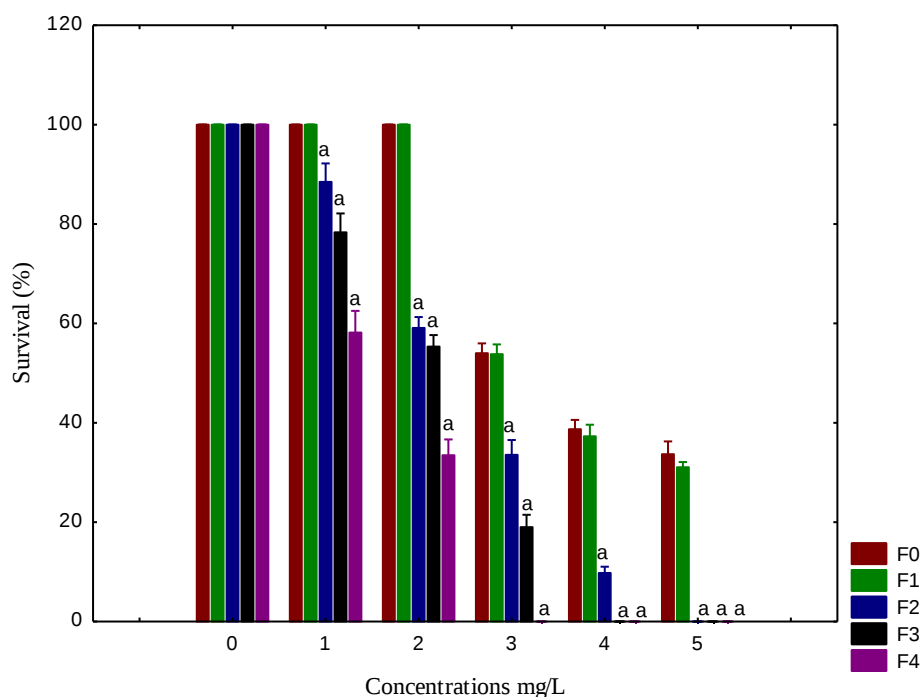


Figure 8: Effect of glyphosate on survival of *Daphnia magna* (F0, F1, F2, F3, F4) during 14 days of exposure. (^a $p < 0.05$ in comparison to F0 values)

The difference in the production parameter between the parental generation and the daughter generations was significant starting from the 1.5 mg/L concentration (Figure 9). The decrease in reproduction (number of juveniles per female) was similar among the F0 generation and the two F1 and F2 generations for the maximum concentration (5.5 mg/L). In comparison with controls, however, this decrease becomes significant starting from 3.5 mg/L for F0 parents and 1.5 mg/L for F1, F2, F3, F4 offspring.

As for the survival parameter, the time of exposure and the dose of the pesticide increases the toxicity of glyphosate towards *D. magna*. Reproduction is totally stopped at high concentrations for the F3 (from 4.5 mg/L) and F4 (from 2.5 mg/L) generations.

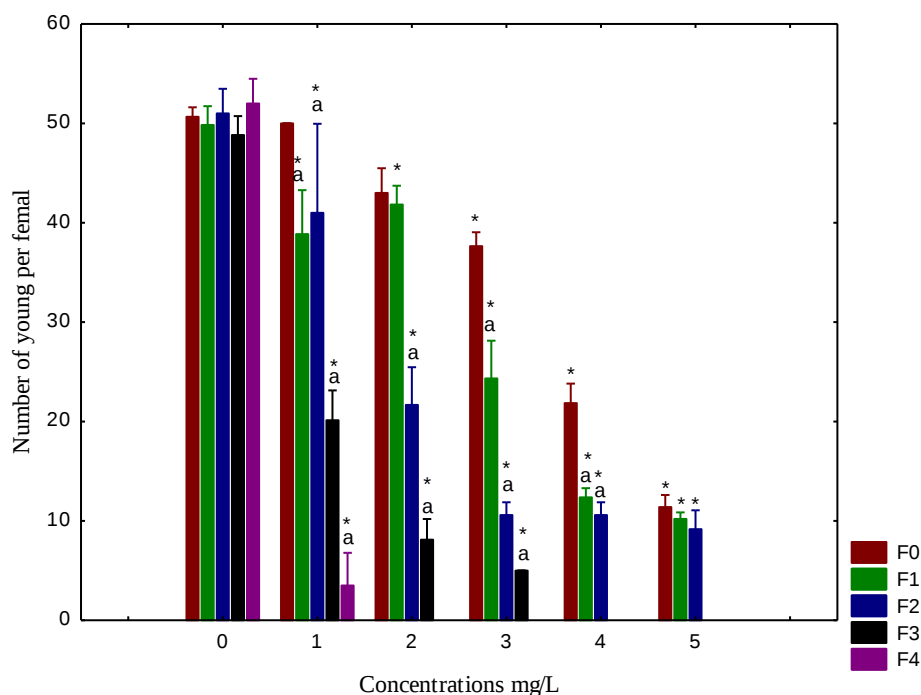


Figure 9: Effect of glyphosate on reproduction of *Daphnia magna* (F0, F1, F2, F3, F4) during 14 days of exposure. * $p < 0.05$ in comparison to control; ^a $p < 0.05$ in comparison to F0 values

The results show that survival and reproduction were significantly reduced with increasing pesticide concentration in parents and offspring. The toxic effect of glyphosate was more pronounced in the F4 daughter generation than in the F0 parent generation.

The determination of glyphosate toxicity was dependent on the dose and the exposure time in the parental F0 generation and the F1, F2, F3 and F4 daughter generations. After 14 days of exposure to the herbicide, the results obtained show that a short period (two weeks) was already indicative of the chronic toxic effects of glyphosate in the different generations. The observed effects of glyphosate on the offspring reveal that the four daughter generations F1, F2, F3 and F4 are more sensitive than the parental generation F0. Reproduction and survival decreased significantly starting from the concentration 3.5 mg/L for the parents. In the F2, F3 and F4 generations, both parameters were affected starting from the 1.5 mg/L concentration. While for the F1 daughter generation, survival was significantly decreased starting from the 3.5 mg/L concentration but reproduction was observed to be affected from the 1.5 mg/L concentration.

The sensitivity of *Daphnia* fertility to glyphosate is most pronounced in the last two daughter generations F3 and F4. Reproduction is totally stopped at high concentrations for the F3 (from 4.5 mg/L) and F4 (from 2.5 mg/L) generations.

4. Discussion

According to the classification Persoone²⁰, the short-term toxicity of glyphosate belongs to the 4th class and shows high toxicity for the species studied (TU-24h= 10.49 and TU-48h= 11.61).

Various studies have reported the acute effect of glyphosate on *Daphnia*. This toxicity is defined by the significant immobility of juveniles during 48 hours of exposure to the pesticide. In our study, the 24h-EC₅₀ is 9.53 mg/L and the 48h-EC₅₀ is 8.61 mg/L. Comparing our results with those of the Hansen and Roslev study¹⁰, we find a 48h-EC₅₀ of 8.9 mg/L similar to the one defined in our work. Similarly, the study by Cuhra et al.⁶, shows that three different *Daphnia magna* clones tested for Roundup (active ingredient glyphosate) have a 48h EC₅₀ value that is within this range of 3.7 to 10.6 mg/L.

Whereas in other studies Folmar et al., and Sarigul and Bekcan^{8,26}, 48h-EC₅₀ was not the same found in this study. This can be explained by the formula of the glyphosate studied and its purity.

Similarly, exposure time increases the toxicity of glyphosate to *D. magna*. In the Sarigul and Beckan study, the effective concentration inhibiting 50% of *D. magna* decreased significantly, as noted in our work, from 0.019 mg/L after 24 hours to 0.012 mg/L after 48 hours.

According to the study by Zhang et al.³⁵, the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* has sensitivity towards glyphosate (95% purity) similar to daphnia with a 48h-EC₅₀ of 8.1 mg/L. Other species, such as saltwater invertebrates appeared more sensitive to Roundup (41% glyphosate) than daphnia³¹ with a 48h-IC₅₀ of 1.77 mg/L for *Acartia tonsa* and 48h-IC₅₀ of 5.00 mg/L for *Euplotes vannus*. The fish *Clarias gariepinus* with a 96h-CL₅₀ of 300 mg/L⁷, the crustacean *Gammarus pseudolimnaeus* with a 48h-EC₅₀ of 62 mg/L and the larva of *Chironomus plumosus* with a 48h-EC₅₀ of 18 mg/L⁸ are more resistant to glyphosate than *D magna*.

This work has identified a chronic value for freshwater invertebrates (EC_{10} 21d of 2.30 (0.33-3.13) mg/L) which can be used to refine the guideline values for the protection of aquatic life. Based on European regulations, a PNEC (predicted no effect concentration) of 15 μ g/L could be obtained by applying a safety factor of 100 to the reproduction NOEC (1.5 mg/L). A more protective value of 3.3 μ g/L was obtained based on the lower limit of EC_{10} 21j. By comparing this value with that the one required by the French National Agency for Environmental and Occupational Health and Safety²¹ (PNEC = 60 μ g/L), the value of this study can be integrated to reduce the PNEC recommended by this agency.

The Cuhra et al.⁶ study show that chronic 15-day exposure to glyphosate has adverse effects on the survival and reproduction of *Daphnia*. This was marked by a significant reduction in survival and reproduction as early as 4.05 mg /L glyphosate concentration. The same effect was noted in our study, in which mortality and decreased fertility parameters of *daphnia* were significant at 4.5 mg/L concentration.

Taking into account the above, the US EPA²² has set the limit for glyphosate concentrations in surface water at 0.7 mg/L and the limit of the environmental guideline specific to the state of California is 1.0 mg/L. In the present study, a chronic value of 3.3 μ g/L was obtained based on the lower limit of EC_{10} 21j reproduction. Comparing this value with those mentioned by both guidelines, the toxicity of the glyphosate used in this work may not be sufficiently restrictive to ensure the viability of populations of *D. magna* and other aquatic species.

Roundup solutions at concentrations of 25 and 50 mg /L of glyphosate during 15 days of exposure demonstrate a lack of adaptation to the herbicide in four successive generations of *D. magna*¹⁸. For the parental generation, analyses of reproductive parameters (number of eggs laid, clutch size and number of juveniles per female), showed that there was a significant decrease in these parameters for both 25 and 50 mg /L concentrations. In comparison with the controls (80.3 ± 2.8), the number of juveniles decreased by 46.0 ± 7.0 for the 50 mg/L concentration. Similarly, a significant reduction in the number of eggs laid (2.6 ± 0.2) and the size of the clutch (17.1 ± 2.1) was observed in *daphnia* for the maximum concentration. These 15-day experiments revealed that Roundup solutions at concentrations of 25 and 50 mg/L reduced reproduction as early as the first generation. Based on the results of our multi-generation tests, the effect of glyphosate on the parental generation for reproductive parameters is similar for the high concentrations tested in our study.

Comparing the results of the Papchenkova et al. study¹⁸ with those obtained from our multi-generation tests, the effect of glyphosate on the parental generation for reproductive parameters is similar for the high concentrations tested. In addition, a comparison between successive generations revealed a decrease in herbicide resistance observed for the fourth generation compared to the maternal generation in this study. Contrary to our results, glyphosate toxicity is more pronounced in the parental generation than in the 4th daughter generation.

In the environment, glyphosate hydrolyzes in half-lives greater than 30 days at pH 5.7 and 9 and is not readily biodegradable. But several studies have shown that it can form complexes with metals present in aquatic environments. The carboxylic and phosphonic groups of glyphosate can react to form covalent bonds with divalent metal ions^{9-10, 16,29}. Such complexes are considered very stable in water and may alter toxicity profiles compared to glyphosate alone^{15, 31}. In the Hansen and Roslev study¹⁰, complexes of glyphosate with copper appear to be more toxic to *Daphnia* than glyphosate alone. The 48h-EC₅₀ mobility parameter is 52.8 µM and 25.5 µM for glyphosate and glyphosate-Cu, respectively.

5. Conclusion

At the end of this eco-toxicological study, we were able to evaluate several aspects of acute and chronic toxicity of the herbicide glyphosate on the *Daphnia magna* population. The results of the acute tests show that the pesticide has a significant toxic effect on the survival of the *Daphnia* population with a 48h-EC₅₀ of 8.61 mg/l (7.62, 9.30). The toxicity effect of these substances is marked by the immobility (mortality) of juveniles exposed to the herbicide especially at high concentrations.

Also, the results obtained from long-term toxicity tests show that glyphosate has a disruptive effect on the reproduction of the species studied. This effect is marked by a significant delay in sexual maturity and a significant decrease in the number of neonate per mother at a concentration of 3.5 mg/l. This can be explained by the probable presence and long-term accumulation of endocrine disruptors that affect the hormonal system regulating the physiological functions of *D. magna*.

Finally, the contamination of aquatic environments by glyphosate can disrupt the entire aquatic ecosystem and thus affect its biodiversity. The chronic value of 3.3 µg/L obtained in

this study remains well above the international guidelines for the protection of aquatic fauna. At the limit of the obtained results in this study, it is desirable to revise these values on one hand and to conduct impact and risk assessment studies to define more robust concentration limits for these chemicals.

6. Acknowledgment

I would like to express my thanks to Mohammed EL ALAMI and Mariam NACIRI. I am grateful for their availability, advice, remarks and encouragement.

A big thank you to my sister Imane BERREBAANE for all the tips and the hours she has dedicated to help me in my work.

7. Reference

1. Annett R, Habibi HR, Hontela AH. Impact of glyphosate and glyphosate based herbicides on the freshwater environment. *J Appl Toxicol*. 2014; 34(5):458-479.
2. Baylis AD. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag Sci*. 2000; 56(4):299-308.
3. Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Enviro Sci Eur*. 2016; 28(1):3.
4. Classification OMS recommandée des pesticides en fonction des dangers qu'ils présentent et lignes directrices pour la classification. Genève: Organisation mondiale de la Santé; 2020.
5. Cox C. Glyphosate Fact Sheets: Part 1 and Part 2. *Journal of Pesticide*. 1995; 15:3-4.
6. Cuhra M, Traavik T, Bohn T. Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*. 2012; 22(2):251-262.
7. Erhunmwunse NO, Ogbeide OS, Tongo II, Enuneku AA, Adebayo PO. Acute toxicity of glyphosate-based isopropylamine formulation to juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2018; 26:97-101.
8. Folmar LC, Sanders HO, Julin AM. Archives of Environmental Contamination and Toxicology Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1979; 8:269-278.
9. Franz JE, Mao MK, Sikorski JA. 1997. Glyphosate : A unique global herbicide. Washington DC: American Chemical Society; 1997.
10. Hansen LH, Roslev P. Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquat Toxicol*. 2016; 179:36-43.

11. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO 17025; 2017.
12. Jaskulski D, Jaskulska I. The effect of pre-harvest glyphosate application on grain quality and volunteer winter wheat. *Romanian Agricultural Research*. 2014; 31:283-289.
13. Le TH, Lim ES, Lee SK, Choi YW, Kim YH, Min J. Effects of glyphosate and methidathion on the expression of the Dhb, Vtg, Arnt, CYP4 and CYP314 in *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 2010; 79(1):67-71.
14. Montiel-León JM, Munoz G, Duy SV, Do DT, Vaudreuil MA, Goeury K, Guillemette F, Amyot M, Sauvé S. Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environ Pollut*. 2009; 250:29-39.
15. Morillo E, Undabeytia T, Maqueda C. Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: Effect of Cu (II) in solution and adsorbed on the mineral. *Environ Sci and Technol*. 1997; 31:3588-3592.
16. Morillo E, Undabeytia T, Maqueda C. FTIR Study of Glyphosate–Copper Complexes. *Environ Sci and Technol*. 2002; 50(7):1918-1921.
17. Ørsted M, Roslev P. A fluorescence-based hydrolytic enzyme activity assay for quantifying toxic effects of Roundup® to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*. 2015; 34(8):1841-50.
18. Papchenkova GA, Golovanova IL, Ushakova NV. The parameters of reproduction, sizes, and activities of hydrolases in *Daphnia magna* Straus of successive generations affected by roundup Herbicide. *Int Wat Biol*. 2009; 2(3):286-291.
19. Parrish P, Schimmel S, Hansen D, Patrick J, Forester J. Chlordane: effects on several estuarine organisms. *J Toxicol Environ Health*. 1976; 1: 485-494.
20. Persoone G, Marsalek B, Blinova I, Törökne A, Zarina D, Manusadzianas L, Nalecz-Jawecki G, Tofan L, Stepanova N, Tothova L, Kolar B. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters, *Enviro Toxicol*. 2004; 18(6):395-402.
21. Phytopharmacovigilance -Synthèse des données de surveillance- Appui scientifique et technique n°2017- glyphosate. France : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail ; 2019 July.
22. Prevention Pesticides and Toxic Substances - Glyphosate EPA-738-F-93-011. United States: United States Environmental Protection Agency (US-EPA); 1993.
23. Reno U, Doyle SR, Momo FR, Regaldo L, Gagneten, AM. Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species. *Ecotoxicology*. 2018; 27(7):784-793.
24. Retrait des pesticides à usage agricole à base de glyphosate en association avec le Co-formulant la POE-Tallowamine [Internet]. Agadir : Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires (ONSSA) ; 2018. Available from: <http://www.hortitecnews.com/wp-content/uploads/2018/03/501.pdf>.

25. Robichaud CD, Rooney RC. Low concentrations of glyphosate in water and sediment after direct over-water application to control an invasive aquatic plant. *Water Res.* 2021; 188:116573.
26. Sarigül Z, Bekcan S. Acute toxicity of the Herbicide Glyphosate on *Daphnia magna*. *Tarım Bilimleri Dergisi.* 2009; 15(2):204-208.
27. Sihtmäe M, Blinova I, Kunis-Beres K, Kanarbik L, Heinlaan M, and Kahru A. Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology.* 2013; 72:215-224.
28. Soltani N , Blackshaw RE , Gulden RH, Gillard CL , Shropshire C, Sikkema PH. Desiccation in dry edible beans with various herbicides. *Canadian Journal of Plant Science.* 2013; 93(5):871-877.
29. Subramaniam V, Hoggard P. Metal complexes of glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1988; 36 (6):1326-1329.
30. Tomlin CDS. *The Pesticide Manual, a World Compendium.* 14th Edition. Alton: British Crop Protection Council; 2006.
31. Tsui MT, Chu LM. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere.* 2003; 52(7):1189-97.
32. Tu M, Hurd C, Randall JM. *Weed Control Methods Handbook: Tools and Techniques for Use in Natural Areas.* The Nature Conservancy; 2001.
33. Water quality -Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea), Standards catalogue. Morocco: ISO10 706; 2014.
34. Water quality -Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test, Standards catalogue. Morocco: International standard organization (ISO) 6341; 2014.
35. Zhang Q, Qu Q, Lu T, Ke M, Zhu Y, Zhang M, Zhang Z, Du B, Pan X, Sun L, Qian H. The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth Part B. *Environ Pollut.* 2018; 243:1106-1112.

III-TOXICITE AIGUE ET CHRONIQUE DU GLYPHOSATE SUR *DANIO RERIO*

(Acute and Chronic Toxicity of a glyphosate on *Danio rerio*)

Cette partie du travail a comme but l'évaluation de la toxicité du glyphosate sur les vertébrés aquatiques d'eau douce en utilisant comme espèce *Danio rerio*. Le poisson zèbre est largement utilisé dans les essais de toxicité aquatique à cause de sa sensibilité envers les polluants chimiques, la transparence des œufs facilitant leur manipulation et la perméabilité du chorion aux substances toxiques. Les paramètres déterminés durant l'exposition du glyphosate sont la survie, le taux d'éclosion, le rythme cardiaque et la natation des poissons zèbres.

Les résultats obtenus ont révélé que la toxicité aigue du glyphosate dépend du temps d'exposition. Il a été observé que la valeur de la CE_{50} a diminué de 16,57 (15,03-18,04) mg/L après 24 heures à 15,10 (13,82-16,32) mg/L après 48 heures. L'exposition du glyphosate pendant 48h à un effet toxique sur la survie des poissons *Danio rerio*. Par rapport aux témoins, le pourcentage de la mortalité, augmente de manière significative avec l'augmentation des niveaux de concentration de l'herbicide, atteignant 100% à la concentration maximale de 30 mg/L.

La coagulation de l'embryon est l'aspect de mortalité le plus répandu dans toutes les concentrations. Pour les deux autres types de mortalité, la détection du rythme cardiaque et le détachement de la queue, s'expriment surtout pour les concentrations maximales après 48h d'exposition au glyphosate.

L'exposition durant 10 jours au glyphosate a un effet toxique sur la survie, le taux d'éclosion, le rythme cardiaque et la natation l'organisme test *Danio rerio*. La concentration efficace inhibant 50 % de la population de *Danio rerio* pendant l'exposition au glyphosate est de 3,18 mg/L (0,96- 7,54). Un retard de développement embryonnaire significatif a été observé pour la concentration maximale 13 mg /L. En effet, les embryons sont morts massivement au cours du 3^{ème} jour d'exposition pour cette concentration.

Des effets significatifs de la toxicité du glyphosate ont été observés avec l'augmentation des concentrations de glyphosate pour les autres paramètres. Le pourcentage d'éclosion a diminué pour la concentration maximale de 13 mg/L atteignant 37,40 % par contre le pourcentage de l'arrêt cardiaque a augmenté significativement à partir de la concentration 10 mg/L, atteignant 38 % pour la concentration maximale de 13 mg/L.

De plus, l'exposition au glyphosate affecte la natation des poissons zèbres. Cet effet est marqué par une diminution significative de la nage des poissons zèbres observée chez les concentrations 10 mg/L et 13 mg/L dès le 6ème jour. Les poissons nageaient lentement et se fixent au fond de l'aquarium. Pour la concentration 4 mg/L, une réduction significative du pourcentage de la nage a été observé à partir du 8ème jour.

Il apparaît que l'exposition pendant 30 jours au glyphosate a un effet toxique sur la survie le taux d'éclosion, le rythme cardiaque et le système locomoteur des poissons *Danio rerio*. Cet effet est significatif seulement pour la plus forte concentration testée 4 mg/L. La concentration efficace inhibant 50% de la population des poissons zèbres exposés pendant 30 jours au glyphosate est de 3,01 mg/L (2,55- 3,76). Une réduction significative est observée du taux d'éclosion, atteignant 60,25 %, pour la plus forte concentration. Par rapport aux témoins, le pourcentage du nombre de poissons nageant a diminué significativement pour la concentration 4 mg/L. Les poissons *Danio rerio* nageaient lentement et se fixent au fond de l'aquarium. Pour le paramètre de l'arrêt cardiaque, le pourcentage a augmenté significativement atteignant 53,01 % pour la concentration maximale.

Des malformations ont été observées chez les embryons des poissons zèbres aux fortes concentrations du glyphosate exposés durant 10 et 30 jours. Elles consistent en un courbement plus au moins important de la queue et/ou absence de nageoire. Ces effets sont significatifs pour la concentration 13 mg/L (exposition de 10 jours) et la concentration 4mg/L (exposition de 30 jours). Chez le contrôle et les concentrations faibles, aucune malformation n'a été observée.

Pour une interprétation directe de la toxicité du glyphosate vis-à-vis *Danio rerio*, la concentration EC₅₀-48h a été transformée en unité toxique selon la formule de Sprague and Ramsey (1965) ($TU = [1/EC50] \times 100$).

Selon la classification Persoone et al. (2003), la toxicité à court terme du glyphosate appartient à la 3ème classe et présente une toxicité aigüe pour l'espèce étudiée (TU-48h=6.62).

Ce travail a permis de dégager une valeur chronique pour les vertébrés de l'eau douce (30d-EC₁₀ de 1,29 (0,78-1,65) mg/L) qui peut être utilisé pour l'affinement des valeurs guides pour la protection de la vie aquatique.

En se basant sur la réglementation européenne, on a pu obtenir une PNEC (predicted no effect concentration) de 2,5µg/L en appliquant un facteur de sécurité de 100 sur la NOEC de la mortalité (0,25 mg/L).

En comparant cette valeur avec celle exigée par l'agence national de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (2019) (PNEC = 60 µg/L), la valeur de cette présente étude peut être intégrée pour réduire la PNEC préconisée par cette agence et assurer ainsi la viabilité des populations de *Danio rerio* et d'autres espèces aquatiques.

Pour finir, nos observations sur les malformations des larves lors de l'exposition de 10 jours et 30 jours des poissons zèbres au glyphosate, laisse suspecter un mécanisme de perturbation endocrinienne de cet herbicide qui reste à vérifier.

Acute and Chronic Toxicity of a glyphosate on *Danio rerio*

El Joumani H.*¹, El Alami M.² and Naciri M.¹

¹Laboratory of Biodiversity, Ecology and Genome, Faculty of Sciences, Mohamed V University, Rabat, Morocco.

²Laboratory of Hydro-biological Bacteriological analyzes and Ecotoxicology, National Office of Electricity and Drinking Water (ONEE), Rabat, Morocco.

*hind.eljoumani@gmail.com

Abstract

*Glyphosate herbicides are the most widely produced and used herbicides in the world. The intensive applications of glyphosate and its half-life in water result in its presence in many aquatic ecosystems. The present study focuses on the evaluation of glyphosate toxicity on the early life stages of the fish *Danio rerio*. Analysis of the test results revealed that glyphosate is toxic to zebrafish. This effect is marked by the increase in percent mortality at peak concentrations. Long-term exposure to glyphosate affects the hatching rate, heart rate and swimming ability of zebrafish. Significant malformations were observed at the highest concentration in the form of tail bending or fin absence. The latter malformation has not been described in other scientific work.*

Keyword: *Danio rerio*- acute toxicity- chronic toxicity.

Introduction

With the Green Revolution, agriculture intensified in order to achieve food self-sufficiency, and pesticides were used massively to ensure high crop yields. Since the introduction of genetically modified seeds in 1996, glyphosate-based pesticides have been the most widely used chemicals³. Their global use has increased almost 15-fold to about 826,000 tons⁴.

Furthermore, the presence of this substance in aquatic environments is possible²³ under the influence of precipitation, accidental spraying and runoff from agricultural land^{5, 19, 23, 28}. Several studies have shown that glyphosate has been detected in natural surface and groundwater in several countries^{2, 11, 9, 18, 29}.

This herbicide has been the subject of much international concern regarding the carcinogenic risk of its active ingredient on human health. In January 2015, the administrative court of Lyon cancelled the marketing authorization of Roundup Pro 360, which contains glyphosate. According to studies in the literature, glyphosate residues and their metabolites have negative effects on the early life stages of fish *Danio rerio*. The study by Fiorino et al⁸, showed that zebrafish embryos are sensitive to the toxic action of glyphosate. Indeed, the highest mortality was observed at the concentration of 50 mg/L. In addition, a 48 hour locomotion test revealed that embryonic exposure to glyphosate resulted in a significant increase in locomotor activities for *Danio rerio* larvae³¹. Recent studies have addressed the neurotoxic effects of glyphosate on zebrafish⁷. The results of this study revealed that zebrafish exposed to this pesticide showed significant impairment in exploratory and social behaviors consistent with increased anxiety. In fact, the forebrain of the species showed a significant increase in dopamine and serotonin levels. Other researchers, such as Díaz-Martín et al⁶, have shown that exposure to glyphosate affects the stability of microtubules in *Danio rerio* fish embryos.

In Morocco, the registration procedure and marketing of pesticides for agricultural use is governed by strict legislative and regulatory texts, but glyphosate-based products, with the exception of the one associating glyphosate with the co-formulant POE-Tallowamine, are still used in Morocco under the control of the ONSSA²¹.

The aim of this work is to evaluate the acute and chronic toxicity (30 days) of glyphosate using *Danio rerio* as a biological model. The evaluation of the long-term toxicity (30 days) of this herbicide has not been the subject of scientific work, hence the importance of this study.

Materials and Methods

The concentration of the glyphosate stock solution used in this work contains 480 g/L of glyphosate IPA salt. Before each renewal of the test medium, dilutions were prepared from this solution. The rearing of *Danio rerio* fish used in the tests is maintained in the ONEE- water branch laboratory accredited in accordance with NF ISO 7346¹³. The male and female genitor used in the tests are stored in two different 100-liter aquariums containing rearing water at a temperature of $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, a pH of 7.5 ± 1 , a fixed light-dark rhythm of 16/8h and a dissolved oxygen concentration of over 80%. The fish were fed daily until 24 hours before the start of the test, with a live food (*Daphnia magna*) and a dry commercial food (Tetramin). The conditioning of the fish used in the toxicity tests lasted at least 12 days before the start of the test.

The adults, 6 months to 12 months of age, were pooled in the production tank at a 2:1 ratio (males: females). Eggs from the spawning are collected half an hour after the room is lit using a container at the bottom of each aquarium covered with a wire mesh. Eggs used for toxicity testing are live and free of abnormalities.

Acute and chronic toxicity test: In this study, we performed the acute test according to the NF ISO 15088¹⁴ standard to evaluate the short-term toxicity of glyphosate. It is a test that aims to determine the concentration causing mortality in zebrafish embryos after 48 hours of exposure. The concentration range used in the acute test: 0, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L.

Then, we performed exposure tests to glyphosate for 10 days according to the NF ISO 12890¹² standard. The parameters determined from this test are: the percentage of mortality, the hatching rate, the percentage of cardiac arrest, the percentage of swimming zebrafish and malformations. The concentration range used in the test: 0, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L.

To assess long-term toxicity (30 days), chronic tests were performed according to the recommendations of the OECD 210²⁰ guideline. The parameters determined from this test were the same as described for the 10-day glyphosate exposure. The concentration range used in the test: 0, 1, 2, 3, 4 mg/L.

Statistic: For statistical interpretation of the results of this study, we used two software packages Probit (Probit version 1.5, USEPA, OH, USA) and Statistica (STATISTICA version 6 for Windows, Statsoft, Tulsa, OK, USA). Determination of significant differences between control groups and the different concentrations of glyphosate tested varied with the data. A parametric test, one-factor ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test and a non-parametric test, Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U test were used. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Acute effect of glyphosate on the study species *Danio rerio*: Figure 1 shows that the exposure of glyphosate for 48h has a toxic effect on the survival of fish *Danio rerio*. Compared to controls, the percentage of mortality, increases significantly with increasing levels of concentration of the herbicide, reaching 100% at the maximum concentration of 30 mg/L. Embryo coagulation is the most responsive aspect of mortality in all concentrations. For the other two types of mortality, heartbeat detection and tail detachment are expressed mostly for the maximum concentrations after 48h of glyphosate exposure (Figure 2).

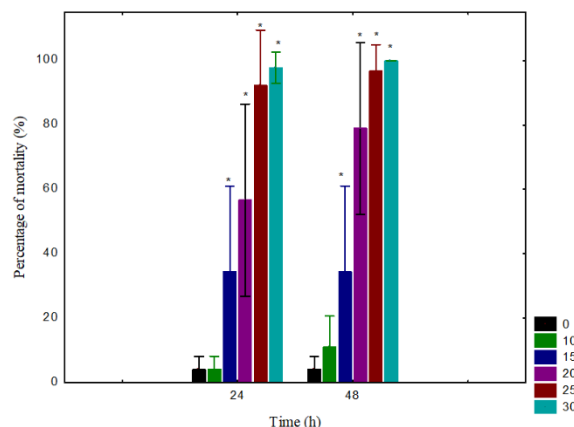


Figure 1: Effect of glyphosate on survival of *Danio rerio* after 48h of exposure

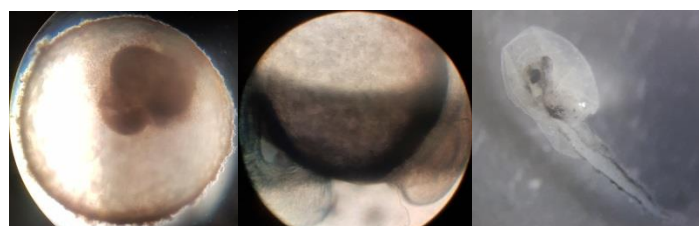


Figure 2: The appearances of mortality: coagulation - non-detachment of the tail - cardiac arrest

In addition, exposure time influences the toxicity of glyphosate to zebrafish. It was observed that the EC_{50} value decreased from 16.57 mg/L after 24 hours to 15.10 mg/L after 48 hours. For a short-term toxicity assessment of this pesticide, we defined the 10% inhibitory concentration of the *Danio rerio* fish population ($48h-EC_{10} = 10.79$ (9.05-12.06) mg/L), the minimum observed effect concentration (LOEC= 9.80 mg/L) and the maximum no-observed-effect concentration (NOEC= 8.20 mg/L).

Effect of glyphosate on *Danio rerio* during 10 days of exposure: The 10-day exposure to glyphosate has a toxic effect on the survival of the test organism. The performance of these toxicity tests for the survival parameter allowed us to define important concentrations for the evaluation of glyphosate toxicity. The effective concentration inhibiting 50% of the *Danio rerio* population for 10 days of exposure to glyphosate is 3.18 mg/L (0.96- 7.54). Compared to controls, the maximum tested no significant effect concentration (NOEC) of glyphosate is 0.30 mg/L and the minimum tested significant effect concentration (LOEC) of the herbicide is 1.02 mg/L.

It appears that 10-day exposure to glyphosate affects the hatch rate, heartbeat, and swimming of zebrafish. According to Figure 3, the percentage of hatching significantly decreases with increasing glyphosate concentrations, reaching 37.40% for the maximum concentration of 13 mg/L. Compared to controls, a significant delay in embryonic development was observed for the 13 mg /L concentration. Indeed, embryos died massively during the 3rd day of exposure for this concentration.

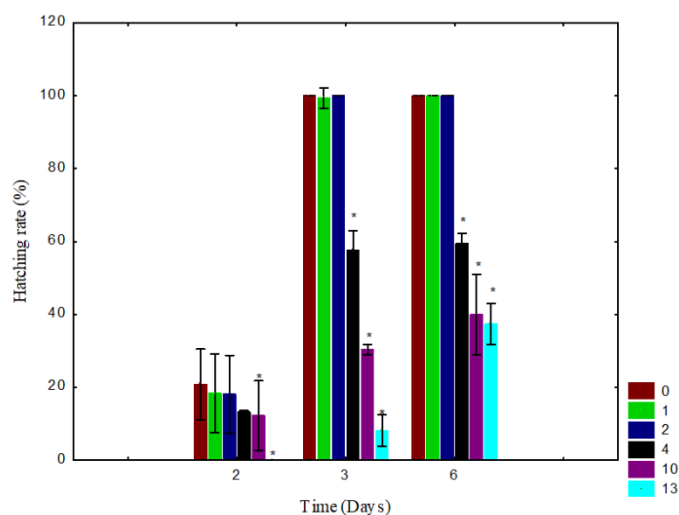


Figure 3: Embryo hatching rate (%) during 10 days of exposure to glyphosate (* $p < 0.05$)

During 10 days of exposure to glyphosate, the percentage of cardiac arrest increased significantly from the 10 mg/L concentration, reaching 38% for the maximum concentration of 13 mg/L (Figure 4). This effect was significant from the 2nd day of exposure for this concentration.

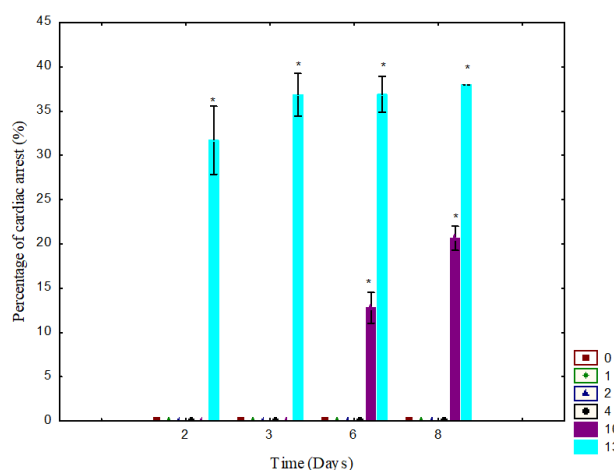


Figure 4: Percentage of cardiac arrest during 10 days of exposure to glyphosate (* $p < 0.05$)

Figure 5 shows that 10 days exposure to glyphosate has a toxic effect on the locomotor system of the fish *Danio rerio*. This effect is marked by a significant decrease in zebrafish swimming observed in the 10 mg/L and 13 mg/L concentrations as early as day 6. The fish swam slowly and settled to the bottom of the aquarium. For the 4 mg/L concentration, a significant reduction in swimming percentage was observed from day 8.

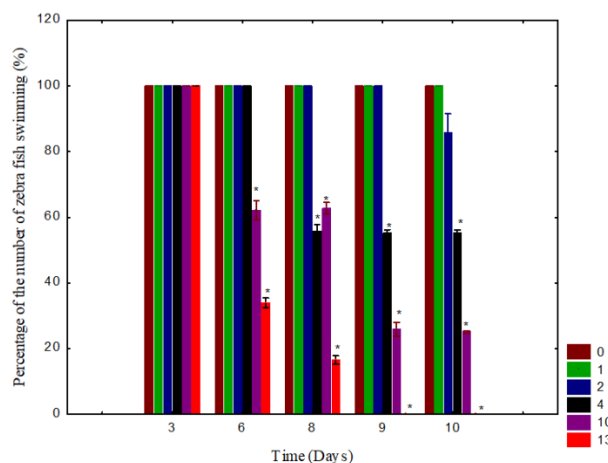


Figure 5: Percentage of the numbers of zebrafish swimming during 10 days of exposure to glyphosate (* $p < 0.05$)

Chronic effect of glyphosate on *Danio rerio*: The results of the chronic tests (30 days) show that exposure to glyphosate has a toxic effect on the survival of *Danio rerio* fish. This effect was significant for the highest concentration tested 4 mg/L (Table 1). Based on the results obtained, the effective concentration inhibiting 50% of the *Danio rerio* population exposed for 30 days to glyphosate was defined as 3.01 mg/L (2.55- 3.76). The maximum concentration of glyphosate tested without significant effect (NOEC) is 0.25 mg/L and the minimum concentration of the herbicide with significant effect (LOEC) is 1 mg/L.

From the results defined in Table 1, it appears that long-term exposure to glyphosate has a toxic effect on the hatching, heart rate and locomotor system of *Danio rerio* embryos. This effect is significant only for the maximum concentration 4 mg/L. A significant reduction in hatching rate was observed, reaching 60.25%, for the highest concentration. Compared to the controls, the percentage of fish swimming decreased significantly for the 4 mg/L concentration. *Danio rerio* fish swam slowly and settled to the bottom of the aquarium. For the cardiac arrest parameter, the percentage increased significantly reaching 53.01% for the maximum concentration.

Table 1: *Danio rerio* exposed to measured concentrations of glyphosate in a 30-day life study (values are means $\pm$ standard deviation) (* $p < 0.05$)

Glyphosate mg/L	Mortality (%)	Hatching rate (%)	Cardiac arrest (%)	Number of zebrafish swimming
0	1,11 $\pm$ 1,92	100 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
1	7,21 $\pm$ 0,97	100 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
2	31,00 $\pm$ 2,03	100 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	86,68 $\pm$ 1,42
3	38,14 $\pm$ 1,43	97,10 $\pm$ 1,21	88,98 $\pm$ 0,61	85,89 $\pm$ 1,25
4	72,12 $\pm$ 4,93*	60,25 $\pm$ 2,37*	53,01 $\pm$ 2,36*	45,21 $\pm$ 0,39*

The performance of toxicity tests for the hatching parameters, heart rate and locomotor activity, allowed us to define significant concentrations for the evaluation of the toxicity of glyphosate towards *Danio rerio* (Table 2).

Table 2: NOEC, LOEC, the effective concentrations (mg / L) and the 95% confidence limits after 30 days of exposure

Concentration/ Parameter	NOEC	LOEC	30 d-EC ₁₀	30 d-EC ₅₀
Hatching rate	2,24	2,71	3,00 (1,70-3,36)	4,29 (3,84-7,31)
Cardiac arrest	2,13	2,85	3,00 (2,65-3,20)	3,56 (3,37-3,78)
Numbers of zebrafish swimming	2,12	2,52	2,77 (1,82-3,11)	3,83 (3,51-4,59)

Malformations: During 10 days of exposure to glyphosate, significant malformations were observed in zebrafish at the highest concentration (13 mg/L) in the form of a curved tail or missing fins (Figure 6). The latter malformation has not been described in other scientific work. In addition, long-term exposure (30 days) revealed significant malformations detected in *Danio rerio* fish larvae in the form of tail curling at the 4 mg/L concentration.

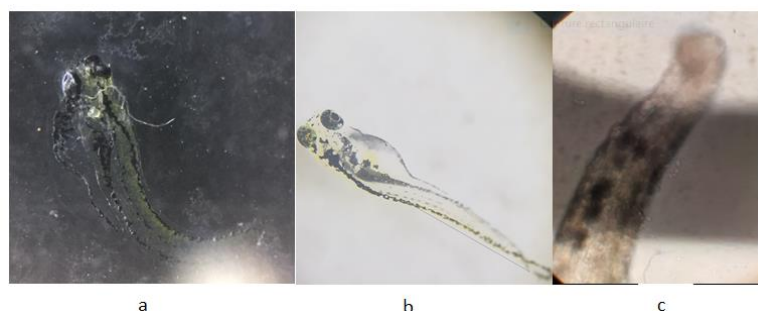


Figure 6: Malformations observed during 10 days of glyphosate exposure (a: no fin, b-c: tail bending)

Extensive use of pesticides can lead to their accidental introduction into fresh and marine surface waters. Several authors have evaluated the toxic effects of glyphosate exposure on the early life stages of different types of fish^{8, 16, 17}.

For a direct interpretation of the toxicity of glyphosate to *Danio rerio*, the 48h-EC₅₀ concentration was transformed into a toxic unit according to the formula of Sprague and Ramsey²⁶ ($TU = [1/EC_{50}] \times 100$). According to the Persoone et al²² classification, the short-term toxicity of glyphosate belongs to the 3rd class and presents an acute toxicity for the studied species ($TU_{-48h}=6.62$).

Comparing our results with those of the study by Rodrigues et al²⁴, acute exposure to Roundup Original (active ingredient glyphosate) is toxic to zebrafish with a 48h-EC₅₀ concentration of 17.50 mg/L. This value is more or less similar to the one defined in our work (48h-EC₅₀= 15.10 mg/L). Similarly, the invertebrate *Artemia salina* seems to have sensitivity towards glyphosate similar to our study with a 48h-EC₅₀ of 14.19 mg/L²⁴. Other species such as the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the invertebrate *Daphnia magna* appeared more sensitive to glyphosate than the zebrafish with a 48h-EC₅₀ of 8.9-8.1 mg/L^{10, 32}.

The studies of Sulukan et al²⁷ and Lanzarin et al¹⁵, show that exposure to glyphosate affects the hatching of *Danio rerio* fish. This is marked by a significant reduction in the hatching rate for maximum concentrations. The same effect is noted in our study, the decrease in hatching rate of zebrafish is significant at the highest concentration of 13 mg/L. On the other hand, the two studies Zhang et al³² and Schweize et al²⁵, show that exposure to high concentrations of glyphosate accelerated the hatching rate of zebrafish.

From the results obtained in our study, it appears that exposure to glyphosate affects the cardiac system of the species *Danio rerio*. The percentage of cardiac arrest increased significantly from the concentration of 10 mg/L, reaching 38% for the maximum concentration of 13 mg/L. The same effect was noted in the Lanzarin et al study¹⁵.

In the Zhang et al. study³², a 48-hour locomotion test showed that exposure of *Danio rerio* embryos to glyphosate significantly increased locomotor activities. These results are contradictory to those obtained in our work. Indeed, our results revealed that exposure to glyphosate significantly decreased locomotor activities of zebrafish especially at high concentrations.

The data obtained in the Sulukan et al²⁷ and Lanzarin et al¹⁵ studies showed that glyphosate treatment caused several types of malformations, especially those of the body. These malformations were most severe in embryos and larvae exposed to the highest concentrations. Based on the results of our tests (10 days of exposure), body malformations are also expressed for the high concentration (13 mg/L).

This work resulted in a chronic value for freshwater vertebrates (30d-EC₁₀ of 1.29 (0.78-1.65) mg/L) that can be used for the refinement of guide values for the protection of aquatic life. Based on European regulations, a PNEC (predicted no effect concentration) of 2.5µg/L was obtained by applying a safety factor of 100 on the mortality NOEC (0.25 mg/L). By comparing this value with that required by the French National Environmental and Occupational Health Safety Agency (PNEC = 60 µg/L)¹, the value of this study can be integrated to reduce the PNEC recommended by this agency and thus ensure the viability of *Danio rerio* and other aquatic species populations.

Finally, our observations of larval malformations during chronic exposure of zebrafish to glyphosate suggest the presence and long-term accumulation of an endocrine disrupting mechanism that affects the hormonal system regulating the physiological functions of *Danio rerio* that remains to be verified.

Conclusion

At the end of this study, we were able to evaluate several aspects of acute and chronic toxicity of the herbicide glyphosate on the species *Danio rerio*.

The exposure of zebrafish to this pesticide showed that it has a significant toxic effect on the survival of zebrafish with a 48h-CE₅₀ of 15.10 mg/L (13.82-16.32). A significant delay in hatching rate and a significant decrease in swimming embryos was observed at the maximum concentration of 4 mg/L. Significant malformations were detected in zebrafish at the highest concentration (13 mg/L) in the form of a curved tail or missing fin. This last malformation has not been described in other scientific works.

Finally, the contamination of aquatic environments by glyphosate can touch the balance of the entire aquatic ecosystem and also affect their biodiversity, which make eco-toxicological studies on chronic exposure to this herbicide important for the evaluation of the toxicity of these chemical substances.

Référence

1. ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail) : Phytopharmacovigilance- Synthèse des données de surveillance- Appui scientifique et technique n°2017-04 -Glyphosate, Parimage, (2019)

2. Battaglin W. A., Meyer M.T., Kuivila K.M. and Dietze J.E, Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation, *Journal of the American Water Resources Association*, **50(2)**, 275-290 (2014)
3. Baylis A. D., Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects, *Pest. Manag. Sci.*, **56**, 299-308 (2000)
4. Benbrook C. M., Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally, *Enviro. Sci Eur.*, **28(1)**, 3 (2016)
5. Borggaard O. K. and Gimsing A. L., Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review, *Pest. Manag. Sci.*, **64**, 441-456 (2008)
6. Díaz-Martín R. D. , Valencia-Hernandez J. D. , Betancourt-Lozano M. and Yanez-Rivera B., Changes in microtubule stability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after glyphosate exposure, *Heliyon* , **7(1)**, e06027 (2021)
7. Faria M., Bedrossiantz J., Ramírez J. R. R. , Mayol M. , García G. H. , Bellot M., Prats E. , Garcia-Reyero N. , Gómez-Canela C. , Gómez-Oliván L. M. and Raldúa D. , Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety, *Environ. Int.*, **146**, 106253 (2021)
8. Fiorino E., Sehonova P., Plhalova L., Blahova J., Svobodova Z. and Faggio C., Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **25(9)**, 8542-8549 (2018)
9. Giroux I., Présence de pesticides dans l'eau du Québec-Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya 2011 à 2014, Ministère du Développement durable de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques Québec, (2015)
10. Hansen L. R. and Roslev P., Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes, *Aquat. Toxicol.*, **179**, 36-43 (2016)
11. Horth H., Survey of glyphosate and AMPA in groundwaters and surface waters in Europe. Monsanto Europe, (2012)
12. ISO 12890 (International Standard Organization): Water Quality - Determination of Toxicity to Embryos and Larvae of Freshwater Fish—Semi-Static Method, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, (1989)
13. ISO 7346 (International Standard Organization): Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)] - Part 1: Static method, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, (1996)
14. ISO 15088 (International Standard Organization): Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*), International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, (2007)
15. Lanzarin G. A.B. , Felix L. M., Santos D., Venancio C. A.S. and Monteiro S. M., Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation Roundup® UltraMax - on the early zebrafish embryogenesis, *Chemosphere*, **223**, 514-522 (2019)
16. Li M.H., Ruan L.Y., Zhou J.W., YH F., Jiang L., Zhao H., Wang J.S., Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. *Aquat. Toxicol.*, **188**, 159-169 (2017)

17. Lopes F.M., Caldas S.S., Primel E.G., da Rosa C.E., Glyphosate adversely affect *Danio rerio* males: acetylcholinesterase modulation and oxidative stress, *Zebrafish*, **14**(2), 97-105 (2017)
18. Majewski M. S., Coupe R.H., Foreman W.T. and Capel P.D, Pesticides in Mississippi air and rain: A comparison between 1995 and 2007, *Environ. Toxicol. Chem*, **33**(6), 1283-1293 (2014)
19. Montiel-León J.M., Munoz G., Vo Du S., Do D.T., Vaudreuil M.A., Goeury K., Guillemette F., Amyot M. and Sauvé S., Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environ. Pollut.* **250**, 29-39 (2019)
20. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development): Fish, Early Life Stage Toxicity Test, OECD guidelines for testing of chemicals, Test No 210, Paris, France, (1992)
21. ONSSA (Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires), Retrait des pesticides à usage agricole à base de glyphosate en association avec le Co-formulant la POE-Tallowamine, (2018) Available from: <http://www.hortitecnews.com/wp-content/uploads/2018/03/501.pdf>
22. Persoone G., Marsalek B., Blinova I., Törökne A., Zarina D., Manusadzianas L., Nalecz-Jawecki G., Tofan L., Stepanova N., Tothova L. and Kolar B., A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters, *Envir. Toxi.*, **18** (6), 395-402 (2004)
23. Robichaud C.D. and Rooney R.C., Low concentrations of glyphosate in water and sediment after direct over-water application to control an invasive aquatic plant, *Water. Res.*, **188**, 116573 (2021)
24. Rodrigues L. D. B., Oliveira R. D., Abe F. R, Brito L. B., Moura D. S., Valadares M. C., Grisolia C. K., De Oliveira D. P. and De Oliveira G. A. R., Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: effects on different organisms. *Environ Toxicol Chem*, **36**(7), 1755-1763 (2017)
25. Schweizer M., Brilisauer K., Triebskorn R., Forchhammer K. and Köhler H.R., How glyphosate and its associated acidity affect early development in zebrafish (*Danio rerio*), *Peer.J.*, **7**, e7094 (2019)
26. Sprague J. B. and Ramsay B. A., Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon, *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **22**(2), 425-432 (1965)
27. Sulukan E., Kεoktürk M., Ceylan H., Beydemir S., Isik M., Atamanalp M. and Ceyhun S.B., An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Daino rerio*), *Chemosphere* **180**, 77-85 (2017)
28. Struger J., Van Stempvoort D.R. and Brown S.J., Sources of aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urban and rural catchments in Ontario, Canada: Glyphosate or phosphonates in wastewater?, *Environ. Pollut.*, **204**, 289-297 (2015)
29. Trudeau V. Rondeau M. and Simard A., Pesticides aux embouchures de tributaires du lac Saint-Pierre (2003-2008), Environnement Canada, Direction des sciences et de la technologie de l'eau, (2011)
30. Vereecken, H., Mobility and leaching of glyphosate: a review, *Pest Manag Sci.*, **61**, 1139-1151 (2005)

31. Zhang S., Xu J., Kuang X., Li S., Li X., Chen D., Zhao X. and Feng X., Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere*, **181**, 270–280 (2017)
32. Zhang Q., Qu Q., Lu T., Ke M., Zhu Y., Zhang M., Zhang Z., Du B., Pan X. , Sun L. and Qian H., The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth, *Environ. Pollut.*, **243**, 1106-1112 (2018)

IV-TOXICITE CHRONIQUE DU GLYPHOSATE CHEZ *DAPHNIA MAGNA* ET *DANIO RERIO* : ETUDE COMPARATIVE

(Chronic toxicity of glyphosate to *Daphnia magna* and *Danio rerio*: A comparative study)

Daphnia magna et *Danio rerio* sont les deux espèces les plus utilisées pour l'évaluation de la toxicité aquatique d'une substance chimique. L'objectif de cette étude est de comparer, en termes de survie, la sensibilité des deux espèces pour le glyphosate. Le test chronique sur *Daphnia magna* est conduit pour une durée d'exposition de 21 jours. Le test chronique sur *Danio rerio* est réduit de 30 à 21 jours d'exposition au herbicide testée. En admettant que les deux tests chroniques ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales, il apparaît que la survie était plus sensible chez les poissons zèbres avec une NOEC de 0,32 mg/L que les invertébrées daphnies avec une NOEC de 1.40 mg/L. Au cours de la dernière semaine d'exposition au glyphosate, les daphnies sont mortes massivement pour la concentration maximale 5.5 mg/L. La mortalité a augmenté d'une manière significative jusqu'à atteindre 100% pour la concentration maximale. Par rapport à *Daphnia magna*, la mortalité des poissons zèbres a augmenté aussi significativement jusqu'à atteindre 85,07% pour la plus forte concentration testée.

Cependant, la réduction du temps d'exposition à 21 jours a permis de constater que le test *Danio rerio* est le plus représentatif et permettrait de mieux avoir une idée sur l'écotoxicité des produits phytosanitaires comme le glyphosate et de dériver des concentrations protectrices pour toutes les composantes du milieu aquatique.

Ce travail a permis de dégager une valeur chronique pour les vertébrés de l'eau douce (21d-EC₁₀ de 1,39 (0,78-1,65) mg/L) qui peut être utilisé pour l'affinement des valeurs guides pour la protection de la vie aquatique. En se basant sur la réglementation européenne, on a pu obtenir une PNEC de 27,8µg/L en appliquant un facteur de sécurité de 50 sur la NOEC de la survie (1,39 mg/L).

En comparant cette valeur avec celle exigée par l'agence national de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (2019) (PNEC = 60 µg/L), la valeur de cette présente étude peut être intégrée pour réduire la PNEC préconisée par cette agence et assurer ainsi la viabilité des espèces aquatiques d'eau douce.

Chronic toxicity of glyphosate in *Daphnia magna* and *Danio rerio*: A comparative study

El Joumani H.*¹, El Alami M.² Naciri M.¹

¹Laboratory of Biodiversity Environment and Genome University Mohamed V Faculty of Science, Avenue Ibn Batouta, BP 1014, Rabat Morocco *e-mail: hind.eljoumani@gmail.com

²Laboratory of Hydro-biological Bacteriological analyzes and Ecotoxicology Office National of Electricity and Drinking water (ONEE), Avenue Belhassan El ouazzani BP.Chellah 10002, Rabat Morocco

ABSTRACT

The chronic toxicity of glyphosate, a systemic organochlorine herbicide, was evaluated on two species *Daphnia magna* and *Danio rerio*. These two species are widely used in bioassays and recommended by several international standards for the evaluation of the aquatic toxicity of a chemical. The first part of this study was devoted to the evaluation of the chronic toxicity of the studied herbicide according to the Moroccan standards ISO 10706 for daphnia and OECD 210 for zebrafish. The analysis of the test results revealed that glyphosate is toxic on the survival of both test organisms *Daphnia magna* and *Danio rerio*. Then, the second part was devoted to the comparison between these two freshwater species in order to determine their sensitivity to this pesticide and to define the most effective test in the term of the aquatic evaluation of the toxicity of glyphosate.

Key words: Glyphosate; *Danio rerio*; *Daphnia magna*; survival; sensitivity.

INTRODUCTION

In Morocco, agriculture occupies an important place in economic, social and environmental terms. The agricultural sector alone represents 12.8% of the national GDP between 2008 and 2018 (Rhalem, 2020).

As a developing country, Morocco's main concern is to achieve food self-sufficiency. The country is constantly developing the means and infrastructure necessary to improve its agricultural production systems.

According to statistics from the Office des Changes, the use of pesticides in Morocco has increased since 2005. The country imports 17,589 tons of phytosanitary products annually through approximately 70 phytosanitary companies (El Ouilani, 2011).

However, the intensive use of pesticides has revealed serious environmental consequences inherent to their misuse and irrational management. It has been estimated that less than 0.1% of pesticides used for different crops achieve their specific objectives, leaving large amounts of toxic waste free to move into different environmental compartments (Cattani et al., 2014; Nguyen et al., 2016).

Given its final receptacle status, the aquatic environment groups the ecosystems most affected, directly or indirectly, by the toxic effects of these plant protection products (Montiel-León et al., 2019; Robichaud et Rooney, 2021).

In Morocco, the regulation of the agricultural pesticide sector aims to ensure the effectiveness and use of plant protection products and to protect humans and their environment. These substances can only be imported or placed on the market after prior authorization from the Ministry of Agriculture, Maritime Fishing, Rural Development and Water and Forests (law n°42-95). Glyphosate-based products, with the exception of the one combining glyphosate with the co-formulant POE-Tallowamine (ONSSA, 2018), are still used in Morocco under the control of ONSSA.

In the last decade, glyphosate-based herbicides are the most widely used in the world (Baylis, 2000). Because of its non-selective nature, this herbicide is used in different crops (corn, cotton, cereals, legumes) as well as in pastures, forestry, vegetation control on industrial lands and for domestic maintenance (EPA, 1993; Cox, 2004; Benbroug, 2016; Tomlin, 2006; Soltani et al., 2013; Jaskulski et Jaskulska, 2014).

This herbicide has been the subject of much international concern regarding the carcinogenic risk of its active ingredient on human health. In January 2015, the administrative court of Lyon annulled the marketing authorization of Roundup Pro 360, which contains glyphosate.

Given the hazardous potential of glyphosate for wildlife, several studies have shown the toxic effect of this herbicide in living organisms at different levels of the trophic chain (bacteria, algae, crustaceans, amphibians and fish) (Folmar et al., 1979; Cuhra et al., 2013; Sihtmäe et al., 2013; Annett et al., 2014; Reno et al. 2018, Faria et al., 2021).

Freshwater invertebrates such as *Daphnia magna* represent the most sensitive taxon among aquatic organisms (Parrish et al., 1976). This species has been recommended as a standard test organism (Organization for Economic Cooperation and Development, 1998; U.S. Environmental Protection Agency, 2002). They have been widely used in bioassays to assess the aquatic toxicity of environmental samples, including wastes, pesticides, drugs and chemical effluents. (U.S. Environmental Protection Agency, 1989 ; Wu et al., 2011 ; Hansen et Roslev, 2016 ; Montassir et al., 2019).

Although *Daphnia magna* is the most adopted species in aquatic toxicity assessment since it is the most representative organism in freshwater (Parrish et al., 1976). The use of zebrafish is considered attractive because of the perfect knowledge of its embryonic development, the brevity of its life cycle and the transparency of its eggs.

Known for its great regenerative abilities, the zebrafish is widely described in scientific research. This species represents one of the three most used biological models in the framework of ecotoxic risk assessment of chemical substances (Pereira et al., 2010.) many authors have been interested in studying the toxic effect of glyphosate on the zebrafish in a

concern for the protection of human health and the environment (El Amrani, 2012; Bernut, 2014; Vincent, 2015; Faria et al., 2021).

The chronic toxicity of glyphosate to aquatic species, especially *Danio rerio*, is not fully documented and the few data are available. In the recent study, we investigated the chronic effects of glyphosate on the survival of *Daphnia magna*. In this work, we present the results obtained on *Danio rerio* after 21 days of exposure to glyphosate and a comparison of these results with those of *Daphnia magna*.

The aim of this work is the evaluation of the chronic toxicity of glyphosate in the context of a comparison of the sensitivity of the herbicide between the two species *Danio rerio* and *Daphnia magna*.

MATERIALS AND METHODS

Solution tested:

In this study, the glyphosate used is an aqueous solution of a herbicide that contains 480 g/L of glyphosate IPA salt sold in the Moroccan market under the authority of the company PROMAGRI (Casablanca, Morocco). The choice of this herbicide is due to its massive use by farmers and agricultural companies.

To prepare a stock solution of concentration (100 mg/L) of the commercial glyphosate, we took a volume of 20 μ L of the herbicide which we diluted directly in 100 mL of distilled water. As for the different dilutions, they are made with the rearing medium of each species. The stock solution (100 mg/L) is freshly prepared before each renewal of the test medium.

Chronic tests of the two species studied:

To evaluate the long-term toxicity of glyphosate on *Daphnia magna*, we performed the chronic test according to the recommendations of NM ISO 10706 (2014). *Daphnia* juveniles (<24h old) were obtained from a continuous culture maintained in our laboratory in aquaria with culture water prepared according to the ISO standard, pH 7.8 ± 0.2 , a temperature of $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a photoperiod of 16-h light/8-h dark. Cladocerans were fed daily with a natural food consisting of algal culture (107 cells of *Scenedesmus subspicatus* / day /daphnia) and a synthetic food (50 μ l of Tetramin solution). The culture medium was renewed three times a week.

To assess the chronic toxicity of the pesticide on *Danio rerio*, the tests are performed according to the OECD 210, 2013 guideline. The eggs were obtained from a continuous culture maintained in our laboratory in aquaria with dechlorinated water, pH 7.8 ± 0.2 , temperature $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and photoperiod 16-h light/8-h dark. The zebrafish are fed daily with a natural food made of daphnia and a synthetic food (1g/60 fish/day). Once a month the water in the zebrafish aquaria was completely renewed. The duration of the test was reduced from 30 days to 21 days.

Statistic:

For statistical interpretation of the results of this study, we used two software packages Probit (Probit version 1.5, USEPA, OH, USA) and Statistica (STATISTICA version 6 for Windows, Statsoft, Tulsa, OK, USA)). The determination of significant differences between the control groups and the different concentrations of glyphosate tested varies according to the data. If the conditions are met, a parametric, one-factor ANOVA test is used, followed by Dunnett's post hoc test. On the other hand, if one of the conditions is not established, a non-parametric test is used, the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U test. The statistical significance is established at $p < 0.05$.

RESULT

Chronic toxicity of glyphosate on *Daphnia magna* survival

It appears that long-term (21 days) exposure to glyphosate has a toxic effect on the survival of the study species. This effect is significant for the three concentrations tested 3.5, 4.5 and 5.5 mg/L.

Indeed, the percentage of inhibition increases significantly, with the increase of the concentrations of glyphosate, until reaching 100% for the maximum concentration 5.5 mg/L. For this concentration, the mothers died massively during the last 6 days of exposure. Compared to controls, *Daphnia magna* mortality was not significant at low concentrations.

The chronic tests for the survival parameter allowed us to define four important concentrations for the evaluation of the aquatic toxicity of glyphosate (Table 1).

Tableau 1: NOEC, LOEC and the effective dose-response parameters (mg / L) and their 95% confidence limits after 21 days of exposure

Concentration	NOEC	LOEC	EC ₁₀	EC ₅₀
Valeur (mg/L)	1.40	1.65	1,71 (0,84-2,25)	3,13 (2,45-3,84)

Chronic toxicity of glyphosate on the survival of *Danio rerio*

The evaluation of the results obtained from the chronic tests (21 days) show that the exposure to glyphosate has a toxic effect on the survival of the species *Danio rerio*. This effect is significant only for the two concentrations tested 4.5 and 5.5 mg/L. A significant increase in the percentage of mortality is observed with increasing concentrations of glyphosate, reaching 85.07% for the maximum concentration 5.5 mg/L.

Based on the results obtained from the tests performed on control embryos, the NOEC, LOEC, 21d-EC10 and 21d-EC50 were determined (Table 2).

Table 2: NOEC, LOEC, the effective concentrations (mg / L) and the 95% confidence limits after 21 days of exposure

Concentration	NOEC	LOEC	EC ₁₀	EC ₅₀
Valeur (mg/L)	0,32	1,89	1,39 (0,78-1,65)	3,24 (2,59- 3,99)

Comparison of chronic effects of glyphosate on *Daphnia magna* and *Danio rerio*

The chronic tests performed for the two biological models used in this study, followed the same conditions with an equivalent range of glyphosate concentrations (0; 1.5; 2.5; 3.5; 4.5; 5.5) and an exposure time of 21 days. Dose-response relationships on survival were recorded for *Daphnia magna* during the second week of exposure, while relationships for *Danio rerio* only during the third week of exposure. Although survival of *Daphnia* was already affected at 5.5 mg/L after 6 days of exposure, mortality at lower concentrations occurred much later, after 15 days of exposure.

During the last week of exposure to glyphosate, daphnids died massively for the maximum concentration 5.5 mg/L. Mortality increased significantly until it reached 100% for the maximum concentration. Compared to *Daphnia magna*, zebrafish mortality also increased significantly up to 85.07% for the highest concentration tested. From Tables 1 and 2, the 21d-NOEC value for survival on *Daphnia magna* was 1.40 mg/L and that of *Danio rerio* was 0.32 mg/L.

DISCUSSION

Dose-response or exposure-response or simply written dose-response expresses the relationship between changes in physiological functions of the organism (response) and the amount of exposure to a substance (dose). This study clearly showed that the toxicity of glyphosate to both organisms *Daphnia magna* and *Danio rerio* increases with time of exposure and increasing concentration tested.

The stability of the aquatic ecosystem depends on which species are most sensitive to pollutants. For this reason, the determination of reference values such as NOEC and LOEC is very useful because they allow the determination of discharge standards for different potentially polluting substances. Assuming that the two chronic tests were performed under the same experimental conditions, it appears that survival was more sensitive in zebrafish with a NOEC of 0.32 mg/L than the invertebrate *Daphnia* with a NOEC of 1.40 mg/L.

Similarly, the comparison between the two species studied showed that for the survival parameter, the vertebrate *Danio rerio* was more sensitive than *Daphnia magna* with a

calculated EC10 value of 1.39 (0.78-1.65) mg/L. This may be explained by the permeability of the zebrafish egg chorion to toxicants.

Generally, Cladocerans, and especially *Daphnia magna*, have been widely used in aquatic toxicology tests. These species represent one of the three most widely used biological models, along with algae and fish, in the ecotoxic risk assessment of chemicals (Pereira et al., 2010). These invertebrates appear to be the most sensitive and representative freshwater taxon among aquatic organisms (Parrish et al., 1976).

In this present study, the results showed that the evaluation of the chronic toxicity of glyphosate based on the same exposure time (21 days), allowed us to find that the species *Danio rerio* is more sensitive than *Daphnia magna*. Thus, the use of zebrafish for the study of chronic toxicity allows to approach the long-term effects of this kind of pollutant. This aquatic vertebrate appears to be the most representative organism in freshwater for the chronic assessment of organophosphate pesticides such as glyphosate.

This work resulted in a chronic value for freshwater vertebrates (21d-EC10 of 1, 39 (0.78-1.65) mg/L) that can be used for the refinement of guide values for the protection of aquatic life. Based on European regulations, a PNEC of 27.8µg/L was obtained by applying a safety factor of 50 on the survival NOEC (1.39 mg/L).

By comparing this value with the value required by the National Environmental and Occupational Health Safety Agency 2019 (PNEC = 60 µg/L), the value of this study can be integrated to reduce the PNEC recommended by this agency and thus ensure the viability of freshwater aquatic species.

CONCLUSION

Daphnia magna and *Danio rerio* are the two most used species for the evaluation of the aquatic toxicity of a chemical substance. The chronic test on *Danio rerio* is reduced for an exposure duration of 21 days. The two chronic tests were performed under the same experimental conditions, our results show that survival was more sensitive in zebrafish with a NOEC of 0.32 mg/L than invertebrate daphnia with a NOEC of 1.40 mg/L. This study allowed us to derive a chronic value for freshwater vertebrates (PNEC=27.8µg/L) that can be used to derive protective concentrations for all components of the aquatic environment.

REFERENCE

1. Agence national de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail : Synthèse des données de surveillance Appui scientifique et technique n°2017-04 -Glyphosate .Juillet (2019).
2. Annett, R., H.R. Habibi and A.H. Hontela: Impact of glyphosate and glyphosatebased herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.*, **34**(5), 458-479 (2014).
3. Baylis, A.: Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest. Manag. Sci.*, **56**, 299-308 (2000).

4. Benbrook, C. M.: Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Enviro. Sci. Euro.*, **28 (1)**, 3 (2016).
5. Bernut, A. : Pertinence du modèle d'infection *Danio rerio* pour l'étude immunopathologique de Mycobacterium abscessus. Thèse de doctorat en Biologie Santé. Ecole Doctorale, Montpellier, (2014).
6. Cattani, D., D. L. Oliveira, V.L. Cavalli, C.E. Heinz Rieg, J.T. Domingues, T. Dal-Cim, C.I. Tasca, F.R. Mena Barreto Silva and A. Zamonier : Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology*, **320**, 34-45 (2014).
7. Cox, C.: Herbicide factsheet Glyphosate. *Jour. of Pest. Ref.*, **24(4)**, 10-15 (2004).
8. Cuhra, M., T. Traavik and T. Bohn: Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, **22(2)**, 251-262 (2012).
9. El Amrani, S., M. Pena, J. Sanz-Landaluze, L. Ramos, J. Guinea and C. Cámara: Bioconcentration of pesticides in zebrafish eleutheroembryos (*Danio rerio*). *Sci. Total. Environ.*, **425**, 184-90 (2012).
10. El Ouilani, B. : Article sur le marché des produits phytosanitaires au Maroc. *CropLife Maroc* (2011). Accessible http://www.croplife.ma/Pdf/Article_sur_le_marche_phytosanitaire_au_Maroc.mai_2011.pdf
11. Environmental Protection Agency (EPA) : Facts. Glyphosate. Washington, D. C. États Unis. (1993). Accessible www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-417300_1-Sep-93.pdf.
12. Faria, M., J. Bedrossiantz, J. R. R. Ramírez, M. Mayol, G. H. García, M. Bellot, E. Prats, N. Garcia-Reyero, C. Gómez-Canela, L. M. Gómez-Oliván and D. Raldúa: Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety, *Environ. Int.*, **146**, 106253 (2021).
13. Folmar, L.C., H.O. Sanders and A.M. Julin: Archives of Environmental Contamination and Toxicology Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contain. Toxicol.*, **8**, 269-278 (1979).
14. Hansen, L.H. and P. Roslev: Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquat. Toxicol.*, **179**, 36-43 (2016).
15. ISO 7346 (International Standard Organization): Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)-. International Organization for Standardization, Geneve, Switzerland, (2014).
16. Jaskulski, D. and I. Jaskulska: The effect of pre-harvest glyphosate application on grain quality and volunteer winter wheat. *Romanian Agricultural Research*, **31**, 1222-4227 (2014).
17. Montassir, L., I. Berrebaan, M.M. Ennaji and H. Bessi : Acute and Reprotoxicity Assessment of Technical Grade and Commercial Formulation of Malathion on

- Daphnia magna*. *Journal of Environmental Chemistry and Toxicology*, **23** (2), 105-113 (2019).
18. Montiel-León, J., M. Gabriel, V. Sung, T. Dat, V. Marc-Antoine, G. Ken, G. François, A. Marc, and S. Sébastien: Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environ. Pollut.*, **250**, 29-39 (2019).
 19. Nguyen, M.H., T.H.N. Nguyen, I.C. Hwang, C.B. Bui and H.J. Park : Effects of the physical state of nanocarriers on their penetration into the root and upward transportation to the stem of soybean plants using confocal laser scanning microscopy. *Crop Protection*, **87**, 25-30 (2016).
 20. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development): Fish Embryo Toxicity (FET) Test. OECD guidelines for testing of chemicals, Test No 236, Paris, France, (2013)
 21. Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires (ONSSA). Retrait des pesticides à usage agricole à base de glyphosate en association avec le Co-formulant la POE-Tallowamine (2018). Accessible <http://www.hortitecnews.com/wp-content/uploads/2018/03/501.pdf>
 22. Parrish, P., S. Schimmel, D. Hansen, J. Patrick and J. Forester: Chlordane: effects on several estuarine organisms. *Jour. of Toxicol. and Enviro. Heal.*, **1**, 485-494 (1976).
 23. Pereira, J. L., J.H.Christopher, R. M. Sibly, V.N. Bolshakov, F. Gonçalves, L.H. Heckmann and A. Callaghan: Gene transcription in *Daphnia magna*: Effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide. *Aquat. Toxicol.*, **97**(3), 268-276 (2010).
 24. Reno, U., S.R. Doyle, F.R. Momo, L. Regaldo and A.M. Gagneten: Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species . *Ecotoxicologie*, **27**(7), 784-793 (2018).
 25. Rhalem, N. : Etude sur les pesticides hautement dangereux (hhps) au Maroc. *Amsetox Maroc* (2020). Accessible https://ipen.org/sites/default/files/documents/resume_executif_etude_sur_les_pesticides_hautement_dangereux_maroc_final_6_juin_2020.pdf.
 26. Robichaud, C. and R. Rooney: Low concentrations of glyphosate in water and sediment after direct over-water application to control an invasive aquatic plant. *Wat. Res.*, **188**, 116573 (2021).
 27. Sihtmäe, M., I. Blinova, K. Kunis-Beres, L. Kanarbik, M. Heinlaan and A. Kahru: Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology*, **72**, 215-224 (2013).
 28. Soltani N., R. Blackshaw, R. Gulden, L. C. Gillard, C. Shropshire and P.H. Sikkema: Desiccation in dry edible beans with various herbicides. *Canadian Journal of Plant Science*, **93**(5), 871-877 (2013).
 29. Tomlin, C. D. S.: The pesticide manual: A world compendium (14e édition), Hampshire, British Crop Protection Council, (2009)

30. U.S. Environmental Protection Agency: Chlordane/Heptachlor termiticides; notification of cancellation and amendment of existing stocks determination. Fed Reg 53: 11798-1 1805, (1988).
31. U.S. Environmental Protection Agency: Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA-821-R-02-012, (2002).
32. U.S. Environmental Protection Agency: Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-89/001, 249 (1989).
33. Vincent, L. F. : Approche in vivo/in vitro du métabolisme de perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat en Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition .École doctorale Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries, Toulouse, (2015).
34. Wu, S.G., L.P. Chen, C.X. Wu, T. Cang, R.X. Yu and X.P. Zhao: Acute toxicity and safety of four insecticides to aquatic organisms. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, **23 (1)**, 101-106 (2011).

DISCUSSION

DISCUSSION

Cette présente étude a été consacré à l'évaluation du risque du glyphosate pour le milieu aquatique à travers des essais de toxicité chronique sur deux espèces d'eau douce *Daphnia magna* et *Danio rerio*. De même, Les effets de l'herbicide ont été évalués sur quatre générations successives afin de déterminer le développement de la toxicité sur la descendance des daphnies. La comparaison de la sensibilité, à la toxicité de ce produit phytosanitaire, entres les deux modèles biologiques a été également étudiée.

Une enquête concernant l'usage des pesticides et surtout l'herbicide glyphosate ont été menés pour collecter le maximum d'information sur l'usage de ces produits phytosanitaires dans la Région Rabat-Salé-Kénitra.

Ces résultats mettent en évidence :

- Utilisation du glyphosate sous de sel d'isopropylamine dans la Région Rabat-Salé-Kénitra,
- La relation effet-dose-temps dans l'expression de la toxicité aiguë et chronique du glyphosate,
- La forte toxicité du glyphosate pour les poissons zèbres par rapport aux autres taxons,
- La sensibilité de *Danio rerio* par rapport *Daphnia magna* pour le paramètre de survie,
- La présence de malformations aux fortes doses testées,
- L'augmentation de la toxicité du glyphosate dans la 4^{ème} génération par rapport à la génération parentale,
- L'utilité de réduire les essais de toxicité pour *Danio rerio* de 30 à 21 jours.

Quatre grands points vont être discutés :

- L'utilisation du glyphosate par les agriculteurs dans la région Rabat-Salé-Kénitra.
- L'évaluation du danger du glyphosate pour les organismes aquatiques à travers l'étude de sa toxicité sur *Daphnia magna* et *Danio rerio*,
- L'évolution de la toxicité du glyphosate sur quatre générations successives chez *Daphnia magna*,
- La comparaison de la sensibilité de deux organismes d'eau douce: *Daphnia magna* et *Danio rerio* vis-à-vis de la toxicité du glyphosate.

Le glyphosate est un herbicide qui a été largement utilisé pour le désherbage agricole et l'entretien des espaces urbains et industriels. En agriculture, le glyphosate permet de lutter contre les adventices et représente un moyen de désherbage efficace, sûr et économique depuis plus de 40 ans. En Janvier 2015, le tribunal administratif de Lyon a annulé l'autorisation de la commercialisation du Roundup Pro 360 qui contient du glyphosate (OMS, 2015). Ce produit phytosanitaire a fait objet d'une grande problématique internationale concernant le risque cancérigène de son principe actif sur la santé humaine. Malgré la classification de l'OMS du glyphosate comme agent "probablement cancérigène" pour les humains, ce produit continue à être utilisé par plusieurs pays notamment le Maroc. De ce fait, l'évaluation de risque du glyphosate pour l'environnement et la santé humaine est devenue nécessaire afin de déterminer les concentrations protectrices pour les différentes composantes de l'écosystème. Les données de toxicité disponibles dans la littérature scientifique se basent surtout sur la toxicité aiguë de ce pesticide. Les rares études sur la toxicité chroniques se sont focalisées sur quelques organismes, et surtout les cladocères. Cependant, la sensibilité des vertébrés semblerait être supérieure à celle des invertébrés hébergeant le milieu aquatique.

Le présent travail a été consacré à l'étude :

- du mode d'utilisation des pesticides surtout l'herbicide glyphosate par les agriculteurs de la région Rabat-Salé-Kénitra.
- de la toxicité aiguë et chronique du glyphosate. Les concentrations testées sont obtenues à partir de dilutions d'une solution aqueuse d'un herbicide contenant 480g/L de glyphosate.

Usage du glyphosate dans la région Rabat-Salé-Kénitra :

La majorité des agriculteurs interrogés lors de nos enquêtes ne connaissent pas la manière exacte d'utilisation des pesticides et les précautions à prendre lors de la manipulation de ces substances chimiques. Le taux élevé d'analphabétisme chez cette population (62%), combiné à un manque de conscience, pourrait être la cause du manque de considération de la précaution d'emploi de ces produits phytosanitaires ce qui menace la durabilité de l'agriculture dans la région Rabat-Salé-Kénitra. Le non-respect des agriculteurs de la dose prescrite pour chaque pesticide favorise le développement de population résistante d'organismes nuisibles (SAGE Pesticides, 2011). Les pesticides deviendront de moins en moins efficaces ce qui poussera les agriculteurs à mettre une quantité additionnelle.

Plusieurs études ont rapportés les effets toxiques aigus des humains à l'exposition aux pesticides pouvant prendre de nombreuses formes. Les symptômes les plus souvent décrites correspondent à des lésions, des irritations, des maux de tête, des nausées, des vomissements, de la fatigue, des étourdissements, des troubles neurologiques, de la perte d'appétit (Renault-Roger, 2005), des maladies dont le cancer, des effets sur la reproduction, des perturbations au système endocrinien, immunitaire et neurologique (Giroux, 2004).

Ces pratiques irrationnelles constituent un réel danger pour l'environnement. Par ailleurs, la présence de ces substances dans les milieux aquatiques est possible sous influence de précipitations et lessivage. Les espèces aquatiques peuvent être susceptibles aux effets cumulatifs des mélanges des quantités de déchets toxiques libres se retrouvent dans l'eau (Nguyen *et al.*, 2016). Si on prend l'herbicide glyphosate comme un exemple, plusieurs études ont montré que ce pesticide a été détecté dans des eaux naturelles soit de surfaces ou souterraines de plusieurs pays (Trudeau *et al.*, 2011 ; Horth, 2012 ; Majewski *et al.*, 2014 ; Giroux, 2015). Par ailleurs, des effets indésirables du glyphosate ont été observés chez des organismes vivants à différents niveaux de la chaîne trophique (les bactéries, les algues, les crustacés, les amphibiens et les poissons) (Folmar *et al.* 1979 ; Cuhra *et al.* 2013; Sihtmäe *et al.* 2013 ; Annett *et al.*, 2014 ; Reno *et al.* 2018). Ce pesticide peut inhiber des enzymes spécifiques chez les invertébrés tels que le phosphoénolpyruvate (Tu *et al.*, 2001), le phosphatase (Ørsted et Roslev, 2015) et peut également altérer l'expression de gènes sensibles au stress (Le *et al.*, 2010). Son exposition peut causer un stress oxydatif, une inhibition de l'acétylcholinestérase et augmente la sensibilité aux infections parasitaires (Annett *et al.*, 2014).

Evaluation du danger du glyphosate pour les espèces aquatiques :

La présence du glyphosate dans les milieux aquatiques est possible (Robichaud and Rooney, 2021) sous influence de précipitations (Vereecken, 2005; Borggaard et Gimsing, 2008) de pulvérisation accidentelle et de ruissellement des terres agricoles (Montiel-León *et al.*, 2019 ; Struger *et al.*, 2015) . Plusieurs études ont montré que le glyphosate a été détecté dans des eaux naturelles soit de surfaces ou souterraines de plusieurs pays.

En Europe, plusieurs pays ont détectés le glyphosate dans les eaux naturelles à une fréquence parfois très élevée jusqu'à 92,5 et 100 % (Horth, 2012). La même situation en Amérique du Nord, le glyphosate est généralement retrouvé à de plus fortes concentrations dans les eaux de surface jusqu'à 427 et 397 µg/l (Scribner *et al.*, 2007).

Toxicité aiguë du glyphosate :

Une relation de dose-effet-temps des modèles biologiques testés, à la toxicité aiguë du glyphosate, a été remarquée lors des essais à court terme. En effet, la toxicité est accentuée avec l'augmentation du temps d'exposition. Pour les daphnies, la valeur EC₅₀ -24h est de 9.53 mg/ L alors qu'elle diminue à 8.61 mg/ L après 48 heures d'exposition. Pour les poissons zèbres, la valeur de la CE₅₀ a diminué de 16,57 mg/L après 24 heures à 15,10 mg/L après 48 heures.

Diverses études ont rapporté l'effet aigue du glyphosate sur les daphnies (Tableau 15). Cette toxicité est définie par une immobilité significative des juvéniles durant 48 heures d'exposition au pesticide.

En comparant nos résultats avec ceux de l'étude de Hansen et Roslev (2016), on trouve une 48h-EC₅₀ de 8,9 mg/L similaire à celle définie dans notre travail. De même, l'étude de Cuhra *et al.* (2012) montre que trois différents clones de *Daphnia magna* testés pour Roundup (principe actif glyphosate) ont une valeur de 48h-EC₅₀ qui est à l'intérieur de cet intervalle de 3,7 à 10,6 mg/L.

D'autres études décrites dans le tableau 15, la 48h-EC₅₀ n'est pas la même trouvée dans cette présente étude. Ceci peut être expliqué par la forme et pureté du glyphosate étudié.

De même, le temps d'exposition augmente la toxicité du glyphosate vis-à-vis *Daphnia magna*. Dans l'étude Sarigul et Beckan, la concentration effective inhibant 50% des daphnies ont diminué significativement, comme nous l'avons noté dans notre travail, passant de 0,019 mg/L après 24 heures à 0,012 mg/L après 48 heures.

Tableau 14: Vue d'ensemble des données relatives aux effets de glyphosate sur *Daphnia magna* rapportées dans littérature

Auteur	Produit utilisé (quantité de glyphosate)	Année	48h-EC ₅₀ (mg/L)
Folmar et al.	Roundup (360,32 g/L)	1979	3,0
Sarigul et Beckan	Roundup (48%)	2009	0,012
Cuhra et al.	Glyphosate IPA salt (40%) / Roundup (18%)	2012	1,4–7,2/ 3,7–10,6
Hansen et Roslev	Glyphosate IPA salt (40%)	2016	8,9

Selon l'étude Zhang et al. (2018), la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* a une sensibilité vers le glyphosate (95 % pureté) semblable que les daphnies avec une 48h-EC₅₀ de 8,1 mg/L (Tableau 16).

D'autres espèces telles que les invertébrés d'eau salée (Tsui et Chu , 2003), sont apparus plus sensible au Roundup (41% de glyphosate) que les daphnies avec une 48h-IC₅₀ de 1,77 mg/L pour l'espèce *Acartia tonsa* et 48h-IC₅₀ de 5,00 mg/L pour l'espèce *Euplotes vannus* .

Le poisson *Clarias gariepinus* avec une 96h-CL₅₀ de 300 mg/L (Erhunmwunse et al., 2018), le crustacé *Gammarus pseudolimnaeus* avec une 48h-CE₅₀ de 62 mg/L et la larve de *Chironomus plumosus* avec une 48h-CE₅₀ de 18 mg/L (Folmar et al., 1979) sont plus résistants au glyphosate que *Daphnia magna*.

Tableau 15: Vue d'ensemble des données relatives aux effets de glyphosate sur différentes espèces rapportées dans littérature

Espèce	Substance	Concentration effective (mg/L)	Auteur	Année
<i>Clarias gariepinus</i>	Glyphosate IPA-salt (360 g/l)	96h-CL ₅₀ =300	Erhunmwunse et al.	2018
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Glyphosate	48h-EC ₅₀ = 8,1	Zhang et al.	2018
<i>Daphnia magna</i> <i>Gammarus pseudolimnaeus</i> Larve de <i>Chironomus plumosus</i> <i>Salmo gairdneri</i> <i>Pimpehales promelas</i> <i>Ictalurus punctatus</i> <i>Lepomis macrochirus</i>	Round up (360,32 g/L)	48h-EC ₅₀ = 3,0 48h-EC ₅₀ = 62 48h-EC ₅₀ = 18 24h-EC ₅₀ = 8,3 24h-EC ₅₀ = 2,4 24h-EC ₅₀ = 13 24h-EC ₅₀ = 6,4	Folmar et al.	1979

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont évalué les effets toxiques de l'exposition au glyphosate sur les premiers stades de vie de différents types de poissons (Li *et al.* , 2017 ; Lopes *et al.*, 2017; Fiorino *et al.*, 2018).

En comparant nos résultats avec ceux de l'étude de Rodrigues *et al.* (2016), l'exposition aigue au Roundup Origina (principe actif glyphosate) est toxique pour le poisson zèbre avec une concentration 48h-EC₅₀ de 17.50 mg/L. Cette valeur est plus ou moins similaire à celle définit dans notre travail (48h-EC₅₀= 15.10 mg/L).

De même, l'invertébré *Artemia salina* semble avoir une sensibilité vers le glyphosate semblable à celle de notre étude avec une 48h-EC₅₀ de 14.19 mg/L (Tableau 17).

D'autres espèces telles que la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* sont apparus plus sensible au glyphosate que le poisson zèbre avec une 48h-EC₅₀ de 8.1 mg/L (Tableau 17).

Tableau 16: Aperçu des études sur l'effet du glyphosate après 48 heures d'exposition

Auteur	Produit utilisé	Espèce	48h-EC ₅₀ (mg/L)	Année
Rodrigues <i>et al.</i>	Roundup Origina (48%)	<i>Artemia salina</i>	14,19	2016
Zhang <i>et al.</i>	Glyphosate (95%)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	8,1	2018

Toxicité chronique du glyphosate :

Les résultats du test chronique ont montré que la reproduction est le paramètre le plus sensible au glyphosate pour les daphnies. En effet, la diminution significative de ce paramètre commence à partir de 3,5 mg/L. Le paramètre le plus sensible dans la reproduction est le nombre de ponte. La EC₁₀ 21j pour ce paramètre est de 2,30 (0,33-3,13) mg/L.

L'étude Cuhra *et al.*, 2012, démontre que l'exposition chronique durant 15 jours du glyphosate a des effets néfastes sur la survie et la reproduction des daphnies. Ceci est marqué par une réduction significative de la survie et la reproduction dès la concentration de 4,05 mg /L de glyphosate. Le même effet est remarqué lors de notre étude, la mortalité et la diminution des paramètres de la fécondité des daphnies est significative à la concentration 4,5 mg/L.

Les résultats des tests chroniques (30 jours) montrent que l'exposition au glyphosate à un effet toxique sur la survie l'éclosion, le rythme cardiaque et le système locomoteur des embryons des poissons *Danio rerio*. Cet effet est significatif seulement pour la plus forte concentration testée 4 mg/L.

Tableau 17: *Danio rerio* exposé à des concentrations mesurées du glyphosate pendant 30 jours (values are means $\pm$ standard deviation) (* $p < 0.05$)

Glyphosate mg/L	Mortalité (%)	Taux d'éclosion (%)	Pourcentage cardiaque (%)	Nombre de poison nageant
0	1,11 $\pm$ 1,92	100 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
1	7,21 $\pm$ 0,97	100 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
2	31,00 $\pm$ 2,03	100 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	86,68 $\pm$ 1,42
3	38,14 $\pm$ 1,43	97,10 $\pm$ 1,21	88,98 $\pm$ 0,61	85,89 $\pm$ 1,25
4	72,12 $\pm$ 4,93*	60,25 $\pm$ 2,37*	53,01 $\pm$ 2,36*	45,21 $\pm$ 0,39*

Les deux études Sulukan et al. (2017) et Lanzarin et al. (2019), démontrent que l'exposition au glyphosate affecte l'éclosion des poissons *Danio rerio*. Ceci est marqué par une réduction significative du taux d'éclosion pour les concentrations maximales. Le même effet est remarqué lors de notre étude, la diminution du taux d'éclosion des poissons zèbres est significative à la plus forte concentration 4 mg/L.

Par contre, les deux études Zhang et al. (2018) et Schweize et al. (2019), démontrent que l'exposition à des concentrations fortes de glyphosate à accélérer le taux d'éclosion des poissons zèbres.

D'après les résultats obtenus dans notre étude, il apparaît que l'exposition au glyphosate affecte le système cardiaque de l'espèce *Danio rerio*. Le même effet est remarqué dans l'étude Lanzarin et al. (2019).

Dans l'étude Zhang et al. (2018), un test de locomotion a montré que l'exposition des embryons *Danio rerio* au glyphosate a augmenté de manière significative les activités locomotrices. Ces résultats sont contradictoires à ceux obtenus dans notre travail. En effet, nos résultats ont révélé que l'exposition au glyphosate diminue significativement les activités locomotrices des poissons zèbres surtout aux fortes concentrations.

Les données obtenues dans les études Sulukan et al. (2017) Lanzarin et al. (2019) ont montré que le traitement au glyphosate provoquait plusieurs types de malformations, notamment celles du corps. Ces malformations étaient plus graves chez les embryons et les larves exposés aux concentrations maximales.

En se basant sur les résultats de nos tests les malformations corporelles s'expriment aussi pour la forte concentration testée dans notre étude.

Evaluation du risque du glyphosate pour le milieu aquatique :

Plusieurs instances internationales ont élaborées des valeurs guides pour la protection de la vie dans les milieux aquatiques en utilisant les différentes données existantes sur la toxicité du glyphosate dans la littérature scientifique.

Pour la protection des espèces aquatiques d'eau douce, la valeur guide est évaluée à 80 ng/L pour la protection de 95% des espèces et à 30 ng/l pour la protection de 99% des espèces en Australie et New Zélande (Anzecc et Armcanz, 2000).

Pour protéger la vie aquatique dans l'eau douce, l'US EPA a estimé une valeur aiguë finale de 0,0043 µg/L sur 24 heures en moyenne, et une concentration qui n'excède pas 2,4 µg/L à tout moment. Une valeur chronique finale a été calculée à 0,17 µg/L par la division de la valeur aiguë finale (2,4 µg/L) sur le ratio aigu chronique (14) (US EPA, 1980).

Pour la communauté européenne, la PNEC (predicted no effect concentration) vis-à vis des organismes d'eau douce a été estimée à 0,4 ng/L (INERIS, 2008). De même, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail a déterminé une PNEC de 60 µg/L.

Ce travail a permis de dégager deux valeurs chroniques qui peuvent être utilisés pour l'affinement des valeurs guides pour la protection de la vie aquatique:

- Pour les invertébrés de l'eau douce (EC₁₀-21j de 2,30 (0,33-3,13) mg/L).
- Pour les vertébrés de l'eau douce (EC₁₀-30j de 1,29 (0,78-1,65) mg/L).

En se basant sur la réglementation européenne, on a pu obtenir une PNEC (predicted no effect concentration) :

- de 2,5µg/L en appliquant un facteur de sécurité de 100 sur la NOEC de la mortalité (0,25 mg/L) pour les vertébrés du milieu aquatique.
- de 15 µg/L en appliquant un facteur de sécurité de 100 sur la NOEC reproduction (1,5 mg/L).

Une valeur plus protectrice de 3,3 µg/L a été obtenue en se basant sur la limite inférieure de la EC₁₀ 21j pour les invertébrés d'eau douce.

Les valeurs de la toxicité chronique obtenues dans cette étude peuvent être utilisées pour l'évaluation du risque du glyphosate par la Communauté Européenne. En se basant sur les

directives de cette instance (E.C., 2003), un facteur de sécurité de 50 peut être appliqué sur (NOEC 0,25 mg/L), ce qui donne une PNEC de 5 mg/L.

Effets du glyphosate sur quatre générations successives chez *Daphnia magna* :

L'introduction des pesticides dans les milieux aquatiques peut avoir des effets chroniques à la fois au niveau de l'individu et de la population entraînant probablement une perturbation de tout l'écosystème. Ceci justifie le besoin des tests multigénérations pour l'évaluation de la toxicité chronique d'une substance chimique. Ainsi, ce travail se fixe comme but d'étendre l'évaluation des effets chroniques du glyphosate à quatre générations successives du cladocère *Daphnia magna*, afin d'examiner l'intérêt des tests de multigénérations dans l'amélioration de l'évaluation de l'impact des herbicides sur les écosystèmes aquatiques.

La toxicité chronique de l'herbicide glyphosate a été évaluée à travers cinq générations du crustacé. Les individus de la génération parentale (F0) et des générations descendants (F1, F2, F3, F4) sont exposés au glyphosate à des concentrations de 1,5 à 5,5 mg/L.

Les résultats montrent que la survie et la reproduction ont été réduites significativement avec l'augmentation de la concentration du pesticide chez les parents et les descendants. L'effet toxique du glyphosate est plus prononcé chez la génération fille F4 que chez la génération parentale F0.

La détermination de la toxicité du glyphosate dépend de la dose et du temps d'exposition chez la génération parentale FO et les générations filles F1, F2, F3 et F4. Après 14 jours d'exposition à l'herbicide, les résultats obtenus montrent qu'une courte période (deux semaines) est déjà indicative des effets toxiques chroniques du glyphosate dans les différentes générations. Les effets observés du glyphosate sur les descendants révèlent que les quatre générations filles F1, F2, F3 et F4 sont plus sensibles que la génération parentale F0. La reproduction et la survie ont diminué significativement à partir de la concentration 3,5 mg/L pour les parent. Chez les générations F2, F3 et F4, les deux paramètres observés ont été affecté à partir de la concentration 1,5 m/L. Pour la génération fille F1, la survie a diminué significativement dès la concentration 3,5 mg/L alors que la reproduction a été affectée dès la concentration 1,5 mg/L.

La sensibilité de la fécondité des daphnies au glyphosate est plus accentuée dans les deux dernières générations filles F3 et F4. La reproduction est totalement arrêtée aux fortes

concentrations pour les générations F3 (dès la concentration 4,5 mg/L) et F4 (dès la concentration 2,5 mg/L).

Les solutions Roundup à des concentrations de 25 et 50 mg /L du glyphosate durant 15 jours d'exposition démontrent un manque d'adaptation au herbicide dans les quatre générations successives de *D. magna* (Papchenkova et al., 2009). Pour la génération parentale, les analyses des paramètres de reproduction (nombre de ponte, la taille de la couvée et le nombre de juvéniles par femelle), ont montrés qu'il ya une diminution significative pour ces paramètres pour les deux concentrations 25 et 50 mg /L. En comparant avec les contrôles ($80,3 \pm 2,8$), le nombre de juvéniles a diminué de $46,0 \pm 7,0$ pour la concentration 50 mg/L. De même, une réduction significative de nombre de ponte ($2,6 \pm 0,2$) et la taille de la couvée ($17,1 \pm 2,1$) et a été observée chez les daphnies pour la concentration maximale. Ces expériences de 15 jours ont révélé que les solutions de Roundup à des concentrations de 25 et 50 mg/L ont réduit la reproduction dès la première génération.

En se basant sur les résultats de nos tests multigénérations, l'effet de glyphosate sur la génération parentale pour les paramètres de la reproduction est similaire pour les fortes concentrations testées dans notre étude.

En comparant les résultats de l'étude de Papchenkova avec ceux obtenus à partir de nos tests multigénérations, l'effet de glyphosate sur la génération parentale pour les paramètres de la reproduction est similaire pour les fortes concentrations testées.

De plus, la comparaison entre les différentes générations successives a révélé une diminution de résistance à l'herbicide observée pour la quatrième génération par rapport à la génération maternelle dans cette étude. Contrairement avec nos résultats, la toxicité du glyphosate est plus prononcée chez la génération parentale que chez la 4^{ème} génération fille.

Comparaison de la sensibilité de *Daphnia magna* et *Danio rerio* pour le glyphosate :

Dans ce présent travail, nous avons entrepris une étude comparative de la sensibilité entre deux espèces d'eau douce *Daphnia magna* et *Danio rerio* vis-à-vis de la toxicité à long terme du glyphosate. La durée d'exposition était de 21 jours pour les deux organismes tests. Les résultats obtenus montrent que les effets du glyphosate pour les deux espèces dépendent de la dose et du temps d'exposition. Ainsi, la survie diminue avec l'augmentation de la concentration du glyphosate dans le milieu et de la durée du test.

La stabilité de l'écosystème aquatique dépend des espèces les plus sensibles aux polluants. Pour cette raison, la détermination des valeurs de référence que sont les NOEC et LOEC est très utile car elles permettent de déterminer les normes de rejet de différentes substances potentiellement polluantes. En admettant que les deux tests chroniques ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales, il apparaît que la survie était plus sensible chez les poissons zèbres avec une NOEC de 0,32 mg/L que les invertébrées daphnies avec une NOEC de 1.40 mg/L.

De même, la comparaison entre les deux espèces étudiées a montré que pour le paramètre de survie, le vertébré *Danio rerio* était plus sensible que *Daphnia magna* avec une valeur de EC₁₀ calculée de 1, 39 (0,78-1,65) mg/L. Ceci peut être expliqué par la perméabilité du chorion des œufs du poisson zèbre aux produits toxiques.

Il apparaît que la réduction de la durée d'exposition de 30 à 21 jours permet de constater que l'utilisation des poissons zèbres pour l'étude de la toxicité chronique permet d'approcher les effets à long terme du glyphosate. Ce vertébré aquatique semble l'organisme le plus représentatif des eaux douces pour l'évaluation chronique des pesticides organophosphorés tels que le glyphosate.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de cette étude dans la région de Rabat-Salé- Kénitra et après l'analyse des informations obtenues lors des enquêtes, nous avons rassemblé le maximum d'informations sur l'usage des pesticides dans la région étudiée. Une étude écotoxicologique, nous a permis d'évaluer plusieurs aspects de toxicité aigue et chronique de l'herbicide glyphosate sur la population de deux espèces d'eau douce *Daphnia magna* et *Danio rerio*.

Concernant les tests de toxicité aquatique utilisés, ces essais sont standardisés selon les normes marocaines et internationales. Pour l'espèce *Daphnia magna*, le test aigue d'inhibition de la mobilité a été réalisé en appliquant les recommandations de la norme marocaine ISO 6341 (2014). Pour le test chronique de la détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus, il a été réalisé selon la norme marocaine ISO 10706 (2014). Pour l'espèce *Danio rerio*, le test aigue a été réalisé selon la norme française NF ISO 15088 (2007) et le test chronique selon les recommandations de la ligne directrice OECD 210 (2013).

À l'aide des logiciels de traitements statistique, nous avons pu déterminer des concentrations importantes (CE_{50} , NOEC, LOEC) dans l'évaluation de l'effet de substances toxiques sur l'environnement et interpréter ainsi les résultats des tests obtenus.

Dans la première partie de cette étude, on a mis en évidence le mode d'usage des pesticides et de l'herbicide glyphosate dans la région Rabat-Salé-Kénitra. L'analyse des résultats obtenus a révélé que 50 % des agriculteurs utilisent le glyphosate comme matière active pour détruire les mauvaises herbes qui menacent leurs cultures. On note aussi que le glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine est le plus utilisé dans la région d'étude avec 45%. Ceci peut être expliqué par sa forte solubilité dans l'eau. Il serait intéressant l'utilisation des bioherbicides composé d'huiles essentielles telles que l'acide pélargonique (un extrait du géranium) et l'acide acétique dérivé du vinaigre qui peuvent remplacer l'usage toxique du glyphosate. Après avoir été testées avec succès sur plusieurs cultures, les mauvaises herbes meurent 16h après l'application de ces deux produits. A la différence du glyphosate (herbicide totale), ces bioherbicides spécifiques n'attaquent que des plantes bien précises.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons mis en évidence que le cladocère *Daphnia magna* est un bon indicateur du potentiel toxique du glyphosate sur la survie et la

reproduction. Le choix du cladocère daphnie a été favorisé par son rôle dans la chaîne trophique (consommateur primaire), sa sensibilité, sa représentativité de la faune aquatique (norme ISO) et sa facilité d'utilisation pour des essais au laboratoire. Ces caractéristiques ont permis d'évaluer l'écotoxicité de glyphosate sur la survie, la taille et la reproduction de l'espèce étudiée. De plus, on a prolongé cette étude sur quatre générations issue de la descendance pré-exposée au produit agricoles. La NOEC 21jours de 0,18 µg/L enregistrée lors de cette étude, offre un résultat permettant de réduire le seuil préconisé dans le cadre de l'évaluation du risque lié à la présence du glyphosate dans l'environnement aquatique et la protection des espèces qui y vivent.

L'introduction des pesticides dans les milieux aquatiques peut avoir des effets chroniques à la fois au niveau de l'individu et de la population entraînant probablement une perturbation de la santé de ces écosystèmes. Nos résultats soulignent l'intérêt de l'utilisation des tests multi générations dans l'étude des effets à long terme de ces substances sur une espèce clé d'eau douce *Daphnia magna*. Dans cette étude, l'analyse des résultats a montré que la toxicité de glyphosate continue à se manifester à travers les générations, avec l'augmentation du temps d'exposition et de la dose dans le milieu et à long terme. Les effets significatifs observés du glyphosate sur les descendants révèlent que les quatre générations filles F1, F2, F3 et F4 sont plus sensibles que la génération parentale F0. L'effet toxique du glyphosate est plus prononcé chez la génération fille F4 que chez la génération parentale F0. Ce constat suggère que les essais réalisés sur une seule génération saine de laboratoire induit une sous-estimation dans la prédiction du risque de la substance étudiée. De ce fait, le suivi de la toxicité sur quatre générations permet de mieux cerner le potentiel toxique de cette substance chimique. Il serait intéressant d'étendre les tests de toxicité classiques sur plusieurs générations, pour mettre en évidence l'expression de la toxicité des pesticides dans la population et mieux approcher les phénomènes de sensibilisation ou d'adaptation de cette population in situ.

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons montré la toxicité du glyphosate sur un poisson d'eau douce *Danio rerio*. Le choix du poisson zèbre est favorisé par la simplicité de l'élevage en aquarium (coût d'installation faible suite à la petite taille des poissons zèbres), un cycle de vie court (maturité sexuelle en trois mois), une fertilité grande (plusieurs œufs par ponte), la transparence des œufs qui facilite leur manipulation en tests de toxicité et sa sensibilité envers les substances toxiques. Il apparaît que l'exposition pendant 30 jours au glyphosate à un effet toxique sur la survie le taux d'éclosion, le rythme cardiaque et le

système locomoteur des poissons *Danio rerio*. Cet effet est significatif seulement pour la plus forte concentration testée 4 mg/L. De plus, les résultats ont révélé que *Danio rerio* s'est montré l'une des espèces de vertébrés d'eau douces les plus sensibles à long terme vis-à-vis de la toxicité du glyphosate. La NOEC 21jours de 0,32 mg/L enregistrée lors de cette étude, offre un résultat permettant de réduire le seuil préconisé dans le cadre de l'évaluation du risque lié à la présence du glyphosate dans l'environnement aquatique et la protection des espèces qui y vivent.

Dans la quatrième partie de cette étude, nous avons pu montrer que *Daphnia magna*, utilisé dans les conditions normalisées, s'est montrée moins sensible à la toxicité chronique du glyphosate que *Danio rerio*. Il apparaît que la survie était plus sensible chez les poissons zèbres avec une NOEC de 0,32 mg/L que les invertébrés daphnies avec une NOEC de 1.40 mg. En effet, la réduction du temps d'exposition à 21 jours a permis de constater que le test *Danio rerio* est le plus représentatif et permettrait de mieux avoir une idée sur l'écotoxicité des produits phytosanitaires comme le glyphosate et de dériver des concentrations protectrices pour toutes les composantes du milieu aquatique. L'augmentation de la sensibilité de ce modèle à des pesticides comme le glyphosate pourrait être envisagé à condition de réduire la durée d'exposition de 30 jours à 21 jours. Il serait intéressant de prolonger l'étude de la toxicité chronique pour toute la durée de survie de *Danio rerio* et de détecter les effets sur la reproduction et sur la descendance à travers un suivi sur plusieurs générations. La détection de malformations sur la descendance des populations du poisson zèbres exposées au glyphosate pourraient être le résultat d'une interférence de l'herbicide avec les processus de survie et reproduction, à travers un mécanisme de perturbation endocrinienne. Il serait intéressant d'explorer cette hypothèse par une étude des dérégulations des hormones intervenant dans la survie et la reproduction chez *Danio rerio* et la possibilité de les associer avec les malformations observées.

L'utilisation intensive des pesticides a laissé apparaître des conséquences environnementales graves inhérentes à leur mauvaise utilisation et à leur gestion irrationnelle. La santé humaine et l'environnement peuvent donc être affectés directement par les résidus de ces produits phytosanitaires. Ces substances chimiques s'accumulent dans l'environnement et contaminent les sources d'eaux et sols et influencent la biodiversité hébergeant ces écosystèmes. Pour cette raison, l'état doit exiger d'autres lois concernant le traitement de ce type de substances, augmenter la surveillance sur les stations d'épuration d'industries agricoles et imposer plus

d'impôts et des sanctions sur les agricultures et les industries qui ne respectent pas les normes d'utilisation, de vente et de rejets de ces produits phytosanitaires décrites par la loi marocaine.

Pour finir, la contamination des milieux aquatiques par le glyphosate peut toucher l'équilibre de tout l'écosystème aquatique et affecte ainsi sa biodiversité. La valeur chronique de 27,8µg/L obtenue dans cette étude reste largement au-dessous des directives internationales de protection de la faune aquatique. A la limite de ces résultats obtenus dans ce travail, il souhaitable de réviser ces valeurs d'une part et de mener des études d'impact et d'évaluation de risque pour définir des limites de concentrations plus robustes concernant ces substances chimiques.

REFERENCE

RÉFÉRENCE

- **ACTA, (2000).** Index Phytosanitaire. Association de Coordination Technique Agricole, 149, rue de Bercy, Paris.
- **Adema MM, (1978).** *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59: 125-134.
- **AFNOR, (1996).** Qualité de l' eau : Détermination de l' inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) - Essai de toxicité aigue. Association française de normalisation, Paris. Norme NR EN ISO 6341 (NF T90-301).
- **Agritox, (2013).** AGRITOX - Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques , Accessible <http://www.dive.afssa.fr/agritox/php/fiches.php>.
- **Akchati M, (2018).** Règlementation des pesticides à usage agricole. *Toxicologie Maroc*, 39: 3-4.
- **Anderson BG, (1950).** The apparent thresholds of toxicity to *Daphnia magna* for chlorides of various metals when added to lake Erie water. *Transactions of the American Fisheries Society*, 78(1): 96-113.
- **Annett R, Habibi HR et Hontela AH, (2014).** Impact of glyphosate and glyphosatebased herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5): 458-479.
- **ANSES (Agence national de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail), (2019).** Phytopharmacovigilance- Synthèse des données de surveillance- Appui scientifique et technique n°2017-04 -Glyphosate, Parimage.
- **ANSES, (2018).** Lancement de la campagne exploratoire nationale de mesure des résidus de pesticides dans l'air. Accessible <https://www.anses.fr/fr/content/lancement-de-la-campagneexploratoire-nationale-de-mesure-des-r%C3%A9sidus-de-pesticides-dans>.
- **Antunes SC, de Figueiredo DR, Marques SM, Castro BB, Pereira R et Gonçalves F, (2007).** Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of The Total Environment*, 374(2-3) : 252-259.
- **Anzecc et Armcanz, (2000).** Australian and New Zealand Environment and Conservation Council & Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand. Water quality guidelines.
- **Arumugam, P. T., & Geddes, M. C., (1988).** Predation of golden perch (*Macquaria ambigua*) fry on *Daphnia carinata* in nursery ponds, Australia: With 2 figures in the text. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 23(3), 1773-1776., P. T., & Geddes, M. C. (1988). Predation of golden perch (*Macquaria ambigua*) fry on *Daphnia carinata* in nursery ponds,

Australia: With 2 figures in the text. Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen, 23(3), 1773-1776.

- **ASTM (American Society for Testing and Materials), (1992).** Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes, ASTM International.
- **ASTM, (2012).** Standard guide for conducting *Daphnia magna* life-cycle toxicity tests. E1193-97.
- **Atkinson C, Strutt AV, Henderson W, Finch J et Hudson P, (2004).** Glyphosate: 104 week combined chronic feeding/oncogenicity study in rats with 52 week interim kill (results after 104 weeks). Pesticide Residues in Food: Toxicological evaluations; International Programme on Chemical Safety, World Health Organization: Geneva, Switzerland.
- **Balbuena MS, Tison L, Hahn ML, Gregg U, Menzel, R et Farina WM, (2015).** Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. Journal of Experimental Biology, 218: 2799- 2805.
- **Barathinivas A, Ramya S, Neethirajan K, Jayakumararaj R, Pothiraj C, Balaji P et Faggio C, (2022).** Ecotoxicological Effects of Pesticides on Hematological Parameters and Oxidative Enzymes in Freshwater Catfish, *Mystus keletius*. Sustainability, 14: 9529.
- **Barillet S, (2007).** Toxicocinetique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz, UFR Sciences Fondamentales et Appliquées, Ecole doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement, 477p.
- **Barriuso E, Benoit P, Bedos C et Charnay MP, (2005).** Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricoles, Paris, 637p.
- **Battaglin WA, Meyer MT, Kuivila KM et Dietze JE, (2014).** Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. Journal of the American Water Resources Association, 50(2): 275-290.
- **Baye Y, (2008).** Identification of glyphosate doses for control of orobanche on peas and of lower application of slurry on faba bean. Morocco Collaboration Grant Program (MCGP). Annual Report 2007/2008/. Edité par M. El Gharous, R. Dahan et M.ElMourid; 110-113p.
- **Baylis A, (2000).** Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. Pest Management Sciences, 56: 299-308.
- **Benbrook CM, (2016).** Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. Environmental Sciences Europe, 28 (1): 3.
- **Bernut A, (2014).** Pertinence du modèle d'infection *Danio rerio* pour l'étude immunopathologique de *Mycobacterium abscessus*. Thèse de doctorat en Biologie Santé. Ecole Doctorale Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries, Montpellier.

- **Bialk-Bielińska A, Mulkiewicz E, Stokowski M, Stolte S et Stepnowski P, (2017).** Acute aquatic toxicity assessment of six anti-cancer drugs and one metabolite using biotest battery e Biological effects and stability under test conditions. *Chemosphere*, 189: 689-698.
- **Blandin P, (1986).** Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'écologie*, 17(4) : 215-307.
- **Borggaard OK et Gimsing AL, (2008).** Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review, *Pest Management Sciences*, 64: 441-456.
- **Bradberry SM, Proudfoot AT et Vale JA, (2004).** Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews*, 23(3): 159-167.
- **Buijtendijk FJJ, (1918).** Combined action of narcotics and potassium cyanide on daphne. *Archives Néerlandaises de Physiologie*, 2: 521-524.
- **Carvalho FP, (2006).** Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy*, 9: 685-692.
- **Cattani D, Oliveira DL, Cavalli VL, Heinz Rieg CE, Domingues JT, Dal-Cim T, Tasca CI, Mena Barreto Silva FR et Zamoner A, (2014).** Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology*, 320: 34-45.
- **Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec, (2016).** Détermination de la toxicité létale CL₅₀ 48h *Daphnia magna*. MA. 500 - D.mag. 1.1. Rév. 2, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la lutte contre les changements climatiques du Québec, 18 p.
- **Centre d'expertise en analyse environnementale, (2000).** Méthode d'analyse: Détermination de la toxicité létale CL₅₀ 48h *Daphnia magna*.
- **Chan C et Mahler JF, (1992).** NTP Technical Report on Toxicity Studies of Glyphosate Administered in Dosed Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice. National Toxicology Program, 16: 34.
- **Chang FC, Simcik MF et Capel PD, (2011).** Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere [archive]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3): 548-555.
- **Cox C, (2004).** Herbicide factsheet Glyphosate, *Journal of Pesticide, Reform*, 24(4): 10-15.
- **Cox C, (1995).** Glyphosate Fact Sheets: Part 1 Toxicology. *Journal of Pesticide Reform*, 15: 3.
- **Cuhra M, Traavik T et Bohn T, (2012).** Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22(2): 251-262.
- **Díaz-Martín RD, Valencia-Hernandez JD, Betancourt-Lozano M et Yanez-Rivera B, (2021).** Changes in microtubule stability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after glyphosate exposure. *Heliyon*, 7(1): e06027.

- **Dieter E, (2005).** Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Zoological Institute of the University of Basel, Evolutions biology, Switzerland, 10-14p.
- **DIN (Deutsches Institut für Normung), (2002).** Basisvalidierung genormter Verfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung-Validierungsdokument (38415-T6), DIN Standards.
- **Directive 91/414/CEE du Conseil du 15 juillet (1991).** Accessible <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000339052>.
- **Dodson S et Hanazato T, (1995).** Commentary on Effects of Anthropogenic and Natural Organic Chemicals on Development, Swimming Behavior, and Reproduction of *Daphnia*, a Key Member of Aquatic Ecosystems. Environmental Health Perspectives, 103:7-11.
- **Dyer SD, Versteeg DJ, Belanger SE, Chaney JG, Raimondo S et Barron MG, (2008).** Comparison of species sensitivity distributions derived from interspecies correlation models to distributions used to derive water quality criteria. Environmental Sciences of Technology, 15: 3076-3083.
- **E.C., (2002).** Review report for the active substance glyphosate. European Commission Directorate-General Health and Consumer Protection (DG SANCO) - Unit E1 Legislation relating to crop products and animal nutrition.
- **E.C., (2004).** Commission staff working document on implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM(1999) 706)). Reference : SEC(2004) 1372. European Commission, Brussels.
- **Ebert D, (2005).** Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, US.
- **El Amrani S, Pena M, Sanz-Landaluze J, Ramos L, Guinea J et Cámara C, (2012).** Bioconcentration of pesticides in zebrafish eleutheroembryos (*Danio rerio*). The Science of the Total Environment, 425:184-90.
- **El Ouilani B, (2011).** Article sur le marché des produits phytosanitaires au Maroc. CropLife Maroc. Accessible http://www.croplife.ma/Pdf/Article_sur_le_marche_phytosanitaire_au_Maroc.mai_2011.pdf
- **El-Amrani S, Pena-Abaurrea M, Sanz-Landaluze J, Ramos L, Guinea J et Cámara C, (2012).** Bioconcentration of pesticides in zebrafish eleutheroembryos (*Danio rerio*). Science Total Environment, 425:184-90.
- **Engeszer RE, Patterson LB, Rao A et Parichy DM, (2007).** Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. Zebrafish, 4:21-40.
- **Enserink E, Kerkhofs M, Baltus C et Koeman J, (1995).** Influence of food quantity and lead exposure on maturation in *Daphnia magna*; Evidence for a Trade Off Mechanism. Functional Ecology, 95 (2): 175-185.

- **Environmental Protection Agency (EPA), (1993).** Facts. Glyphosate. Washington, D. C. États Unis. Accessible www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-417300_1-Sep-93.pdf.
- **Environnement Canada, (2007).** Méthode d'essai biologique : essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*. Rapport SPE 1/RM/25, Environnement Canada, Québec, Canada.
- **Erhunmwunse NO, Ogbeide OS, Tongo II, Enuneku AA et Adebayo PO, (2018).** Acute toxicity of glyphosate-based isopropylamine formulation to juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences, 26: 97-101.
- **Evens R, De Schamphelaere KAC, Balcaen L, Wang Y, De Roy K, Resano M, María Mdel R, Van der Meerem P, Boon N, Vanhaecke Fet Janssen CR, (2011).** Liposomes as an alternative delivery system for investigating dietary metal toxicity to *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, 105: 661-668.
- **Fadool JM et Dowling JE, (2008).** Zebrafish: a model system for the study of eye genetics. Progress in Retinal and Eye Research, 27: 89-110.
- **Faria M, Bedrossiantz J, Ramírez JRR, Mayol M, García GH, Bellot M, Prats E, Garcia-Reyero N, Gómez-Canela C, Gómez-Oliván LM et Raldúa D, (2021).** Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety. Environmental International, 146: 106253.
- **Ferard J et Ferrari B, (2005).** Wastoxhas: A bioanalytical strategy for solid wastes assessment, Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Ed. Blaise, Christian, Férard, Jean-François, Pays-Bas.
- **Fink R et Beavers J, (1978).** One-generation reproduction study in bobwhite quail: glyphosate technical. Unpublished report no. 139- 141, U.S. Environmental Protection Agency by Monsanto Company.
- **Fiorino E, Sehonova P, Plhalova L, Blahova J, Svobodova Z et Faggio C, (2018).** Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. Environmental Science and Pollution Research International, 25(9): 8542-8549.
- **Flaherty CM et Dodson SI, (2005).** Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. Chemosphere, 61: 200–207.
- **Fleisch VC et Neuhauss SCF, (2006).** Visual behavior in zebrafish. Zebrafish, 3:191-201.
- **Folmar LC, Sanders HO and Julin AM, (1979).** Archives of Environmental Contamination and Toxicology Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 8: 269-278.
- **Food and Agriculture Organisation (FAO), (1978).** Résidus des pesticides dans les produits alimentaires. Rapport de la réunion conjointe FAO/OMS, Rome.
- **France info, (2021).** Le lien entre pesticides et six maladies graves, dont certains cancers, se précise, selon l'Inserm. Accessible

https://www.francetvinfo.fr/monde/environnement/pesticides/glyphosate/sante-le-lien-avec-les-pesticides-se-precise-pour-six-maladies-graves_4684467.html.

- **Franz JE, Mao MK et Sikorski JA, (1997).** Glyphosate : A unique global herbicide. Washington DC: American Chemical Society.
- **Gerlai R, (2011).** A small fish with a big future: zebrafish in behavioral neuroscience. *Reviews in the Neurosciences*, 22: 3-4.
- **Giesey JP, Dobson S et Solomon KR, (2000).** Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167: 35-120.
- **Giroux I, (2004).** La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec. Québec, ministère de l'Environnement du Québec, 40p.
- **Giroux I, (2015).** Présence de pesticides dans l'eau du Québec-Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya 2011 à 2014, Ministère du Développement durable de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques Québec.
- **Gupta T et Mullins MC, (2010).** Dissection d'organes sur le poisson zèbre pour adultes. University of Pennsylvania-School of Medicine, Department of Cell and Developmental Biology.
- **Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N., Scoccianti C, Mattock H et Straif K, (2015).** Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16: 490-491.
- **Hammers-Wirtz M et Ratte HT, (2000).** Offspring fitness in *Daphnia*: Is the daphnia reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 1856-1866.
- **Hansen LR et Roslev P, (2016).** Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquatic Toxicology*, 179: 36-43.
- **Hill AJ, Teraoka H, Heideman W et Peterson RE, (2005).** Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86: 6-19.
- **Horth H, (2012).** Survey of glyphosate and AMPA in groundwaters and surface waters in Europe. Monsanto Europe.
- **Howe C M, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K et Veldhoen N, (2004).** Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(8): 1928-1938.
- **IARC, (2015).** Monograph on Glyphosate.
- **INERIS, (2008).** Glyphosate , Cas : 1071-83-6, Synonymes : glyphosate;N (Phosphonomethyl)glycine; Accord; Glifinox; Glifonox; Gliialka; Glyphosate; Glycel; Glycine, N-(phosphonomethyl)-; Glyphosate acid; MON 0468; MON 0573; MON 2139; MON-0573; Muster; Phosphonomethyliminoacetic acid; Rodeo; Rondo; Sonic; Spaso. Accessible <https://substances.ineris.fr/fr/substance/nom/glyphosate>.
- **INERIS, (2020).** GLYPHOSATE ET SES PRINCIPAUX COMPOSES données technico-économiques sur les substances chimiques en France.

- **International Standard Organization (ISO 8692), (1996).** Water quality-freshwater algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- **ISO 10706, (2000).** Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité à long terme de substance vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).
- **ISO 12890 (International Standard Organization), (1989).** Water Quality - Determination of Toxicity to Embryos and Larvae of Freshwater Fish—Semi-Static Method, International Organization for Standardization, Geneve, Switzerland.
- **ISO 15088 (International Standard Organization), (2007).** Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*), International Organization for Standardization, Geneve, Switzerland.
- **ISO 17025, (2017).** General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization, Geneve, Switzerland.
- **ISO 7346 (International Standard Organization), (1996).** Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 1: Static method, International Organization for Standardization, Geneve, Switzerland.
- **Janati M, (1976).** Orobanche des légumineuses. In maladies et ravageurs des plantes cultivées au Maroc, Tome I, INRA, Mara, Rabat, 83-85p.
- **Jaskulski D et Jaskulska I, (2014).** The effect of pre-harvest glyphosate application on grain quality and volunteer winter wheat. Romanian Agricultural Research, 31: 1222-4227.
- **Kast-Hutcheson K, Rider C et Le Blanc G, (2001).** The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 20: 502-509.
- **Kimerle RM, Werner AF et Adams WJ, (1985).** Aquatic hazard evaluation principles applied to the development of water quality criteria. In Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium (Edited by R. D. Cardwell, R. Purdy, and R. C. Bahner), ASTM STP 854, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 538-547 p.
- **Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B et Schilling TF, (1995).** Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203: 253-310.
- **Labrot F, (1996).** Le plomb et l'uranium dans l'environnement. Présence, biodisponibilité et toxicité. Thèse de doctorat, Université Bordeaux I, Bordeaux, 259 p.
- **Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, (1997).** Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., & Ramade, F (eds), Biomarqueurs en écotoxicologie – Aspects fondamentaux. Masson, Paris, 1-9 p.
- **Laitinen P, Siimes K, Eronen L, Rämö S, Welling L, Oinonen S, Mattsoff L et Ruohonen-lehto MR, (2006).** Fate of the herbicides glyphosate, glufosinate-

ammonium, phenmedipham, ethofumesate and metamitron in two Finnish arable soils. *Pest Management Science*, 62: 473-491.

- **Lanzarin GAB, Felix LM, Santos D, Venancio CAS et Monteiro SM, (2019).** Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation Roundup® UltraMax - on the early zebrafish embryogenesis. *Chemosphere*, 223: 514-522.
- **Le TH, Lim ES, Lee SK, Choi YW, Kim YH et Min J, (2010).** Effects of glyphosate and methidathion on the expression of the Dhb, Vtg, Arnt, CYP4 and CYP314 in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 79(1): 67-71.
- **Linney E, Upchurch L et Donerly S, (2004).** Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicology and Teratology*, 26:709-718.
- **Lopes FM, Caldas SS, Primel EG et da Rosa CE, (2017).** Glyphosate adversely affect *Danio rerio* males: acetylcholinesterase modulation and oxidative stress. *Zebrafish*, 14(2): 97-105.
- **Mabsoute L et Saadaoui EM, (1996).** Acquis de recherche sur le parasitisme des légumineuses alimentaires au Maroc : synthèse bibliographique. *Al Awamia*, 92:55-57.
- **Maftouh I, Moussaif A, Elmezibri M, Elabbadi N et Mesfioui A, (2017).** Assessment of the Main Active Molecules among the most used Pesticides in the Gharb Region in Morocco. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 6(2): 2319-1473.
- **Majewski M S, Coupe RH, Foreman WT et Capel PD, (2014).** Pesticides in Mississippi air and rain: A comparison between 1995 and 2007. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(6): 1283-1293.
- **Maldani M, Dekaki M, Nassiri L et Ibjibijen L, (2017).** State of Art on the Use of Pesticides in Meknes Region, Morocco. *American Journal of Agricultural Science*, 4(6): 138-148.
- **Mamy L, Gabrielle B et Barriuso E, (2008).** Measurement and modelling of glyphosate fate compared to that of herbicides replaced as a result of the introduction of glyphosate-resistant oilseed rape. *Pest Management Science*, 64: 262-275.
- **Manar R, (2008).** Effets populationnels du chlordane sur les microcrustacés *Cladoceres Daphnia sp.* dans une perspective d'évaluation des risques. Thèse de doctorat. Université Hassan II, Faculté des sciences et techniques Mohammedia, Maroc ; Université Paul Verlaine, Ecole doctorale sciences et ingénierie, Metz, France, 177p.
- **MAPM, (2005).** Situation de l'agriculture Marocaine. 141 p.
- **Mathieu S et Faucher Y, (2016).** Nouvelle approche pour un meilleur choix d'herbicides. Accessible <https://www.agrireseau.net/documents/94033/nouvelle-approche-pour-un-meilleur-choix-d-herbicides>.
- **Maximino C et Herculano AM, (2010).** A review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish. *Zebrafish*, 7: 359-78.
- **Monographie générale Région Rabat-Salé-Kénitra, (2015).** Ministère de l'intérieur, Direction générale des collectivités locales.

- **Montassir L, Berrebaan I, Ennaji MM et Bessi H, (2019).** Acute and Reprotoxicity Assessment of Technical Grade and Commercial Formulation of Malathion on *Daphnia magna*. Journal of Environmental Chemistry and Toxicology, 23 (2): 105-113.
- **Montiel-León JM, Munoz G, Vo Du S, Do DT, Vaudreuil M.A, Goeury K, Guillemette F, Amyot M et Sauvé S, (2019).** Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. Environmental Pollution, 250: 29-39.
- **Morillo E, Undabeytia T et Maqueda C, (1997).** Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: Effect of Cu (II) in solution and adsorbed on the mineral. Environmental Science and Technology, 31: 3588-3592.
- **Morillo E, Undabeytia T, Maqueda C, (2002).** FTIR Study of Glyphosate–Copper Complexes. Environ Science and Technology, 50(7): 1918-1921.
- **Morillon A, (2016).** Les risques liés à l'utilisation des pesticides: Enquête auprès des agriculteurs du Poitou- Charentes. Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en pharmacie.
- **Muyssen BT, De Schamphelaere KA et Janssen CR, (2006).** Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, 77: 393-401.
- **Nguyen MH, Nguyen THN, Hwang IC, Bui CB et Park HJ, (2016).** Effects of the physical state of nanocarriers on their penetration into the root and upward transportation to the stem of soybean plants using confocal laser scanning microscopy. Crop Protection, 87: 25-30.
- **NM ISO 10706, (2014).** Norme Marocaine. Qualité de l'eau : Test de reproduction chez *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)- Test de toxicité chronique. Norme Marocaine, Institut Marocain de Normalisation.
- **NM ISO 6341, (2014).** Norme Marocaine. Qualité de l'eau : Détermination de l'inhibition de mobilité chez *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)- Test de toxicité aiguë. Institut Marocain de Normalisation.
- **OCDE, (2011).** *Daphnia magna*, Reproduction Test. OECD guidelines for testing of chemicals, Test No 211, Paris, France.
- **OCDE, (2012).** *Daphnia magna*, essai de reproduction. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Test No 211, Paris, France.
- **OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), (1992).** Fish, Early Life Stage Toxicity Test, OECD guidelines for testing of chemicals, Test No 210, Paris, France.
- **OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), (1998).** Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages, OECD guidelines for testing of chemicals, Test No 212, Paris, France.
- **OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), (2013).** Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Test No 236, Paris, France.

- **OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), (2006).** Fish Embryo Toxicity (FET) Test, OECD guidelines for testing of chemicals, Test No 210, Paris, France.
- **OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), (2009).** 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition, OECD guidelines for testing of chemicals, Test No 230, Paris, France.
- **ONSSA (Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires), (2018).** Retrait des pesticides à usage agricole à base de glyphosate en association avec le Co-formulant la POE-Tallowamine. Accessible <http://www.hortitecnews.com/wp-content/uploads/2018/03/501.pdf>
- **ONSSA, (2015).** Faits et chiffres 2015. Accessible www.onssa.ma/faits-et-chiffres-2015.
- **Organisation mondiale de la santé (OMS), (1994).** Glyphosate. Critères de la qualité sanitaire de l'environnement, Programme international de sécurité des produits chimiques (IPCS), Genève.
- **Organisation mondiale de la Santé, (2020).** Classification OMS recommandée des pesticides en fonction des dangers qu'ils présentent et lignes directrices pour la classification. Genève.
- **Organisation mondiale de santé (OMS), 2015.** Classification recommandée des pesticides en fonction des dangers qu'ils présentent et lignes directrices pour la classification. Accessible <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334382/9789240011472-fre.pdf>
- **Organization for Economic Cooperation and Development, (1998).** OECD Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.
- **Organization for Economic Cooperation and Development, (2003).** Draft guidance document for the statistical analysis of ecotoxicity data. OECD, Paris.
- **Ørsted M et Roslev P, (2015).** A fluorescence-based hydrolytic enzyme activity assay for quantifying toxic effects of Roundup® to *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 34(8): 1841-50.
- **Papchenkova GA, Golovanova IL et Ushakova NV, (2009).** The parameters of reproduction, sizes, and activities of hydrolases in *Daphnia magna* Straus of successive generations affected by roundup Herbicide. Intl Wat Biol, 2(3): 286-291.
- **Parrish P, Schimmel S, Hansen D, Patrick J et Forester J, (1976).** Chlordane: effects on several estuarine organisms. Journal of Toxicology and Environmental Health, 1: 485-494.
- **PCN, (2016).** Plan Cadre National pour les MCPD. Plan sectoriel «agriculture et alimentation durables» Maroc.
- **Pereira J, Hill C, Sibly R, Bolshakov V, Goncalves F, Heckmann L et Callaghan A, (2010).** Gene transcription in *Daphnia magna*: effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide. Aquatic Toxicology, 97: 268-276.

- **Persooone G et Janssen CR, (1993).** Freshwater invertebrate toxicity tests. In Handbook of Ecotoxicology, (Edited by P. Calow), Blackwell Scientific Publisher, Ambleside, UK, 55 p.
- **Persooone G, Marsalek B, Blinova I, Törökne A, Zarina D, Manusadzianas L, Nalecz-Jawecki G, Tofan L, Stepanova N, Tothova L et Kolar B, (2004).** A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environmental Toxicology*, 18 (6): 395-402.
- **Picque A, (2016).** Evaluation des impacts du Glyphosate sur la santé humaine. Thèse de Doctorat, Université de Picardie Jules Verne, UFR de Pharmacie d'Amiens, 66p.
- **Porcher JM, Delahaye C, Hervin D et Brion F et Poulsen V, (2003).** Caractérisation du développement embryolarvaire chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) et comparaison des tests de toxicité aigue sur les stades embryo-larvaire et adulte, INERIS, 18p.
- **Puerari RC, da Costa CH, Vicentini DS, Fuzinatto CF, Melegari SP, Schmidt EC, Bouzon ZL et Matias WG, (2016).** Synthesis, characterization and toxicological evaluation of Cr₂O₃ nanoparticles using *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128: 36-43.
- **Ramade F, (1977).** Écotoxicologie. Dunod, Paris, France, 205 p.
- **Raymond E, Engeszer LB, Patterson AA, Rao D et Parichy M, (2007).** Zebrafish in The Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field. *Zebrafish*, 4(1): 21-40.
- **Regnault-Roger C, (2005).** Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Paris, Lavoisier, 1013 p.
- **Reno U, Doyle SR, Momo FR, Regaldo L et Gagneten AM, (2018).** Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species. *Ecotoxicologie*, 27(7): 784-793.
- **Reregistration Eligibility Decision (RED), (1993).** Glyphosate; EPA-738-R-93-014; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington.
- **Research and Market, (2018).** Report on China's Glyphosate Industry, (2018-2022). Accessible <https://www.prnewswire.com/news-releases/research-report-on-chinas-glyphosate-industry-2018-2022-300689149.html>.
- **Rhalem N, 2020.** Etude sur les pesticides hautement dangereux (hhps) au Maroc. Amsetox Maroc. Accessible https://ipen.org/sites/default/files/documents/resume_executif_etude_sur_les_pesticides_hautement_dangereux_maroc_final_6_juin_2020.pdf.
- **Ribeiro F, Gallego-Urrea JA, Jurkschat K, Crossley A, Hassellöv M, Taylor C, Soares AMVM et Loureiro S, (2014).** Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, 466-467: 232-241.

- **Rob C, Wijk V, Krekels EHJ, Hankemeier T et Spaink HP, (2016).** Systems pharmacology of hepatic metabolism in zebrafish larvae. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 22: 27–34.
- **Roberts TR, (1998).** *Metabolic Pathways of Agrochemicals-Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 396-399p.
- **Robichaud C et R Rooney, (2021).** Low concentrations of glyphosate in water and sediment after direct over-water application to control an invasive aquatic plant. *Water Research*, 188: 116573.
- **Rodrigues LDB, Oliveira RD, Abe FR, Brito LB., Moura DS, Valadares MC, Grisolia CK, De Oliveira DP et De Oliveira GAR, (2017).** Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: effects on different organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(7): 1755-1763.
- **Rowena S, Gerlach G, Lawrence C et Smith C, (2007).** The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1): 13-34.
- **Sabatier R, Meyer K, Wiegand K et Clough Y, (2013).** Non-linear effects of pesticide application on biodiversity-driven ecosystem services and disservices in a cacao agroecosystem: a modelling study. *Basic and Applied Ecology*, 14: 115-125.
- **SAGe pesticides, (2011).** Utilisation rationnelle et sécuritaire des pesticides. InSAGe pesticides. Site de SAGe pesticides. Accessible <http://www.sagepesticides.qc.ca/Infos/UtilisationRationnelle.aspx>
- **Sakai M, (2005).** Acute toxic tests of rainwater samples using *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 215-220.
- **Santé Canada, (2016).** Rapport sur les ventes de produits antiparasitaires en 2014. Ottawa : gouvernement du Canada.
- **Sarigül Z et Bekcan S, (2009).** Acute toxicity of the Herbicide Glyphosate on *Daphnia magna*. *Tarim Bilimleri Dergisi*, 15(2): 204-208.
- **Schamphelaere K, Forrez I, Dierckens K, Sorgeloos P et Janssen C, (2007).** Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. *Aquatic toxicology*, 81: 409-418.
- **Schluter K et Aber M, (1980).** Lutte chimique contre *Orobanche crenata* sur fève au Maroc.
- **Schmitt UM, Schlüter K et Boorsma PA, (1979).** Chemical control of *Orobanche crenata* in broad beans. *FAO. Plant Protection Bulletin*, 27: 88-91.
- **Scholz S, Fischer S, Gündel U, Küster E, Luckenbach T et Voelker D, (2008).** The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*, 15: 394-404.
- **Schweizer M, Brilisauer K, Triebkorn R, Forchhammer K et Köhler HR, (2019).** How glyphosate and its associated acidity affect early development in zebrafish (*Danio rerio*), *PeerJ*, 7: e7094.
- **Scribner, EA, Battaglin WA, Gilliom RJ et Meyer MT, (2007).** Concentrations of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate in

ground- and surface water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001–06. Scientific Investigation Report 2007-5122. Reston (Virginie, États-Unis) : U.S. Geological Survey. Accessible
<https://pubs.usgs.gov/sir/2007/5122/pdf/SIR2007-5122.pdf>.

- **Serghini A, (2012).** Planches du cours d'écotoxicologie. Université Mohamed V, Faculté des sciences Rabat.
- **Sihtmäe M, Blinova I, Kunnis-Beres K, Kanarbik L, M. Heinlaan M et Kahru A, (2013).** Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology*, 72: 215-224.
- **Silva V, Montanarella L, Jones A, Fernández-Ugalde M et Ritsema C et Geissen V, (2018).** Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Science of the Total Environment*, 621: 1352-1359.
- **Slobodnik J, Mrafkova L, Carere M, Ferrara F, Pennelli B, Schüürmann G et von der Ohe PC, (2012).** Identification of river basin specific pollutants and derivation of environmental quality standards: A case study in the Slovak Republic. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 41: 133-145.
- **Slooff W, Canton JH et Hermens JLM, (1983).** Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I. (Sub)acute toxicity tests, *Aquatic Toxicology*, 4: 113-128.
- **Soares A, Baird D, Barber M et Calow P, (1991).** Variation in chronic stress tolerance among artificial clone-populations of *Daphnia magna* Strauss: an ecophysiological study. *Verh Irzterizat Vereiiz Limnol*, 24: 23-26.
- **Soltani N, Blackshaw R, Gulden R, Gillard LC, Shropshire C et Sikkema PH, (2013).** Desiccation in dry edible beans with various herbicides. *Canadian Journal of Plant Science*, 93(5): 871-877.
- **Spence R, Gerlach G, Lawrence C et Smith C, (2008).** The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 83:13-34.
- **Sperfeld E et Wacker A, (2009).** Effects of temperature and dietary sterol availability on growth and cholesterol allocation of the aquatic keystone species *Daphnia*. *Journal of Experimental Biology*, 212:3051-3059.
- **Spitsbergen J et Kent M, (2003).** The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research - Advantages and Current Limitations. *Toxicologic Pathology*, 31: 62-87.
- **Sprague JB et Ramsay BA, (1965).** Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 22(2): 425-432.
- **Stout L et Ruecker F, (1990).** Chronic study of glyphosate administered in feed to albino rats. Unpublished Report no. MSL-10495 R.D. 1014, submitted to U.S. Environmental Protection Agency by Monsanto Agricultural Company.
- **Strähle U, Scholz S, Geisler R, Greiner P, Hollert H, Rastegar S, Schumacher A, Selderslaghs I, Weiss C, Witters H et Braunbeck T, (2012).** Zebrafish embryos as

an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, 33: 128-132.

- **Struger J, Van Stempvoort DR et Brown SJ, (2015).** Sources of aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urban and rural catchments in Ontario, Canada: Glyphosate or phosphonates in wastewater? *Environnemental Pollution*, 204 : 289-297.
- **Subramaniam V et Hoggard P, (1988).** Metal complexes of glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36 (6):1326-1329.
- **Sulukhan E, K  okt  rk M, Ceylan H, Beydemir S, Isik M, Atamanalp M et Ceyhun SB, (2017).** An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 180: 77-85.
- **Syberg K, Backhaus T, Banta G, Bruce P, Gustavsson M, Munns Jr, WR R  m   R, Selck H et Gunnarsson J, (2016).** Toward a conceptual approach for assessing risks from chemical mixtures and other stressors to coastal ecosystem services. *Health and Ecological Risk Assessment*, 13(2): 376-386.
- **Tomlin CDS, (2009).** The pesticide manual: A world compendium (14e   dition), Hampshire, British Crop Protection Council, 545- 548 p.
- **Trudeau V, Rondeau M et Simard A, (2011).** Pesticides aux embouchures de tributaires du lac Saint-Pierre (2003-2008), Environnement Canada, Direction des sciences et de la technologie de l'eau.
- **Tsui MT et Chu LM, (2003).** Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7):1189-97.
- **Tu M, Hurd C et Randall JM, (2001).** Weed Control Methods Handbook: Tools and Techniques for Use in Natural Areas, The Nature Conservancy.
- **U.S. Environmental Protection Agency, (1980).** Ambient water quality criteria for chlordane. EPA. 466 440/5-80-027. Washington, DC.
- **U.S. Environmental Protection Agency, (1988).** Chlordane/Heptachlor termiticides; notification of cancellation and amendment of existing stocks determination. *Fed Reg*, 53: 11798-l 1805.
- **U.S. Environmental Protection Agency, (1989).** Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-89/001, 249.
- **U.S. Environmental Protection Agency, (2002).** Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA-821-R-02-012.
- **UK Environmental Agency, (2010).** Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances : glyphosate science report - summary tables.
- **Union des Industries de la Protection des Plantes, (2013).** Accessible <http://www.uipp.org/Boite-a-outils/Publications>.

- **US Environmental Protection Agency, (2002).** Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. 275p.
- **US-EPA , (1993).** Reregistration Eligibility Decision (RED) - Glyphosate. US-EPA, EPA 738-R-93-014.
- **US-EPA, (2013).** Pesticide Ecotoxicity Database, Environmental Fate and Effects Division of the Office of Pesticide Programs. Accessible <http://www.ipmcenters.org/Ecotox/DataAccess.cfm>.
- **Valle AL, Mello FC, Balvedi RP, Rodrigues LP et Goulart L, (2019).** Glyphosate detection: methods, needs and challenges. Environmental Chemistry Letters, 17: 291–317.
- **Vasseur P, Ferard JF, Vial J et Larbaigt G, (1991).** Comparaison des tests Microtox et daphnie pour l'évaluation de la toxicité aigüe d'effluents industriels. Environmental Pollution, 34(3): 225-235.
- **Vencill, WK, (2002).** Herbicide Handbook, 8th ed.; Ed.; Weed Science Society of America: Lawrence, 231-234p.
- **Vereecken H, (2005).** Mobility and leaching of glyphosate: a review, Pest Management Sciences, 61: 1139-115.
- **Vereecken H, (2005).** Mobility and leaching of glyphosate: a review. Pest Management Science, 61: 1139-1151.
- **Vincent F, (2015).** Approche in vivo/in vitro du métabolisme de perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat en Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition .École doctorale Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries, Toulouse,
- **Winner R, Keeling T, Yeager R et Farrel M, (1977).** Effects of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. Freshwater Biology, 7: 343-349.
- **World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, (2017).** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans-Some Organophosphate Insecticides and Herbicides; Geneva, 112.
- **Worthing CR et Hance RJ, (2000).** Electronic Pesticide Manual, eleventh edition, British Crop Protection Council. London.
- **Wu SG, Chen LP, Wu CX, Cang T, Yu RX et Zhao XP, (2011).** Acute toxicity and safety of four insecticides to aquatic organisms. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 23 (1): 101-106.
- **Zhang Q, Qu Q, Lu T, Ke M, Zhu Y, Zhang M, Zhang Z, Du, Pan X, Sun L et Qian H, (2018).** The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth. Environmental Pollution, 243: 1106-1112.
- **Zhang S, Xu J, Kuang X, Li S, Li X, Chen D, Zhao X et Feng X, (2017).** Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, 181: 270-280.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 :

Textes législatifs et réglementaires d'homologation et la commercialisation des pesticides à usage agricole au Maroc :

- Loi n°42-95 relative au contrôle et à l'organisation du commerce des produits pesticides à usage agricole, promulguée par le dahir n°1-97-01 du 12 Ramadan 1417 (21 Janvier 1997).
- Décret n°2-99-106 du 18 Moharrem 1420 (05 mai 1999) relatif à l'exercice des activités d'importation, de fabrication et de commercialisation de produits pesticides à usage agricole.
- Décret n°2-99-105 du 18 Moharrem 1420 (05 mai 1999) relatif à l'homologation des produits pesticides à usage agricole.
- Décret n°2-01-1343 du 28 Joumada II 1422 (17 septembre 2001) instituant la commission des pesticides à usage agricole.
- Décret n°2-01-416 du 8 Joumada I 1423 (19 juillet 2002) réglementant la commercialisation et l'utilisation des nématicides liquides en agriculture.
- Arrêté du ministre de l'agriculture et de la réforme agraire n°777-72 du 21/08/1972 (21 août 1972) autorisant l'emploi du phosphore d'aluminium pour la désinsectisation des grains de céréales destinés à la semence ou à l'alimentation et déterminant les précautions que doivent prendre les personnes qui l'emploient.
- Arrêté du ministre de l'agriculture et de la réforme agraire n°466-84 du 15 Joumada II 1494 (19 mars 1984) portant réglementation des pesticides organochlorés.
- Arrêté du ministre de l'agriculture et de la réforme agraire n°666-87 du 04 Chaâbane 1407 (03 avril 1987) réglementant les conditions d'emploi en agriculture, du bromure de méthyle destiné à la désinfection des sols nus, par fumigation.
- Arrête du ministre de l'agriculture et de la réforme agraire n°1809-89 du 13 Joumada I 1410 (13 décembre 1989) relatif à la vente et à l'emploi de la deltaméthrine et du piperonyl butoxyde pour la désinsectisation des graines de céréales.
- Arrêté du ministre de l'agriculture, du développement rural et des pêches maritimes n°794-00 du 03 Rebiu 1421 (06 Juin 2000) relatif à l'organisation d'une formation d'un examen de qualification au profit des techniciens agricoles pour exercer la vente au détail des pesticides à usage agricole.

- Arrêté conjoint du ministre de l'agriculture et de la pêche maritime et du ministre de la santé n°156-14 du 15 rabia I 1435 (17 janvier 2014) fixant les limites maximales autorisées de résidus des produits phytosanitaires dans ou sur les produits primaires et les produits alimentaires.

Annexe 2 :

Université Mohammed V-Agdal

Date :

Facultés des Sciences – Rabat

Fiche N°:

Encadrante : Pr. M. Naciri

Fiche questionnaire des pesticides de la région Rabat-Salé-Kénitra

L'informateur :

Niveau d'étude : Analphabète Primaire-Collège Secondaire Universitaire

Revenu/mois : 250-1500DH 1500-5000DH 5000-10000DH >10000DH

Le pesticide utilisé :

Pesticide	Genre	Dose	Maladie

Annexe 3 :

Préparation de la solution de référence :

Cette solution est utilisée pour le contrôle de la sensibilité du réactif biologique (*Daphnia magna* et *Danio rerio*) et de l'applicabilité du mode opératoire.

Réactif

- Bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$)
- Eau d'élevage
- Balance une précision de 0,01g
- Matériel courant de laboratoire (fioles, pipettes...)

Mode de préparation

Dissoudre 10g de $K_2Cr_2O_7$ dans environ 800ml d'eau dilution et compléter à 1000 ml avec de l'eau d'élevage.

A partir de la solution mère on va préparer 3 autres solutions de bichromate de potassium avec des concentrations 10mg/l (1/10), 1mg/l (1/100) et 0.1mg/l (1/1000).

Annexe 4 :

Préparation de l'eau d'élevage au laboratoire ONEE-branche eau :

L'eau d'élevage doit avoir un pH de 7.8 ± 0.2 , une dureté totale de 250 ± 25 mg/l un rapport Ca/Mg voisin de 4/1 et une concentration en oxygène dissous supérieur à 80% de la saturation dans l'air.

Réactifs

- Hydrogénocarbonate de sodium anhydre (NaHCO_3)
- Chlorure de potassium (KCl)
- Chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Eau distillée

Mode de préparation

Préparer les solutions suivantes :

- **Solution de chlorure de calcium :** Dissoudre 11,76g de chlorure de calcium dihydraté dans l'eau et compléter à 1 litre avec l'eau distillée.
- **Solution de sulfate de magnésium :** Dissoudre 4,93g de sulfate de magnésium heptahydraté dans l'eau et compléter à 1 litre avec l'eau distillée.
- **Solution de d'hydrogénocarbonate de sodium :** Dissoudre 2,59g d'hydrogénocarbonate de sodium dans l'eau et compléter à 1 litre avec l'eau distillée.
- **Solution de chlorure de potassium :** dissoudre 0,23g de chlorure de potassium dans l'eau et compléter à 1 litre avec l'eau distillée.

Mélanger 25 ml de chacune des quatre solutions (1 à 4) et amener le volume total à un litre avec l'eau distillée.

Le milieu ainsi préparé, doit être aéré jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous ait atteint la valeur de saturation de l'air et jusqu'à stabilisation de pH.

Annexe 5 :

Préparation de la nourriture synthétique :

La nourriture synthétique est constituée d'un mélange de volume de trois solutions :

- Solution de tetramin
- Solution de levure
- Solution de cerophylle

Réactifs

- Cerophylle (feuilles de céréales déshydratées)
- Levure sèche
- Nourriture de poisson (Tetramin ou équivalent)
- Eau distillée

Mode de préparation

Préparation des solutions suivantes :

- ❖ **Solution de tetramin (nourriture de poisson broyée) :** mettre 5g de tetramin dans un litre d'eau distillée et le laisser sous agitation pendant 7 jours. Décanté pendant une nuit à 4°C et enfin prélever 300 ml de surnageant.
- ❖ **Solution de cerophylle :** peser 5 g de cerophylle, le mettre dans un litre d'eau distillée et le laisser sous agitation pendant 5 min. Décanté pendant une nuit. Prélever 300 ml du surnageant.
- ❖ **Solutions de levure :** mettre 5g de levure dans un litre d'eau distillée et le laisser sous agitation pendant 10min. Prélever 300 ml (sans décantation).

Mélanger 300ml de chacune des trois préparations.

Préparation du milieu de culture algale :

Ajouter à 900 ml d'eau distillée ou déminéralisée les quantités suivantes de solutions mères :

- a) 5ml de chacune des mères de macroéléments suivantes :

Composés	Concentration (g/l)
NaNO ₃	25
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	7.5
K ₂ HPO ₄	7.5
KH ₂ PO ₄	17.5
NaCl	2.5

b) 0.5 ml de chacune des solutions mères suivantes :

Composés	Concentration (g/l)
EDTA-Na ₂	50
KOH	31
FeCl ₃ .6H ₂ O+1ml H ₂ SO ₄	4.84
H ₃ BO ₃	11.42

c) 0.5 ml de la solution de microéléments suivante :

Composés	Concentration (g/l)
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.44
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.82
MoO ₃	0.71
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.57
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.49

- Jauger à 1000 ml avec de l'eau distillée ou déminéralisée.
- Le pH de ce milieu de culture est d'environ 7.5.

Le milieu de culture reconstitué est autoclavé (121°C, 1.06-1.20 kg/cm²) 10min/l ou un minimum de 30 minutes pour les volumes inférieurs à 3l. Laisser refroidir. Ces solutions peuvent se conserver six mois à 4°C et à l'obscurité.

Annexe 6 :

Fiches récapitulatives des protocoles d'essai normalisés utilisés dans cette étude :

1- Fiche d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (24/48h) :

Nom l'essai	Détermination de l'inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna</i> Straus
Norme, année	NM ISO 6341, 2014
Organisme test	<i>Daphnia magna</i> âgée de moins de 24 h obtenue par parthénogenèse
Type d'essai	Statique (sans renouvellement de milieu)
Domaine d'application	Substances chimiques, effluents industriels et urbains, eaux de surface et eaux souterraines
Principe de l'essai	Détermination de la concentration initiale qui, en 24/48 h, immobilise 50% de <i>Daphnia magna</i> mises en expérimentation
Durée de l'essai	24 h /48h
Récipient	Tubes à essais
Volume de solutions d'essai par récipient	10 ml
Mise en contact	5 daphnies par récipient à raison de 4 répliques par concentration testée
Critère d'effet	Mobilité des jeunes daphnies
Température de réalisation de l'essai	20 °C ± 2 °C

Condition d'éclairage	Obscurité ou sous un cycle jour/nuit de 16 h/8h
Critères de validité	a) Teneur en oxygène dissous ≥ 2 mg/l en fin d'essai b) Pourcentage immobilisation dans les témoins $\leq 10\%$ c) CE -24 h du $K_2Cr_2O_7$ comprise entre 0,6 mg/l et 1,7 mg/l

2- Fiche de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis *Daphnia magna straus* :

Nom l'essai	Détermination de la toxicité à long terme des substances vis-à-vis de <i>Daphnia magna Straus</i> (Cladocera, Crustacea)
Norme, année	NM ISO 10706, 2014
Organisme test	<i>Daphnia magna Straus</i> âgées de moins de 24 h obtenues par parthénogenèse.
Type d'essai	Semi-statique (au moins trois renouvellements par semaine) ou à renouvellement continu
Domaine d'application	Essais de produits chimiques
Principe de l'essai	Mesure de la survie et la capacité reproductrice des parents mis en expérimentation et détermination de la NOEC et la LOEC
Durée de l'essai	21 jours
Récipient	Tubes à essais ou béchers en verre propres et non contaminés
Volume de solutions d'essai par récipient	50 ml ou 100 ml
Mise en contact	1 jeune daphnie par récipient à raison de 10 répliques par concentration
Critère d'effet	Survie des mères ; nombre de descendants vivants ; capacité reproductrice des mères ; taille ; nombre de ponte
Température de réalisation de l'essai	comprise entre 18 °C et 22 °C
Aération	Aération naturel
Condition d'éclairage	Sous un cycle jour/nuits de 16 h/8 h ; l'intensité lumineuse recommandée de 15 – 20 µE.m .s

Nourriture	Algues unicellulaires dont le ration alimentaire 0.1 et 0.2 mg de C/Daphnia/jour (<i>Chlorella sp.</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (anciennement <i>Selenastrum capricornutum</i>) et <i>Desmodesmus subspicatus</i>
Critères de validité	a) La mortalité des animaux parents (<i>Daphnia</i> femelles) ne dépasse pas 20 % à la fin de l'essai b) Le nombre moyen de descendants vivants par animal parent survivant à la fin de l'essai est ≥ 60

3- Fiche de la toxicité à court terme de substances vis-à-vis *Danio rerio*

Nom l'essai	Détermination de la toxicité létale aiguë
Norme, année	NF ISO 15088, 2007
Organisme test	Oeufs fécondés obtenue par production des géniteurs
Type d'essai	Statique (sans renouvellement de milieu)
Domaine d'application	Substances chimiques, eaux résiduaires
Principe de l'essai	Détermination de la concentration initiale qui, en 24/48 h, immobilise 50% de <i>Danio rerio</i> mises en expérimentation
Durée de l'essai	24 h /48h
Récipient	Tubes à essais/récipients en verre/microplaques en verre
Volume de solutions d'essai par récipient	Dépend de tube de récipients
Mise en contact	Au moins 10 oeufs fécondés par récipient répliques
Critère d'effet	Coagulation-détachement de la queue du jaune d'œuf- battement du cœur
Température de réalisation de l'essai	26 °C ± 1 °C
Condition d'éclairage	Obscurité ou sous un cycle jour/nuit de 16 h/8h
	a) Teneur en oxygène dissous ≥ 60 en fin d'essai

Critères de validité	b) La mortalité des poissons témoins ne dépasse pas 10 % par réservoir c) La proportion de poissons témoins présentant un comportement anormal ne dépasse pas 10 % par réservoir
-----------------------------	--

4- Fiche de la toxicité 10 jours d'exposition de substances vis-à-vis *Danio rerio* :

Nom l'essai	Détermination de la toxicité de 10 jours
Norme, année	NF ISO 12890, 1989
Organisme test	Oufs fécondés obtenue par production des géniteurs
Type d'essai	Semi-statique (au moins deux renouvellements par semaine) ou à renouvellement continu
Domaine d'application	Essais de produits chimiques
Principe de l'essai	Mesure de la survie des parents mis en expérimentation et détermination de la NOEC et la LOEC
Durée de l'essai	10 jours
Récipient	Récipient en verre
Volume de solutions d'essai par récipient	50 ml ou 100 ml
Mise en contact	1 œuf fécondé par récipient à raison de 10 répliques par concentration
Critère d'effet	la survie, le taux d'éclosion, le pourcentage de l'arrêt cardiaque, le pourcentage de poisson zèbre nageant et les malformations
Température de réalisation de l'essai	26 °C ± 1 °C
Aération	Aération par pompe
Condition d'éclairage	Sous un cycle jour/nuit de 16 h/8 h
Nourriture	Tetramin et juvéniles de <i>Daphnia magna</i>

Critères de validité	a) Teneur en oxygène dissous ≥ 60 en fin d'essai b) La mortalité des poissons témoins ne dépasse pas 10 % par réservoir c) La proportion de poissons témoins présentant un comportement anormal ne dépasse pas 10 % par réservoir
-----------------------------	--

5- Fiche de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis *Danio rerio* :

Nom l'essai	Détermination de la toxicité à long terme
Norme, année	NF ISO 12890, 1989
Organisme test	Œufs fécondés obtenue par production des géniteurs
Type d'essai	Semi-statique (au moins deux renouvellements par semaine) ou à renouvellement continu
Domaine d'application	Essais de produits chimiques
Principe de l'essai	Mesure de la survie des parents mis en expérimentation et détermination de la NOEC et la LOEC
Durée de l'essai	10 jours
Récipient	Récipient en verre
Volume de solutions d'essai par récipient	2 à 4L
Mise en contact	10 œuf fécondés par récipient à raison de 10 répliques par concentration
Critère d'effet	la survie, le taux d'éclosion, le pourcentage de l'arrêt cardiaque, le pourcentage de poisson zèbre nageant et les malformations
Température de réalisation de l'essai	26 °C ± 1 °C
Aération	Aération par pompe
Condition d'éclairage	Sous un cycle jour/nuit de 16 h/8 h
Nourriture	Tetramin et juvéniles de <i>Daphnia magna</i>

Critères de validité	a) la concentration d'oxygène dissous doit être $> 60 \%$ tout au long de l'essai ; b) la température de l'eau ne doit varier de plus de $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ entre les différentes enceintes expérimentales ou entre deux jours consécutifs. c) le dosage analytique des concentrations expérimentales est obligatoire. d) le taux de survie des œufs fécondés dans les groupes témoins doit être supérieur ou égal 70% à l'éclosion et 75% après éclosion.
-----------------------------	--

Résumé

La présente étude vise à identifier les différentes formes du glyphosate utilisés dans la région Rabat-Salé-Kénitra, et l'étude de la toxicité chronique du glyphosate chez deux espèces d'eau douce *Daphnia magna* et *Danio rerio*, afin d'évaluer le risque de cet herbicide sur les organismes aquatiques. Pour ce faire, nous avons mené une enquête, à l'aide de 70 fiches questionnaires, qui nous ont permis de collecter le maximum d'informations concernant les usages du glyphosate dans cette région. Des tests chroniques pour les deux modèles biologiques, ont été réalisés au sein du laboratoire ONEE-Branche Eau, pour déterminer des concentrations critiques pour les espèces dulçaquicoles (NOEC, LOEC, EC₅₀). De même, nos résultats soulignent l'intérêt de l'utilisation des tests multigénération dans l'étude des effets à long terme de ces substance sur une espèce clé d'eau douce *Daphnia magna*. Les résultats montrent que la survie et la reproduction ont été réduites significativement avec l'augmentation de la concentration du pesticide chez les parents et les descendants des daphnies. L'effet toxique du glyphosate est plus prononcé chez la génération fille F4 que chez la génération parentale F0. L'analyse des résultats des tests a révélé que le glyphosate est toxique pour le poisson zèbre. Les résultats montrent que le glyphosate affecte le taux d'éclosion, le rythme cardiaque et la nage des poissons zèbres. Cet effet est significatif la concentration maximale 4 mg/L. L'étude comparative de la sensibilité de *Daphnia magna* au glyphosate par rapport à *Danio rerio*, a révélé que les poissons zèbres sont les organismes aquatiques les plus sensibles pour le paramètre de la survie. L'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt des deux modèles *Daphnia magna* et *Danio rerio* dans l'étude de la toxicité chronique des produits phytosanitaires.

Mots clés : glyphosate, région Rabat-Salé-Kénitra, toxicité aigüe, toxicité chronique, multigénération, *Daphnia magna*, *Danio rerio*, étude comparative.

Abstract

The present study aims to identify the different forms of glyphosate used in the Rabat-Salé-Kénitra region and to study the chronic toxicity of glyphosate in two freshwater species *Daphnia magna* and *Danio rerio* in order to evaluate the risk of this herbicide on aquatic organisms. To do this, we conducted a survey using 70 questionnaire forms that allowed us to collect as much information as possible concerning the uses of glyphosate in this region. Chronic tests for the two biological models were carried out in the ONEE-Branche Eau laboratory to determine critical concentrations for freshwater species (NOEC, LOEC, EC₅₀). Similarly, our results underline the interest of using multi-generation tests in the study of the long-term effects of these substances on a key freshwater species *Daphnia magna*. The results show that survival and reproduction were significantly reduced with increasing pesticide concentration in parents and offspring of daphnids. The toxic effect of glyphosate was more pronounced in the F4 daughter generation than in the F0 parental generation. Analysis of the test results revealed that glyphosate is toxic to zebrafish. The results show that glyphosate affects the hatching rate, heart rate and swimming performance of zebrafish. This effect was significant at the maximum concentration of 4 mg/L. The comparative study of the sensitivity of *Daphnia magna* to glyphosate versus *Danio rerio*, revealed that zebrafish are the most sensitive aquatic organisms for the survival parameter. All these results underline the interest of the two models *Daphnia magna* and *Danio rerio* in the study of the chronic toxicity of phytosanitary products.

Key words : glyphosate, Rabat-Salé-Kénitra region, acute toxicity, chronic toxicity, multigenerations, *Daphnia magna*, *Danio rerio*, comparative study.