

Effet neutralisant *in vitro* des pH basiques par les excréctions cutanées de *Lumbricus terrestris*

In vitro neutralizing effect of basic pH by *Lumbricus terrestris*'s cutaneous excreta

Manuscrit reçu le 16 février 2016 et accepté le 18 août 2016

Mohamed RAOUANE¹ et Abdellatif EL HARTI²

Université Mohammed V- École Normale Supérieure- Laboratoire d'Amélioration de la Productivité
des sols et Environnement (LAPSE)
Avenue M^{ed} Belhassan El Ouazani – Takaddoum- BP : 5118- Rabat – Maroc

Résumé :

L'étude du rôle de *Lumbricus terrestris* dans la régulation du pH a suscité notre intérêt en raison de l'importance de ce facteur dans la fertilité du sol. Pour atteindre cet objectif, nous avons mis au point un nouveau protocole expérimental, entièrement réalisé en dehors du sol, afin d'écartier les interférences possibles sur la variation du pH. La procédure par immersion des vers dans des solutions réactionnelles à différents pH basiques a permis la délimitation d'une zone de tolérance *in vitro* comprise entre pH=7 et pH=12. Dans cette zone, plus le pH s'écarte de la neutralité, plus la réaction des vers est intense et plus la production des excréctions cutanées est abondante. On assiste instantanément à une tendance à la neutralisation progressive des solutions réactionnelles basiques. La procédure par pulvérisations régulières des vers par les mêmes solutions réactionnelles basiques a permis de constater que plus le pH s'écarte de la neutralité plus la diminution du poids frais moyen des vers est importante. Cette chute du poids frais confirme la libération des excréctions cutanées constatée *de visu* lors de la première procédure. Dans une autre expérience nous démontrons que l'effet neutralisant est fonction du poids frais des vers. En fin, l'application des excréctions cutanées isolées à partir des vers sur des solutions réactionnelles basiques entraîne également une tendance à la neutralisation du pH de ces dernières. Compte tenue de ces résultats, on peut dire que dans la nature *Lumbricus terrestris* interviendrait directement par l'intermédiaire de ses excréctions cutanées dans la neutralisation des sols aux pH basiques.

Mots clés : Excréments cutanés, Effet neutralisant, pH, *Lumbricus terrestris*, vers de terre.

Summary:

Given that *Lumbricus terrestris* represents an important factor in soil fertility, our interest was sparked to study its role in pH regulation. To achieve this purpose, we developed a new experimental protocol which is entirely realised outside the soil in order to exclude potential interferences that may affect the pH variation.

We proceeded by immersing the worms in various reactional solutions having various levels of basic pH. This process allowed us to define a tolerance zone *in vitro* ranging between pH=7 and pH=12. In this tolerance area, the more the pH deviates from neutrality, the more the worms' reaction is intense and the more the production of cutaneous excretions becomes abundant. Along with the production of these excretions, we instantly witness a trend towards the gradual

¹ Adresse électronique : mohamed.raouane@yahoo.fr

² Adresse électronique : elharti.abdel@yahoo.fr

neutralisation of the basic reactional solutions. By regularly spraying the worms with the same basic reactional solutions, we could notice that the average fresh weight of worms decreases significantly the more the pH deviates from neutrality. The fresh weight's decrease confirms the release of cutaneous excretions observed during the first process. Another experiment of our study reveals that the neutralising effect is a function of the worms' fresh weight. As a last experiment, we applied cutaneous excretions, previously isolated from worms, on basic reactional solutions. This process showed that the isolated excretions lead to a trend to the neutralisation of the basic reactional solutions.

In light of these results, we can say that, in nature, *Lumbricus terrestris* intervenes directly through its cutaneous excretions in neutralizing soil having a basic pH.

Keywords : Cutaneous excreta, Neutralizing effect, pH, *Lumbricus terrestris*, Worms.

1. Introduction :

L'apport des vers de terre dans l'amélioration de la productivité des sols n'est plus à démontrer. La littérature abonde de travaux mettant en évidence le rôle primordial de ces animaux dans la rhizosphère. Les vers de terre agissent positivement sur les sols aussi bien au niveau de sa composante minérale et organique grâce aux processus de structuration, de minéralisation et d'humification (Lee 1985; Lavelle 1988; Parkinson et McLean 1998 ; Edwards et Bohlen 1996), qu'au niveau de sa composante biologique notamment dans la croissance et la dissémination des microorganismes indispensables à la fertilité du sol (Fayolle 1982 ; Double et al. 1994 ; Alpei et al. 1996) ainsi que dans la stimulation de la néoformation racinaire chez les plantes supérieures (El Harti et al. 2001a, 2001 b ; Lavelle et al. 2006 ; Eisenhauer et al. 2007). La relation vers de terre et pH du sol n'est pas encore définitivement élucidée. La majorité des études à caractère écologique et agronomique se sont intéressées à l'impact du pH sur le mode de vie et la répartition des différentes espèces de vers de terre (Bouché 1970). A l'inverse, les études relatives à l'impact des vers de terre sur le pH du sol sont relativement moins nombreuses et souvent non concordantes. L'effet neutralisant du pH par les lombricidés a été signalé par Schrader (1994), Rätty (2004) et Singh et al (2005). Certains travaux évoquent le rôle du transit intestinal des vers dans cette neutralisation (Satchell 1958), d'autres soupçonnent l'intervention du mucus par interaction avec les composés azotés du sol (Haimi et Huhta 1990 ; Tiunov et Scheu 1999). Toutes ces études ont été réalisées dans le sol, habitat naturel des vers de terre. Dans ces conditions, les mesures de pH sont souvent entachées d'incertitudes en raison des interférences multiples résultant des interactions complexes entre les vers et les composantes chimiques et biologiques du sol.

Dans un précédent travail, nous avons pu démontrer pour la première fois l'implication directe des excréments cutanés de *Lumbricus terrestris* sur la neutralisation des solutions acides (Raouane et El Harti 2015). Dans la présente contribution, on se propose de démontrer l'impact de la même espèce de vers de terre sur, cette fois ci, les pH basiques. Nous avons maintenu à cet égard le même protocole expérimental, permettant d'écartier les interférences multiples du sol sur le pH. Nous avons testé l'action et la réaction des vers dans des solutions réactionnelles de pH basique connu. Nous avons suivi instantanément l'évolution du pH de ces solutions ainsi que la variation du poids frais des vers. La relation variation du pH, variation du poids frais des vers et production des excréments cutanés est démontrée avec succès. En fin, nous avons testé directement le pouvoir neutralisant de ces excréments après leur isolement des vers par une méthode déjà mise au point par

notre laboratoire (El Harti et al. 2001a). Les résultats obtenus dans ce travail pourraient avoir des applications dans l'amélioration de la fertilité des sols initialement pauvres du fait de leur pH basique défavorable (sols calcaires) mais aussi des sols fragilisés par l'emploi excessif de polluants basiques (détergents, pesticides, engrais).

2. Matériel et méthodes :

Lumbricus terrestris est récolté dans une zone humide située à 40Km au Nord Ouest de Rabat (Kénitra-Maroc). Cette espèce est très représentative car elle appartient au groupe des vers anéciques qui constitue 80% des lombricidés.

2.1. Préparation des vers de terre à l'expérimentation (mise à jeun)

Les vers de terre fraîchement récoltés du terrain sont rincés à l'eau courante puis enrobés par lots de 20 spécimens dans des morceaux de tissu en coton préalablement humectés. Les lots de vers sont répartis en autant de pots en terre cuite préalablement humectés. Les vers sont maintenus à jeun pendant 7 jours à température constante de 20°C. À chaque 24H on élimine les déjections par rinçage des lots de vers et nettoyage du tissu enrobant à l'eau désionisée. Au 7^{ème} jour de jeûne, on note un épuisement sensible des déjections solides. Les lots de vers sont ainsi prêts à l'expérimentation.

2.2. Préparation des solutions réactionnelles à différents pH basiques

Les solutions expérimentales à différents pH basiques (pH=14, pH=13, ..., pH=8) sont préparées par dilution d'une solution mère de NaOH (1M). Les valeurs de pH basiques correspondent théoriquement aux valeurs des concentrations molaires (C) successives de 10^{-1} , 10^{-2} , ...et 10^{-6} M selon les relations $\text{pH} = -\log C$ et $\text{pH} + \text{pOH} = 14$. Les mesures du pH sont effectuées à l'aide d'un pH-mètre de type Adwa (AD 1030). Si le pH mesuré d'une solution ne correspond pas exactement au pH théorique, il est admis de l'ajuster à la valeur théorique par quelques gouttes d'une solution de NaOH très diluée. Étant donné que l'eau distillée est légèrement acide, le pH de la solution neutre (pH=7) est obtenu par ajustement avec quelques gouttes d'une solution de NaOH très diluée. On prélève des volumes déterminés de ces solutions réactionnelles pour les utiliser dans les 4 séries d'expériences.

2.3. Préparation de la solution d'excrétions cutanées des vers

Le terme excrétions cutanées sous-entend tous les liquides biologiques produits par la surface corporelle des vers.

On utilise la méthode de stimulation de la production des excrétions cutanées mise au point par notre laboratoire (El Harti et al. 2001a). Cette méthode est basée sur l'hypersensibilité des vers aux substances chimiques volatiles telles que l'éther de pétrole. Les vers de terre préalablement privés de nourriture pendant au moins 7 jours (§ 2.1), sont rincés à l'eau fraîchement distillée puis séchés délicatement par enroulement dans du papier Joseph (FISHERBRAND/W257RK). On note le poids frais initial du lot de vers (Pi). Le lot de vers est déposé dans un petit cristalliseur renfermant au

centre un récipient rempli à moitié par de l'éther de pétrole. On ferme hermétiquement le cristallisateur. Dès que l'atmosphère du cristallisateur se charge en éther de pétrole volatil, les vers réagissent énergiquement en libérant des excréments abondants. On arrête la stimulation au bout de 15 min environ dès que les vers entrent en anesthésie. On retire le récipient rempli d'éther puis on récupère les excréments gluantes par rinçage et agitation dans un bain de 50 mL d'eau fraîchement distillée. Le lot de vers est retiré du bain puis séché par du papier Joseph. On détermine le poids frais final (Pf) des vers. La quantité des excréments cutanés est déterminée par la différence du poids frais du lot de vers avant et après stimulation (Pi-Pf). Les mesures du poids frais sont effectuées à l'aide d'une balance de précision de type RADWAG (PS210/C/2). Cette opération est répétée deux fois afin d'obtenir 100 mL de solution mère d'excréments cutanés. Le poids frais total de vers utilisés étant de 23,5 g, celui des excréments cutanés obtenu est de 1,2 g par 100 mL d'eau distillée. La solution mère d'excréments est enfin évaporée à l'étuve pendant 48 heures à une température de 70 °C. Au moment de l'expérience, le résidu sec des excréments est récupéré dans 100 mL d'eau fraîchement distillée. La valeur de son pH après homogénéisation étant égale à 7,6. La mise à sec des excréments est une étape nécessaire pour l'élimination de toutes substances volatiles acides ou basiques libérées en même temps que les excréments cutanés et donc susceptibles d'intervenir sur les pH des solutions réactionnelles.

3. Protocole expérimental

3.1. Immersion des lots de vers dans les solutions réactionnelles à différents pH basiques.

Les vers de terre préalablement préparés à l'expérimentation (§ 2.1) sont répartis en 8 lots. Le poids frais de chacun des lots est de 5g environ (Pi). Chaque lot de vers est introduit dans un tube à essai contenant 20 mL de la solution expérimentale de pH déterminé. Au total 8 lots de vers pour 8 valeurs de pH. On commence l'expérience à partir du tube 1 de pH 7 et on termine par le tube 8 de pH 14. Les vers de terre vivants sont ainsi complètement immergés dans les solutions réactionnelles. On appelle pH_i la valeur du pH initial dans chaque tube à t=0. La durée totale de cette expérience est de 30 min. On effectue des mesures de pH toutes les 5 min après homogénéisation des solutions réactionnelles. En fin d'expérience, les lots de vers sont évacués des tubes puis rincés rapidement et séchés par du papier Joseph. On note le poids frais final (Pf) de chaque lot. L'expérience par immersion est répétée 5 fois à partir de nouveaux lots de vers dans le but de vérifier la reproductibilité des résultats.

3.2. Pulvérisation des lots de vers par des solutions réactionnelles à différents pH basiques

Comme dans l'expérience précédente, on utilise 8 lots de vers préalablement préparés à l'expérimentation (§ 2.1). Le poids frais initial (Pi) de chacun des lots étant de 5g environ. Chaque lot de vers est déposé dans un entonnoir de Buchner pour y subir des pulvérisations répétitives par 20 mL de solution à pH déterminé (lot1, pH=7) ;(lot2, pH=8) ;... ;(lot8, pH=14). L'entonnoir de Buchner a l'avantage de permettre l'écoulement des solutions pulvérisées évitant ainsi l'immersion totale des vers. Après l'opération de pulvérisation, les lots de vers sont rapidement rincés, séchés puis pesés. On note le poids frais final (Pf) de chaque lot après traitement. La différence des poids frais des lots de vers avant et après pulvérisation représente la quantité d'excréments cutanés

produites pour chaque valeur de pH. Cette quantité d'excrétions est exprimée en pourcentage par rapport au poids frais initial (Pi) soit $(Pi-Pf/Pi \times 100)$. L'expérience de pulvérisation est répétée 5 fois à partir de nouveaux lots de vers.

3.3. Immersion des vers de poids frais différents dans une solution réactionnelle à pH=10

Les vers de terre préalablement préparés à l'expérimentation (§ 2.1) sont répartis en lots de 5g, 8g et 11g environ. Chacun des lots est introduit dans 10 mL d'une solution réactionnelle à pH=10. L'immersion dure 30 min et les prises de pH sont effectuées toutes les 2 min. L'expérience est répétée 5 fois en utilisant de nouveaux lots de vers.

3.4. Effet de la solution des excréments cutanées sur des solutions basiques

La solution des excréments cutanées à 0,6 g/50 mL d'eau distillée, obtenue par la méthode de stimulation à l'éther de pétrole (§ 2.3), est dilacérée au Potter puis homogénéisée au Vortex. Son pH étant de 7,6. À l'aide d'une seringue, on fait agir cette solution par fraction de 1mL respectivement sur 10 mL des solutions réactionnelles à pH=9, pH=10 et pH=11. Des mesures de pH sont alors effectuées au fur et à mesure. La même expérience est reproduite à blanc en faisant agir uniquement de l'eau distillée dont le pH est ajusté au préalable à celui des excréments cutanées (pH=7,6) par quelques gouttes d'une solution de NaOH diluée. Ce test à blanc servira à connaître la part de l'effet de la fixation du CO₂ atmosphérique sur la diminution du pH des solutions réactionnelles basiques.

3.5. Expression des résultats et analyses statistiques

L'évolution des valeurs du pH des solutions réactionnelles ainsi que celle du poids frais des lots de vers est représentée par les valeurs moyennes des 5 répétitions. L'analyse statistique des résultats est réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT. L'analyse ANOVA suivie du test de Dunnett avec un intervalle de confiance de 95% a été retenue. Ce type d'analyse est réalisé sur les données relatives aux variations du pH des solutions réactionnelles après immersion des lots de vers. Ces variations sont exprimées en unités de pH (U) correspondant à la différence du pH de la solution réactionnelle avant et après immersion des vers pendant 30 min. Les données concernant la solution de pH=7 étant considérées comme témoins. L'analyse ANOVA suivie du test de Dunnett avec un intervalle de confiance de 95% est également retenue pour les variations du poids frais moyen des lots de vers après pulvérisation par différentes solutions réactionnelles. Dans tous les cas, la solution réactionnelle de pH égal à 7 est considérée comme modalité témoin. Concernant l'effet du poids frais des lots de vers sur la variation du pH de la solution réactionnelle basique exprimée en unité de pH (U) après immersion pendant 30 min, l'analyse ANOVA est réalisée et le test de Dunnett est retenu pour faire une comparaison bilatérale entre les résultats obtenus à partir des poids frais de 5g et 8g d'une part et ceux obtenus à partir des poids frais de 5g et 11g d'autre part.

4. Résultats :

4.1. Comportement des vers en immersion dans les solutions réactionnelles

L'immersion totale des lots de vers pendant 30 min dans les solutions réactionnelles à différents pH basiques engendre une réaction plus ou moins importante des vers. Cette réaction se manifeste par une agitation plus ou moins intense accompagnée d'une production d'excrétions cutanées plus ou moins abondantes. La réaction des vers est d'autant plus importante que la valeur du pH des solutions réactionnelles s'écarte de la zone de neutralité du pH comprise entre 7 et 8. En effet, plus le pH des solutions est basique (pH=9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 et 14), plus l'agitation des vers est importante et plus les solutions réactionnelles respectives deviennent troubles, de couleurs blanchâtres à jaunâtres. L'observation minutieuse des vers en agitation montre une libération plus ou moins importante des excrétions cutanées à partir de leur surface corporelle. Quelque soit la valeur du pH de la solution d'immersion, aucun rejet de détritiques solides provenant du sol via le tube digestif des vers n'a été constaté. Dans les solutions aux pH extrêmes basiques (pH=14, pH=13) on assiste à la mort des vers suite à la décomposition par hydrolyse alcaline de leur surface corporelle. La mort est presque instantanée à pH=14, alors qu'à pH=13 la mort survient en fin d'expérience après 30 min d'immersion.

4.2. Variation du pH et du poids frais des vers après immersion

4.2.1. Variation du pH des solutions réactionnelles

En relation avec la réaction des vers, on relève une variation plus ou moins importante des valeurs moyennes du pH des solutions réactionnelles respectives en fonction du temps (Tableau 1). On écarte de cette analyse les solutions aux pH=14 et pH=13 en raison de leur effet létal sur les vers. L'immersion des lots de vers dans les solutions aux pH voisins de la neutralité (pH=7 et pH=8) n'apporte pas de variations importantes des valeurs moyennes du pH en fonction du temps. L'immersion des lots de vers dans les solutions réactionnelles aux pH franchement basiques (pH > 8) provoque respectivement une diminution importante des valeurs moyennes du pH en fonction du temps (Tableau 1) traduisant une tendance vers la neutralisation des solutions réactionnelles. On remarque que la variation moyenne du pH des solutions est importante dans les 15 premières minutes de l'immersion. Au-delà, cette variation ralentit puis se stabilise plus ou moins bien vers 30 min d'immersion.

Tableau 1 : Variation des pH initiaux des solutions réactionnelles (pHi=7, 8, ..., 14) en fonction du temps d'immersion des lots de *Lumbricus terrestris.L* (Lot 1, Lot 2, . . . , Lot 8).

Temps (min)	Zone de neutralité du pH		Zone de pH basique tolérable <i>in vitro</i>				Zone de pH basique létal	
	Lot 1 (pHi=7)	Lot 2 (pHi=8)	Lot 3 (pHi=9)	Lot 4 (pHi=10)	Lot 5 (pHi=11)	Lot 6 (pHi=12)	Lot 7 (pHi=13)	Lot 8 (pHi=14)
5	7,11±0,06	7,81±0,15	8,55±0,18	9,68±0,33	10,77±0,09	11,44±0,25	X	
10	7,10±0,06	7,71±0,17	8,14±0,20	9,51±0,27	10,47±0,31	11,08±0,20		
15	7,09±0,07	7,68±0,18	8,01±0,12	9,36±0,20	10,32±0,20	10,79±0,09		
20	7,07±0,05	7,58±0,12	7,83±0,13	9,04±0,08	10,22±0,22	10,60±0,17		
25	7,04±0,03	7,52±0,11	7,63±0,15	8,86±0,08	9,97±0,26	10,34±0,02		
30	7,03±0,02	7,49±0,09	7,54±0,14	8,62±0,05	9,65±0,30	10,22±0,15		

La différence de pH moyen des solutions réactionnelles, exprimée en unité moyenne de pH (U), après 30 min d'immersion des lots de vers est représentée dans la figure1. Cette différence ($U = \text{pH}_{\text{initial}} - \text{pH}_{\text{final}}$) traduit l'évolution du pH des solutions réactionnelles en fin d'expérience. Nous constatons qu'aux valeurs de pH basique croissant (pH=8 ; 9 ; 10 ; 11 et 12), la variation moyenne du pH des solutions réactionnelles est de plus en plus importante. Cette variation est de 0,5U pour la solution à pH initial égal à 8 alors qu'elle atteint 1,85U pour la solution à pH initial égal à 12. L'analyse statistique des résultats exposés montre que les écart-types sont de plus en plus élevés lorsque les lots de vers sont placés en solution de basicité croissante. Aux pH voisins de la neutralité, ces écart-types présentent des valeurs faibles. Le test de Dunnett au seuil de 0,95 appliqué aux résultats relatifs à la variation du pH des solutions réactionnelles après immersion des vers (Figure 1) donne une différence hautement significative ($\text{Pr} < 0,0001$) par rapport à la modalité témoin (solution à pH=7).

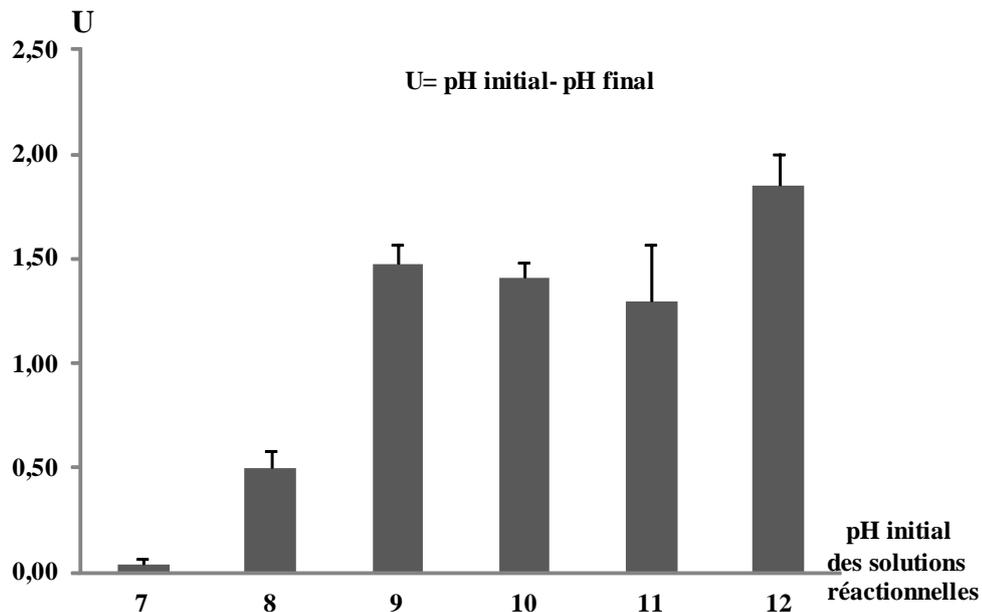


Figure 1 : Variations moyennes du pH des solutions réactionnelles basiques, exprimées par la différence (U) entre le pH initial et le pH final après 30 min d’immersion des lots de *Lumbricus terrestris*.

(Test de Dunnett : Différences très significative ($Pr < 0,0001$) entre les variations du pH de la solution réactionnelle à $pH_i=7$ (modalité témoin) et les variations du pH des autres solutions réactionnelles à $pH_i=8, \dots, pH_i=12$).

4.2.2. Variation du poids frais des vers

Parallèlement à la variation du pH des solutions réactionnelles, nous avons tenu à suivre celle du poids frais moyen des lots de vers après 30 min d’immersion. Les résultats obtenus ne sont pas présentés dans ce travail en raison de leur incohérence par rapport à nos observations précédentes sur le comportement des vers en immersion (§ 4.1). Normalement, la production d’excrétions cutanées par les vers devrait s’accompagner d’une perte de poids ce qui n’est pas souvent le cas. Ces résultats contradictoires, qui feront l’objet d’une discussion, nous ont incités à changer de protocole (pulvérisation au lieu de l’immersion) pour mettre en évidence la variation du poids frais des vers en fonction du pH des solutions réactionnelles (§ 4.4).

4.3. Variation du pH des solutions réactionnelles en fonction du poids frais des vers

Pour cette expérience, nous avons tenté de vérifier si la zone de neutralité du pH ($7 \leq pH \leq 8$) est atteinte beaucoup plus rapidement en augmentant la quantité de vers de 5g, 8g à 11g environ. La figure 2 montre que la vitesse de neutralisation des solutions basiques ($pH=10$) est effectivement fonction de la quantité des vers utilisée.

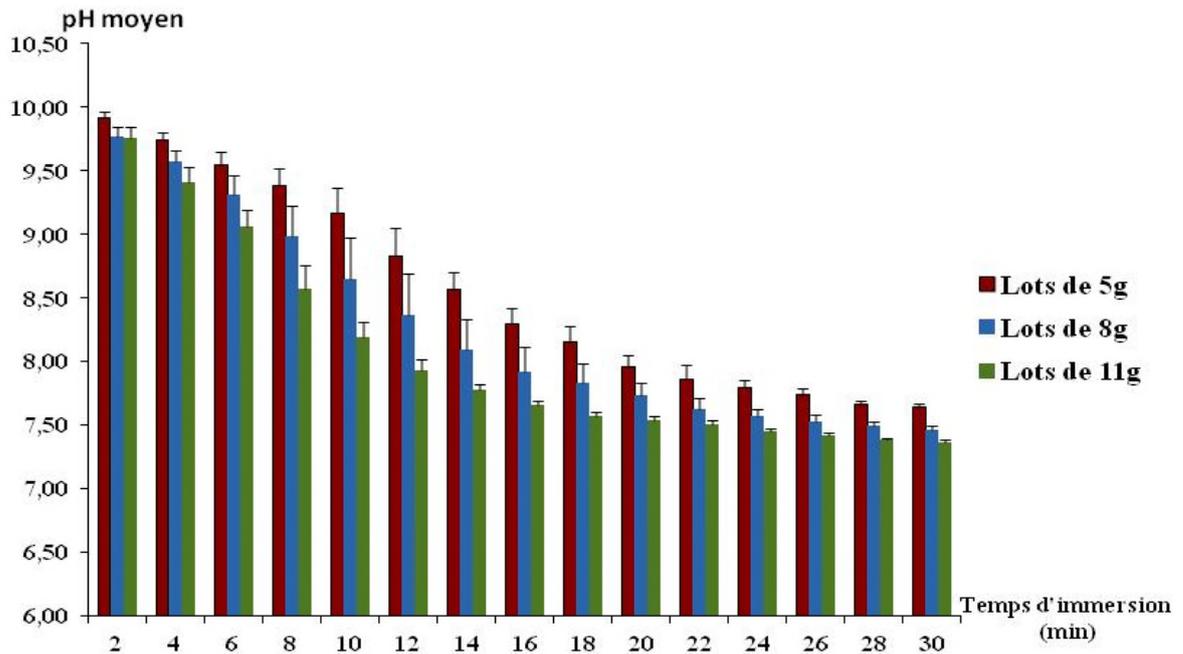


Figure 2 : Évolution du pH moyen d’une solution réactionnelle de pH initial égal à 10 en fonction du temps d’immersion (min) et en fonction des poids frais moyens (5, 8 et 11 g) des lots de *Lumbricus terrestris*.

(Test de Dunnett : Différence hautement significative ($Pr < 0,0001$) entre les variations du pH de la solution réactionnelle après immersion pendant 30 min des lots de 5g (lots témoins) et celles enregistrées pour les lots de 8g et 11g).

Ainsi la zone de neutralité du pH est atteinte après des temps moyens de 20 min, 16 min et 12 min d’immersion correspondant respectivement aux lots de vers de poids frais moyen de 5g, 8g et 11g. Nous constatons donc que la zone de neutralité du pH est atteinte plus rapidement quand on augmente la quantité de vers. Les écart-types présentent généralement des valeurs de plus en plus faibles lorsque la valeur moyenne du pH des solutions s’approche de la zone de neutralité, indépendamment du poids frais moyen des lots de vers. Concernant la variation du pH de la solution réactionnelle en fin d’expérience après immersion des lots de vers de poids frais différents, le test de Dunnett au seuil de 0,95 donne des différences hautement significatives ($Pr < 0,0001$) entre les résultats obtenus après immersion dans la solution basique des lots de 5g (lots témoins) et ceux obtenus avec des lots de 8g et 11g.

4.4. Variations du poids frais des vers après pulvérisation

L’analyse des résultats exposés dans la figure 3 fait apparaître des valeurs concordantes avec nos observations sur la réaction des vers en immersion (§ 4.1). En effet, les variations moyennes du poids frais des lots de vers sont d’autant plus importantes quand la solution pulvérisée est plus basique. Ainsi, pour les pH extrêmes (pH=12) la variation est plus importante (14,8%). Pour les pH voisins de la neutralité (pH=8) et neutre (pH=7), cette variation est respectivement égale à 2,11% et 1,68%. Les écart-types sont plus élevés pour les pH extrêmes que ceux des pH modérés à neutres. Le test de Dunnett au seuil de 0,95 montre une différence hautement significative

(Pr<0.0001) entre le traitement des vers avec la solution à pH=7 considérée comme témoin et les traitements des vers avec des solutions aux pH extrêmes (pH=12).

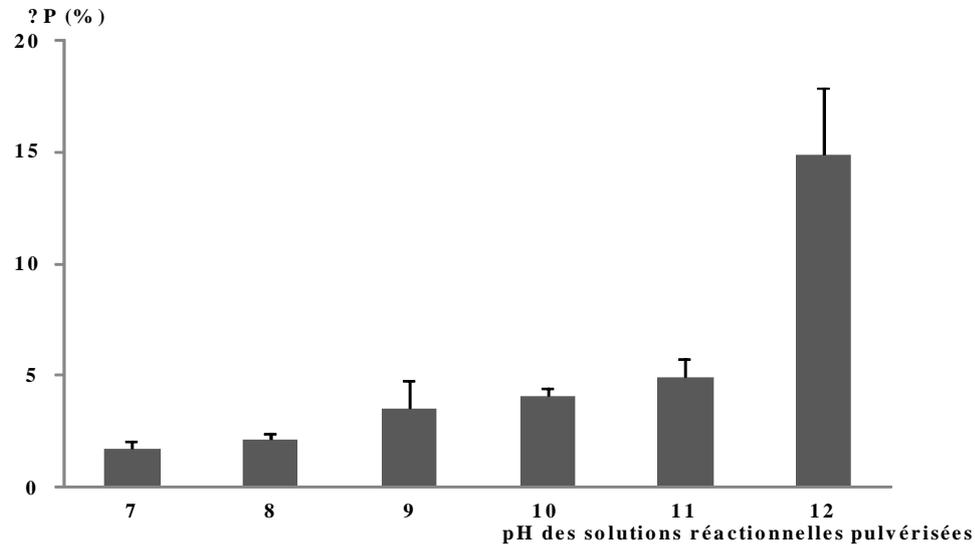


Fig.3: Variation en pourcentage du poids frais moyen ($\Delta P = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$) des lots de vers (*Lumbricus terrestris*) après pulvérisation des solutions réactionnelles basiques à différentes valeurs de pH.

(Test de Dunnett : Différence hautement significative (Pr <0.0001) entre les variations du poids frais des vers après pulvérisation avec une solution à pH=7 (lots témoins) et celles des lots pulvérisés avec des solutions à pH extrême (pH=12).

4.5. Variation du pH en fonction du volume de la solution d'excrétions cutanées

L'application par fraction d'1 mL de la solution d'excrétions cutanées à 0,6 g/50 mL sur des solutions réactionnelles basiques respectivement de pH=9, pH=10 et pH=11 donne les résultats exposés dans la figure 4. Pour comparaison, on représente également sur la même figure les résultats obtenus à blanc en substituant la solution d'excrétions par l'eau distillée dont le pH est préalablement ajusté au même pH que la solution d'excrétions (pH=7,6). Dans les deux cas, on assiste à une diminution des pH initiaux. Cette diminution est cependant beaucoup plus importante en présence des excréments cutanés qu'en présence d'eau distillée.

Lorsqu'on fait agir la solution d'excrétions, la zone de neutralité du pH comprise entre 7 et 8 est atteinte beaucoup plus rapidement quand le pH initial des solutions réactionnelles est égal à 9 et 10. En effet, cette zone de neutralité est atteinte après ajout respectivement d'environ 5 mL et 15 mL de la solution d'excrétions. Quand le pH initial est de 11, on assiste à une diminution du pH d'environ 1,5 unité en fin d'expérience (25 mL) sans pour autant atteindre la zone de neutralité.

Si on fait agir l'eau distillée seule sur la solution réactionnelle de pH initial égal à 9, la zone de neutralité est atteinte difficilement après ajout d'un volume d'environ 15 mL. Au-delà de ce volume, le pH ne diminue pratiquement pas. Les solutions réactionnelles aux pH =10 et pH=11

n'atteignent jamais la zone de neutralité même après ajout d'un volume de 25 mL en fin d'expérience.

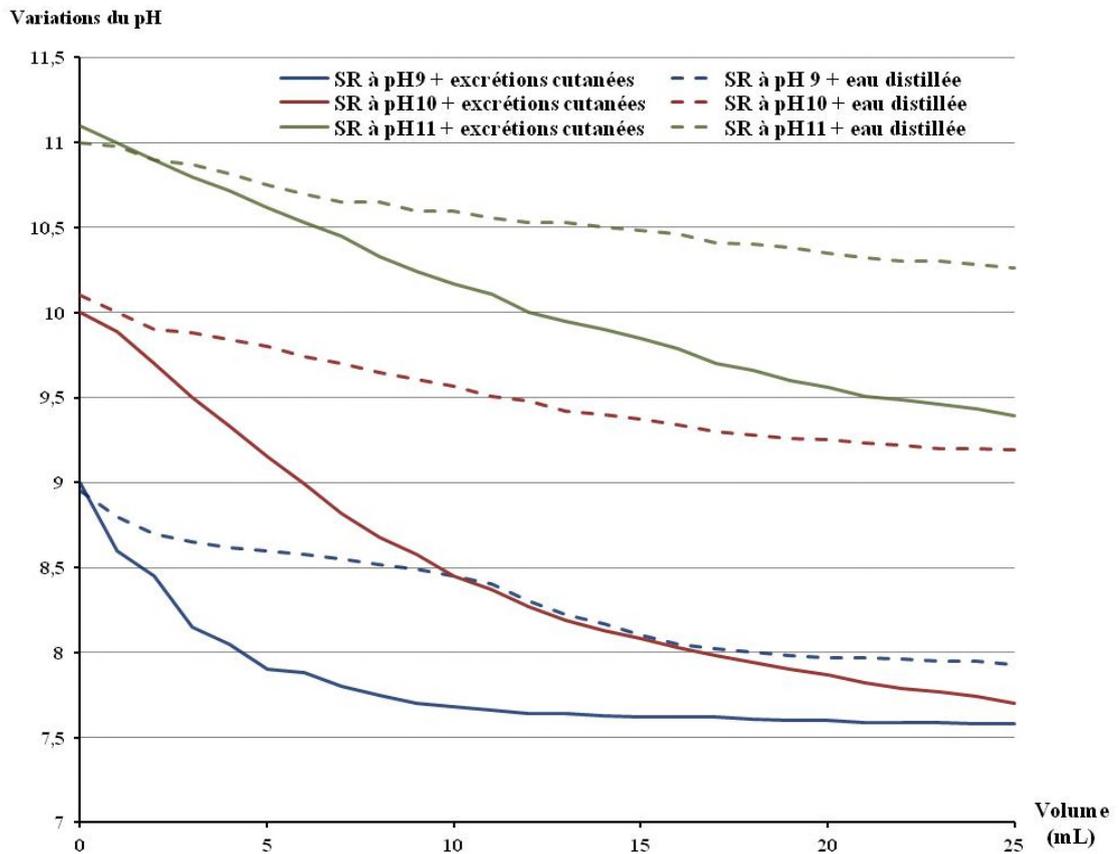


Figure 4 : Variation des pH initiaux basiques ($pH_i=9$, $pH_i=10$, $pH_i=11$) des solutions réactionnelles (SR) en fonction des volumes ajoutés (mL) de la solution d'excrétiions cutanées de *Lumbricus terrestris* et d'eau distillée.

5. Discussion

Le rôle régulateur du pH du sol par les lombricidés a suscité l'intérêt de notre laboratoire pour des raisons diverses : (i) d'abord, en raison de l'importance du facteur pH dans la fertilité et la productivité du sol. Le pH agit notamment au niveau de la formation de la solution du sol qui constitue un véritable milieu nutritif riche en éléments biogènes assimilables par les plantes et les microorganismes (Brady et Weil 2010 ; Marschner 1991 ; Tara E et al. 2013) ; (ii) aussi, en raison de l'impact du pH sur les mécanismes d'absorption racinaire chez les plantes supérieures comme est rapportés par de nombreux travaux cités par Husson (2013) ; (iii) enfin, en raison de la représentativité des lombricidés parmi la faune du sol. En effet, ces oligochètes constituent la première masse animale des terres émergées. Cette masse en mouvement perpétuel dans le sol pourrait éventuellement influencer le pH et par conséquent la productivité du sol.

La mise en évidence du rôle régulateur du pH par *Lumbricus terrestris* a été possible grâce à l'adoption d'une nouvelle approche. Dans cette approche toutes les expériences sont réalisées *in vitro* en milieu aqueux. Les interférences éventuelles du sol ou de ses composantes chimiques et biologiques sont à cet égard écartées d'avance. Les expériences sont effectuées *in vivo* sur des vers de terre préalablement privés de nourriture. La mise à jeun des vers est nécessaire pour écarter la contamination possible des solutions réactionnelles par les détritiques de sol susceptibles d'être rejetés par les vers au cours des expériences. La durée du jeun a été écourtée à 7 jours au lieu de 20 jours comme a été préconisé dans un précédent travail de notre laboratoire (El Harti et al. 2001b). En effet, des essais préliminaires appuyés par des observations stéréoscopiques ont révélés qu'à 20 jours de jeun, le tube digestif des vers est effectivement quasi vide mais les vers sont affaiblis. Ils ne supportent pas l'immersion même dans des solutions réactionnelles à pH modéré. A 7 jours de jeun, seule la partie supérieure du tube digestif est totalement vide. Les vers supportent bien l'immersion et réagissent énergiquement à l'effet du pH sans libérer de déjections solides ni par l'orifice anal ni par l'orifice buccal. Ainsi, l'effet éventuel des déjections des vers sur la variation du pH des solutions est définitivement écarté.

Notre nouvelle approche constitue un véritable test biologique démontrant à la fois l'hypersensibilité de ces animaux aux variations du pH, ainsi que leur capacité à réagir immédiatement pour neutraliser les solutions réactionnelles basiques. Enfin, dans ce protocole, la neutralisation du pH peut être suivie *de visu* après quelques minutes d'immersion seulement.

L'immersion des vers dans des solutions réactionnelles à différents pH basiques a permis de délimiter une zone de tolérance de pH située entre pH=7 et pH=12. L'amplitude de tolérance au pH *in vitro* est donc très large par rapport à celle signalée sur le terrain dans la littérature (Satchell 1967). Les résultats exprimés soit par l'évolution du pH en fonction du temps, soit par la variation moyenne de ce pH après 30 min d'immersion, montrent que cette tolérance est expliquée par la réaction immédiate des vers et leur aptitude à produire des excréctions cutanées abondantes. Ces excréctions tendraient à neutraliser les solutions réactionnelles d'immersion quelque soit la valeur de leur pH. Lorsque le pH des solutions réactionnelles est situé dans la zone de neutralité comprise entre pH=7 et pH=8, la réaction des vers est faible et la variation du pH est moins importante. L'étude de l'effet neutralisant du pH en fonction de la quantité de vers montre que cet effet est nettement amélioré quand la quantité de vers est augmentée dans les solutions réactionnelles. Cette amélioration serait en relation avec une production plus élevées d'excréments cutanés. Ainsi, pour une solution réactionnelle à pH=10, le temps moyen de neutralisation est écourté de deux fois quand la quantité de vers est augmentée d'environ deux fois.

La quantification des excréments cutanés libérés par les vers en fonction du pH des solutions réactionnelles est rendue possible en remplaçant la procédure par immersion par celle par pulvérisation. En effet, l'immersion des vers dans les solutions réactionnelles n'a pas permis de dégager une relation claire entre la variation du pH et la variation du poids frais des vers. Ainsi, au lieu d'enregistrer une perte de poids frais des vers suite à la libération importante d'excréments, on note au contraire le plus souvent une prise de poids. Ce résultat, en contradiction avec nos observations, serait expliqué par une réabsorption d'eau par les vers à partir des solutions d'immersion. La réabsorption se ferait vraisemblablement par diffusion à travers la surface cutanée des vers. En effet, la perte massive de liquide constatée *de visu* sous forme d'excréments cutanés

serait compensée par une entrée d'eau importante. Cette compensation serait nécessaire pour restaurer l'équilibre hydrique intrinsèque des vers. L'absorption cutanée d'eau serait aussi en relation avec les processus respiratoires des vers. En effet, comme signalé dans la littérature par Avel (1959) et Stephensen (1930), les lombricidés ne possèdent pas d'organes respiratoires (ni branchies, ni poumons). La prise d'oxygène se fait par la surface cutanée grâce à la peau qui est l'organe respiratoire. La respiration tégumentaire et le système sanguin assurent le ravitaillement en oxygène. Ainsi, *Lumbricus terrestris* n'étant pas adapté à la vie en milieu aqueux (immersion) où la tension en oxygène est généralement faible, celui-ci serait forcé d'absorber à travers ses téguments de grandes quantités d'eau des solutions réactionnelles à fin d'extraire l'oxygène en quantité suffisante pour subvenir au besoin de fonctionnement de son métabolisme. La réabsorption d'eau par les vers ne serait donc pas liée à l'effet du pH mais à l'effet de l'immersion.

La pulvérisation par intervalle régulier des lots de vers par les mêmes solutions réactionnelles à différents pH basiques provoque la libération d'excrétions cutanées qui se traduit par une perte de poids frais des lots de vers. Plus le pH de la solution pulvérisée s'écarte de la neutralité, plus la perte du poids frais des vers est importante. Ce résultat très significatif renforce notre hypothèse à propos du rôle des excrétions cutanées dans la neutralisation du pH.

L'application directe de ces excrétions cutanées sur des solutions réactionnelles à pH=9, pH=10 entraîne une neutralisation progressive de ces solutions en fonction du volume de la solution des excrétions ajoutées. La solution réactionnelle à pH=11 n'atteint pas la zone de neutralité après application des 25 mL de la solution d'excrétions cutanées. Cependant, son pH diminue considérablement. Evidemment, il aurait été possible d'atteindre la zone de neutralité du pH dans cette solution réactionnelle si on avait doublé la quantité des excrétions à 1,2 g/50 mL, comme ce fut le cas lorsqu'on doublé la quantité de vers dans l'expérience relative à la variation du pH en fonction du poids frais des vers. Comme on pouvait s'attendre, les test effectués à blanc sur les mêmes solutions réactionnelles en ajoutant de l'eau distillée seulement dont le pH est ajusté au préalable à celui de la solution des excrétions, font apparaître également une diminution des pH initiaux. Cette diminution est moins importante que celle observée en présence des excrétions cutanées. Ce résultat prévisible est expliqué certes par l'effet de dilution de l'eau distillée, mais aussi par l'effet de la fixation du CO₂ atmosphérique par les solutions réactionnelles basiques. En effet, les radicaux hydroxyles (OH⁻) de la soude en solution (NaOH) ont tendance à fixer progressivement le CO₂ et le transformer en acide carbonique (HCO₃⁻). Celui-ci est à l'origine de la diminution du pH. Globalement, les profils de neutralisation sous l'effet des excrétions sont comparables à ceux obtenus lors de l'immersion totale des vers. Dans les trois solutions réactionnelles, la variation du pH est plus intense au début qu'à la fin de l'expérience. L'application des excrétions seules, sans les vers, apporte donc la preuve définitive de l'implication des excrétions cutanées dans le pouvoir neutralisant de *Lumbricus terrestris*. Les composés acides volatiles, éventuellement présents dans les excrétions cutanées et susceptibles d'intervenir dans la neutralisation des solutions réactionnelles basiques, ont été éliminés par évaporation à 70°C pendant 48 heures lors de la préparation de la solution mère des excrétions. De ce fait, l'effet neutralisant observé ne peut être expliqué que par la présence de substances solubles non volatiles, capables d'interagir avec les radicaux hydroxyles (OH⁻) des solutions basiques. Les substances en question conservent leur propriété neutralisante même après séjour à 70°C. Ce constat laisse supposer que les

excrétions cutanées libérées dans le sol résisteraient aux températures estivales élevées. Il est établi que lors des périodes défavorables caractérisées par une température élevée couplée à une pluviométrie faible, les lombricidés rentrent en quiescence en arrêtant ou réduisant leur activité biologique. Ainsi, les excréments cutanés libérés pendant la saison favorable par des vers en pleine activité biologique interviendraient par leur effet neutralisant même en période d'inactivité des vers.

Ces résultats pourraient avoir des applications intéressantes dans la fertilisation des sols initialement pauvres du fait de leur pH basique défavorables, ainsi que dans la restauration de la fertilité des sols fragilisés par des polluants basiques (détergents, pesticides, engrais).

Nous constatons que les résultats obtenus sont très comparables à ceux obtenus dans notre précédent travail relatif au pouvoir neutralisant des excréments cutanés de *Lumbricus terrestris* sur les solutions réactionnelles acides (Raouane et El Harti 2015). Dans ce contexte, on peut s'interroger sur la nature chimique des substances neutralisantes contenues dans les excréments cutanés : s'agit-il de substances différentes, l'une neutralisant les solutions acides, l'autre neutralisant les solutions basiques ; ou alors s'agit-il d'une même et unique substance à caractère amphotère réagissant à la fois aux pH acides et basiques. En attendant de répondre à ces interrogations, on peut d'hors et déjà conclure que les excréments cutanés de vers sont dotés d'un effet tampon responsable de la régulation du pH dans les sols acides et basiques.

Il est aujourd'hui établi que le facteur pH est déterminant dans la productivité du sol et la répartition des groupes végétaux. Selon Brady et Weil (2010), les conditions de forte acidité ou alcalinité du sol affectent considérablement la croissance des plantes en raison de l'effet du pH sur la solubilité des éléments minéraux. Selon ces mêmes auteurs, la majorité des plantes cultivées poussent dans des sols au pH proche de la neutralité. L'effet neutralisant des excréments cutanés de *Lumbricus terrestris* expliquerait bien le rôle positif des vers de terre sur la production végétale.

Références

- Alpei J, Bonkowski M, Scheu S. 1996. Protozoa, Nematoda and Lumbricidae in the rhizosphere of *Hordelymus europaeus* (Poaceae): Faunal interactions response of microorganisms and effects on plant growth. *Oecologia* **106** (1): 111–126.
- Avel, M. 1959. Classe des annélides oligochètes In Grassé. P.P, (Précis de zoologie), ed. Masson et Cie, Paris, **5**(1): 224-470.
- Bouché, M.B. 1970. Relation entre les structures spatiales et fonctionnelles des écosystèmes illustrées par le rôle pédologique des vers de terre. In, P.Pesson, La vie dans le sol. Aspects nouveaux. Etudes expérimentales, éd.Gauthier Villars, Paris, pp : 187-209.
- Brady, N.C., Weil, R.R. (2010). Elements of the nature and properties of soils. Pearson Education International, New Jersey
- Doube, B.M., Ryder, M.H. Davoren, C.W., Stephens, P.M. 1994. Enhanced root nodulation of subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) by *Rhizobium leguminosarium* biovar *trifolii* in the presence of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Lumbricidae). *Biology & Fertility of soils*. **18** (3): 169-174.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J. 1996. Biology and Ecology of Earthworms. Chapman and Hall, London.

- Eisenhauer, N., Partsch, S., Parkinson, D., Scheu, S. 2007. Invasion of a deciduous forest by earthworms: changes in soil chemistry, microflora, microarthropods and vegetation. *Soil Biology and Biochemistry* **39** : 1099-1110.
- El Harti, A., Saghi, M., Molina, J.A.E., Teller, G. 2001a. Production d'une substance rhizogène à effet similaire à celui de l'acide indole acétique par le ver de terre *Lumbricus terrestris*. *Canadian Journal of Zoology* **79**(11) : 1911-1920.
- El Harti, A., Saghi, M., Molina, J.A.E., Teller, G. 2001b. Production de composés rhizogènes par le ver de terre *Lumbricus terrestris*. *Canadian Journal of Zoology* **79**(11) : 1921-1932.
- Fayolle, L. 1982. Etude de l'évolution du système déchets lombriciens-microorganismes : perspectives appliquées. Thèse de docteur ingénieur, université Claude-Bernard. Lyon.
- Haimi, J., Huhta, V. 1990. Effects of earthworms on decomposition processes in raw humus forest soil: a microcosm study. *Biol. Fertil. Soils* **10**: 178–183.
- Husson, O. 2013. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant Soil* **362**:389–417.
- Lavelle, P. 1988. Earthworm activities and the soil system. *Biol Fertil Soils* **6**:237–251.
- Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P., Rossi, J.P. 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology* **42**: S3-S15.
- Lee, K.E., 1985. *Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use*. Academic Press, London.
- Marschner, H. 1991. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil* **134**:1–20.
- Parkinson, D., McLean, M.A., 1998. Impacts of earthworms on the community structure of other biota in forest soil. In: Edwards, C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology*. St. Lucie Press, Boca Raton, pp: 213–226.
- Raouane, M., El Harti, A. 2015. Pouvoir neutralisant des pH acides par les excréments cutanées de *Lumbricus terrestris* L. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 85, pp. 1 - 16
- Räty, M. 2004. Growth of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* in an acid forest soil, and their effects on enchytraeid populations and soil properties. *Pedobiologia* **48** : 321–328.
- Satchell, J.E. 1958. Earthworm biology and soil fertility. *Soils Fert.* **21**: 209-219.
- Satchell, J.E. 1967. Lumbricidae. In: Burges, A., Raw, F. (Eds.), *Soil Biology*. Academic Press, London, pp: 259-322.
- Schrader, S. 1994. Influence of earthworms on the pH conditions of their environment by cutaneous mucus secretion. *Zool. Anz.* **233** : 211–219.
- Singh, N.B., Khare, A.K., Bhargava, D.S., Bhattacharya, S. 2005. Effect of initial substrate pH on vermicomposting using *Perionyx excavatus* (Perrier, 1872). *Applied Ecology and Environmental Research* , **4** (1) : 85-97.
- Stephenson, J. 1930. *The Oligochaeta*. Clarendon Press, Oxford, UK. 978p.
- Tara, E., Sackett., Sandy, M. Smith., Basiliko, N. 2013. Indirect and direct effects of exotic earthworms on soil nutrient and carbon pools in North American temperate forests, *Soil Biology & Biochemistry* **57**: 459-467.

Tiunov, A., Scheu, S. 1999. Microbial respiration, biomass, biovolume and nutrient status in burrow walls of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae). *Soil Biol. Biochem.* **31** : 2039–2048.