

(Manuscrit reçu le 25 juillet 2008, accepté le 29 septembre 2008)

Détermination des sites de production et d'accumulation des composés indoliques chez *Lumbricus terrestris*

ABDELLATIF EL HARTI¹ et MOHAMED RAOUANE²

(¹) Laboratoire de Biologie Végétale et Biochimie- ENS-, avenue M^{ed} Belhassan El ouazani – Takaddoum- BP : 5118, Rabat – Maroc

Fax : 00 212 37 75 00 47

e-mail : elharti.abdel@yahoo.fr

(²) Laboratoire de Biologie Végétale et Biochimie- ENS-avenue M^{ed} Belhassan El ouazani – Takaddoum- BP : 5118, Rabat – Maroc

Fax : 00 212 37 75 00 47

e-mail : mohamed_raouane@yahoo.fr

Résumé

La localisation des organes (ou sites) de production et d'accumulation des composés indoliques chez *Lumbricus terrestris* passe par l'examen minutieux de l'anatomie interne du ver. En effet, lors de cet examen, l'importance du liquide coelomique et du tissu chloragène a suscité notre intérêt d'une part, par leur volume et leur répartition hétérogène dans le sens antéro-postérieur du ver et d'autre part, par leur couleur et leur fluorescence sous UV qui rappellent celles de l'extrait brut de vers chargé de composés indoliques. L'analyse spectrophotométrique et chromatographique sur couches minces des extraits de liquide coelomique et de tissu chloragène ont permis la détection du 5-méthyltryptophane, de la sérotonine et de l'hydroxyl acide indole acétique. L'analyse de l'extrait de tissu chloragène par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse a permis l'identification de plusieurs isomères de position de l'hydroxyl acide indole carboxylique. Ces résultats laissent supposer qu'une grande partie des composés indoliques excrétés par *Lumbricus terrestris* prendrait naissance dans le tissu chloragène puis s'accumulerait dans le liquide coelomique avant d'être libérés dans la rhizosphère via les pores coelomiques et urinaires.

Mot-clefs : composés indoliques, liquide coelomique, *Lumbricus terrestris*, tissu chloragène.

Abstract

The localisation of *Lumbricus terrestris*'s organs (or sites) producing and accumulating indole-derived substances require a detailed examination of the worm's internal anatomy. In fact, the importance of coelomic liquid and chloragogenous tissue aroused our interest by, on the one hand, their volume and their heterogeneous distribution in the length of the worm; on the other hand, by their colour and their fluorescence under UV. The latter are reminiscent of the worm's gross extract containing indol-derived substances. The spectrophotometric and thin layer chromatographic analysis of the coelomic liquid's extract and chloragogenous tissue's extract allows the detection of the 5-methyltryptophane, serotonin and hydroxyl- indol acetic acid. Analyses using mass spectrometry combined with gas chromatography of the extract's chloragogenous tissue have revealed the presence of several isomeres of hydroxy- indol carboxylic acid. These results let assume that a big part of indol-derived substances excreted by *Lumbricus terrestris* supposedly find their origin in the chloragogenous tissue then they would accumulate in coelomic liquid before they are liberated in the rhizosphere via coelomic and urinary orifices.

Keywords: chloragogenous tissue, coelomic liquid, *Lumbricus terrestris*, indol-derived substances.

1. Introduction

Le rôle des lombricidés sur la production végétale est largement reconnu. En effet, toutes les études réalisées à ce jour montrent l'implication directe des vers de terre sur l'amélioration de la qualité des sols. Ainsi, en plus de leur action mécanique entraînant l'aération du sol et le brassage de ses constituants, les vers de terre jouent un rôle important dans la formation des microagrégats et la protection des matières organiques (Bossuyt *et al.* 2005, Pulleman *et al.* 2005). Leurs rejets peuvent agir significativement sur la structure du sol (Ge *et al.* 2001) et réduire son érosion (Le Bayon et Binet 2001). Il est établi également que des communautés microbiennes sont étroitement associées au tube digestif et aux organes excréteurs ou néphridies des lombricidés (Singleton *et al.* 2003, Schram *et al.* 2003, Horn *et al.* 2006). Ces bactéries associées aux vers de terre interviennent sur le recyclage de la matière organique et la minéralisation de l'azote (Amador et Görres 2005, Amador *et al.* 2006, Postma-Blaauw *et al.* 2006). Des composés organiques présentant des propriétés hormonales sur la croissance des plantes ont été également mis en évidence dans les fèces de quelques espèces de vers de terre (Muscolo *et al.* 1999). Des études menées par notre laboratoire ont mis en évidence l'intervention des vers de terre dans la stimulation de la production végétale. En effet, des tests biologiques et des analyses chromatographiques et spectrométriques ont révélé la présence de substances rhizogènes de nature indolique dans les extraits de *Lumbricus terrestris* (El Harti *et al.* 2001a, 2001b). Dans le présent travail nous tenterons de déterminer les sites ou organes de production et d'accumulation de ces

composés indoliques avant leur évacuation dans la rhizosphère. Partant de nos connaissances sur l'anatomie interne du ver et en s'appuyant sur les propriétés physiques d'absorbance et de fluorescence sous UV des composés indoliques, le tissu chloragène a suscité notre intérêt. En effet, ce tissu de revêtement de l'intestin présente une couleur jaune et une fluorescence vert vif qui rappellent celles de l'extrait brut total de vers riche en composés indoliques (El Harti *et al.* 2001b). Nous nous sommes également intéressés au liquide coelomique en raison de son contact direct avec le tissu chloragène et de sa fluorescence sous UV qui rappelle également celle de l'extrait brut total de vers.

2. Matériels et méthodes

Le principe de nos expériences consiste à vérifier la présence des composés indoliques dans les extraits du liquide coelomique et du tissu chloragène obtenus respectivement par ponction et par prélèvement. Leur fluorescence et leur absorbance sous UV ainsi que leurs caractéristiques chromatographiques sur couches minces seront comparées à celles de l'extrait brut total de vers. L'identification des dérivés indoliques par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse sera réalisée après fractionnement de l'extrait du tissu chloragène et purification des produits fluorescents constitutifs par chromatographie sur colonne.

2.1. Prélèvement par ponction et préparation de l'extrait de liquide coelomique (ELC)

La réalisation de la ponction coelomique nécessite au moins cinq vers de terre adultes, suffisamment gros. Les vers sont préalablement privés de nourriture pendant 3 à 4 semaines dans le but d'éviter toute contamination exogène. Les 5 spécimens sont lavés à l'eau désionisée puis séchés sur papier filtre. Chaque spécimen est introduit vivant dans un sac en plastique (Whirl-pak bag, Nasco) où il est immobilisé. En dessous, on place un tube fluorescent qui a l'avantage d'éclairer le ver par transparence sans trop le chauffer. La ponction coelomique est réalisée à l'aide d'une pipette pasteur que l'on introduit inclinée longitudinalement dans la partie postérieure du corps, dans le sens postéro-antérieur. Au moment de la ponction, le ver de terre réagit brutalement par contraction. Cette réaction fait augmenter la pression à l'intérieur des cavités coelomiques, le liquide coelomique remonte alors par simple capillarité dans la pipette. Si la quantité de liquide coelomique est jugée insuffisante, la pipette est alors enfoncée davantage, toujours dans le sens postéro-antérieur, en transperçant les cloisons transversales (dissépiments) des cavités coelomiques juxtaposées. Le liquide coelomique prélevé d'au moins cinq spécimens est récupéré par

trempage des pipettes dans 20ml de méthanol puis évaporé au rotavapor (40°C). Le résidu sec est récupéré dans 1 ml de méthanol. Cette solution constituera l'extrait du liquide coelomique (ELC) dans lequel la détection des composés indoliques sera effectuée.

2.2. Prélèvement par dissection et préparation de l'extrait de tissu chloragène (ETC)

Le prélèvement du tissu chloragène a été effectué sur 10 spécimens adultes préalablement privés de nourriture pendant 3 à 4 semaines. Le spécimen, fraîchement tué, est fixé face ventrale contre le liège de la cuvette à dissection. Les téguments dorsaux sont incisés longitudinalement d'arrière en avant en suivant une ligne parallèle mais légèrement latérale au vaisseau dorsal qu'il ne faut en aucun cas sectionner. Une éventuelle hémorragie risque de gêner l'observation. Au fur et à mesure de l'incision, les volets cutanés sont légèrement étirés avant d'être épinglés latéralement et symétriquement. L'étirement des volets cutanés dégage les organes internes par rupture des dissépinements qui entraîne l'évacuation du liquide coelomique. Le spécimen fixé sur le liège est trempé dans un cristalliseur rempli d'eau. L'ensemble est placé sous un robinet ouvert à débit faible pendant quelques minutes. L'objectif de ce lavage est d'éliminer le liquide coelomique qui pourrait être chargé de composés indoliques. À l'aide de lamelles en verre, des fragments de tissu chloragène sont prélevés puis rincés à l'eau distillée par centrifugations successives. Le surnageant de la dernière centrifugation sera utilisé pour vérifier, par spectrophotométrie, l'absence de composés indoliques susceptibles de contaminer le tissu chloragène à partir du liquide coelomique. L'extrait brut du tissu chloragène est réalisé par macération dans 4 bains successifs de méthanol. Chaque bain de 10 ml dure 24h et les macérats sont filtrés, mélangés puis évaporés au rotavapor (40°C). Le résidu sec est récupéré dans 5 ml de méthanol et constituera ainsi l'extrait du tissu chloragène (ETC). Cette quantité, assez concentrée, est largement suffisante pour effectuer l'ensemble des analyses prévues.

2.3. Préparation de l'extrait brut total de vers (EBT) et d'une solution méthalonique d'AIA

L'extrait brut total de vers, chargé de composés indoliques, est obtenu à partir de 10 vers de terre adultes maintenus à jeun pendant 4 semaines. L'extraction est effectuée par macération dans 4 bains (20 ml) successifs de méthanol (El Harti *et al.* 2001a). Chaque macération dure 24h. Les macérats successifs sont filtrés, mélangés et évaporés au rotavapor à 40°C. Le résidu sec obtenu est repris dans 5 ml de méthanol pour constituer l'extrait brut total de vers (EBT).

La solution méthalonique de l'AIA est obtenue par solubilisation de l'acide indole acétique dans le méthanol à 1g/l, l'AIA étant un composé indolique d'origine végétale réputé par son pouvoir rhizogène.

L'extrait brut total de vers (EBT) et la solution méthalonique d'acide indole acétique (AIA) seront utilisés comme solutions témoins pour comparaison avec les extraits étudiés à savoir l'ETC et l'EBT.

2.4. Examens spectrophotométriques

L'absorbance sous UV (200 à 300nm) est réalisée à partir de l'extrait du liquide coelomique (ELC) et de l'extrait du tissu chloragène (ETC). Les spectres d'absorbance seront comparés à ceux d'une solution méthalonique d'AIA. Une vérification de l'absence de composés indoliques dans le dernier bain de rinçage du tissu chloragène avant l'extraction sera effectuée en parallèle. Les spectres d'absorbance obtenus sont également comparés à ceux de l'extrait brut total de vers. L'analyse spectrophotométrique en UV est réalisée sur un spectrophotomètre de type Varian techtron réglé à : 10 nm/mn (scanrate), 2,0 nm (slit), 50cm/H (chart speed), 200 mv/FS (span).

2.5. Examens chromatographiques

Ce type d'examen est réalisé à partir de l'extrait du liquide coelomique (ELC), de l'extrait du tissu chloragène (ETC) et d'un extrait brut total de vers (EBT). Des plaques préparatives à base de silice G60 (Kiesel Gel. G.F254) sont utilisées. Le développement chromatographique est réalisé grâce à deux phases mobiles constituées respectivement du système CA composé de chloroforme et d'acide acétique (96%) aux proportions 95:5 (v/v) (Stahl et Kaldewey, 1961) et du système AMIN composé d'acétate de méthyle, d'isopropanol et d'ammoniaque aux proportions 45:35:20 (v/v/v) (Stahl et Kaldewey, 1961). Le système AMIN permet une séparation des dérivés indoliques basiques ou neutres, qui présentent un Rf nul ou voisin de zéro dans le système CA. La révélation des dérivés indoliques est réalisée à l'aide des réactifs de Prochazka (Hais et Macek, 1958) et Dragendorff modifié (Munier, 1951; 1953; Randerath, 1971). Ces réactifs sont d'excellents révélateurs des alcaloïdes et des composés indoliques alcalins et neutres.

2.6. Fractionnement chromatographique et analyse par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS)

Cette étape de l'étude concerne l'extrait du tissu chloragène (ETC). Le résidu sec du reste de cet extrait est repris dans 5ml de chloroforme en vue de son fractionnement sur colonne. La chromatographie sur colonne est réalisée à l'aide d'une colonne de verre de 35

mm de diamètre et 35 cm de hauteur. L'oxyde d'alumine, standardisé pour l'analyse d'adsorption chromatographique, est utilisé comme substrat. L'hexane constitue le solvant initial de montage de la colonne. Comme pour l'extrait brut total de vers (El Harti *et al.* 2001b), 4 types d'élutions successives ont été pratiquées. La première élution a été effectuée avec du chloroforme seul. La deuxième élution a été réalisée à l'aide du système CA. La troisième élution à l'aide du système CAM à base de chloroforme, d'acide acétique (96%) et de méthanol aux proportions 75:5:20 (v/v/v) (Diamantstein et Ehrhart 1961). La quatrième élution est effectuée avec du méthanol seul. À chaque élution, seules les fractions fluorescentes sont récoltées. Le fractionnement étant terminé, on procède à une vérification rapide des caractéristiques chromatographiques sur couche mince de silice des différentes fractions récoltées ; la phase mobile est constituée du système CA. Vu les résultats déjà obtenus avec l'extrait brut total de vers (El Harti *et al.* 2001b) et suite à la comparaison sous UV des différents profils chromatographiques des fractions fluorescentes, seules les fractions obtenues suite à la troisième et surtout à la quatrième élution ont suscité notre attention. Ces fractions ont été regroupées et évaporées au rotavapor à 40°C. Le résidu sec obtenu a été repris dans 5ml de chloroforme. La «purification» des produits fluorescents majoritaires est réalisée sur micro-colonne d'oxyde d'alumine, en utilisant toujours les quatre types d'élutions déjà mentionnées. Seuls quatre produits fluorescents (S1, S2, S3, S4), visiblement purs, ont été récoltés. D'autres produits fluorescents minoritaires ont été perdus suite à ces chromatographies successives. Les produits S1, S2, S3 et S4 sont évaporés au rotavapor (40°C), puis stockés au frais et à l'obscurité pour être analysés par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS). Ce type d'analyse nécessite une dérivation préalable par silylation des produits récoltés qui sont supposés être des composés indoliques non volatils. Ainsi, une partie aliquote de chacun des quatre produits est d'abord dissoute dans du dichlorométhane, puis séchée sous azote. On fait réagir les aliquotes pendant 24 h à 20°C et à l'obscurité avec 20 à 50 µl d'un mélange de réactif constitué d'1 ml de méthylsilyltrifluoroacétamide (MSTFA, Pierce Chemical Company, Rockford, III.) de 0,5 ml de pyridine anhydre (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.) et de 15 µl de triméthyl chlorosilane (Fluka AG, Buchs, Suisse). Les groupements (OH) et (COOH) sont alors transformés en (O-Si(CH₃)₃) pour le passage en GC-MS. Le chromatographe en phase gazeuse (Carlo ERBA 8060) est équipé d'une colonne capillaire en silice fondue, de longueur 30 m, de type DB5 (J et W) et des diamètres interne 0,32 mm, externe 0,47 mm. Les autres caractéristiques de la résolution chromatographique en phase gazeuse sont : film 1 µm, hélium 0,5 bar, température 100 à

250°C, montée de 5°C/min puis à 10°C/min jusqu'à 280°C, et nettoyage de la colonne pendant 30 min. L'injection se fait avec refroidissement de 15 cm du début de la colonne.

La spectrométrie de masse est réalisée à l'aide de deux appareils interfacés au même type de chromatographie en phase gazeuse, fabriqués par FISON (actuellement Micromass ou ThermoFinnigan) : (i) MD 800 : source à 180°, impact électronique, balayage de 500 à 600 Da en 1 s, courant d'émission 100 µA 70 eV.

3. Résultats :

3.1. Examen spectrophotométrique et chromatographique de l'extrait du liquide coelomique (ELC)

Sous lampe UV (366 nm), l'extrait du liquide coelomique émet une fluorescence jaune-vert qui rappelle celle émise par l'extrait brut total de vers. Rappelons que celui-ci est chargé de composés indoliques (El Harti *et al.* 2001a ; 2001b).

L'analyse de l'absorbance en UV (300 à 200 nm) a donné les spectres exposés dans la figure 1.

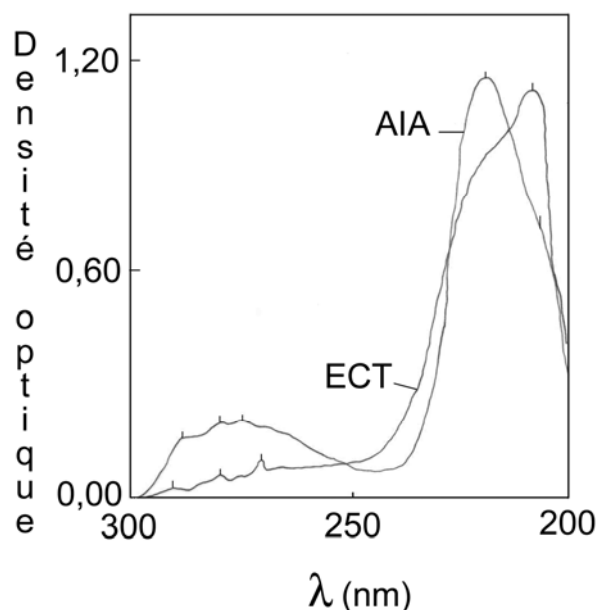


Fig.1. Spectres d'absorbance en UV représentant la densité optique en fonction des longueurs d'ondes (300 à 200 nm) d'une solution d'AIA et d'un extrait de liquide coelomique (ELC) de *Lumbriscus terrestris*.

L'extrait du liquide coelomique présente deux zones d'absorbance. La première, moins importante, se situe entre 300 et 250 nm. Dans cette zone, on retrouve des petits pics à 290 et 281 nm non observés dans le spectre de l'AIA. Le pic à 270 nm n'a pas non plus d'équivalent. La deuxième zone, plus importante, se situe entre 240 et 200 nm. Le maximum d'absorbance est enregistré à 205 nm avec un épaulement à 221 nm. Le pic à 205

nm pourrait correspondre à l'épaulement qui apparaît très discrètement dans le spectre de l'AIA entre 200 et 215nm. L'épaulement à 221 nm correspondrait au pic maximal d'absorbance caractéristique de l'AIA. Entre les 2 zones d'absorbance existe un minimum à 245 nm, équivalent à celui observé à partir de l'extrait brut total de vers et très voisin de celui observé dans le spectre de l'AIA. Le spectre d'absorbance de l'extrait de liquide cœlomique est globalement très voisin de celui de l'AIA. Également, les zones d'absorbance coïncident largement avec celles enregistrées à partir de l'extrait brut total de vers.

La séparation chromatographique des produits fluorescents constituant l'extrait de liquide cœlomique, donne des profils chromatographiques globalement identiques à ceux obtenus à partir de l'extrait brut total de vers. Dans le système CA, on retrouve les mêmes produits fluorescents aux Rf respectifs: 0; 0,22 et 0,63 caractéristiques de l'extrait brut total de vers. Seul le produit de Rf = 0,04 fait défaut dans l'extrait de liquide cœlomique. Comme c'est le cas pour l'extrait brut total de vers, seuls les produits aux Rf nuls réagissent au réactif de Dragendorff. Ces produits, constitués de dérivés indoliques basiques à neutres, sont séparés dans le système AMIN. Cette séparation fait apparaître cinq produits fluorescents majeurs aux Rf respectifs de 0,28; 0,33; 0,45; 0,54 et 0,7 correspondant à ceux séparés à partir de l'extrait brut total de vers. Tous ces produits réagissent avec le réactif de Prochazka. Les produits aux Rf: 0,28 (méthyltryptophane) et 0,54 réagissent en plus au Dragendorff. La non observation du 5 hydroxyl acide indole acétique (Rf = 0,19) et de la sérotonine (Rf = 0,65), supposés être présents dans l'extrait brut total de vers (El Harti *et al.* 2001b), serait expliquée par leur faible concentration, inférieure au seuil de détection en chromatographie sur couches minces. D'ailleurs, la fluorescence des produits détectés dans les 2 extraits est toujours moins intense dans l'extrait de liquide cœlomique.

La similitude des résultats enregistrés, aussi bien par l'étude spectrophotométrique que par l'analyse chromatographique, laisse supposer que les dérivés indoliques détectés ainsi que la majorité des produits fluorescents indéterminés de l'extrait brut total de vers proviendraient du liquide qui emplit les cavités cœlomiques de *Lumbricus terrestris*.

3.2. Examen spectrophotométrique et chromatographique de l'extrait du tissu chloragène (ETC)

L'extrait concentré du tissu chloragène présente une couleur jaune-marron identique à celle de l'extrait brut total de vers. Sous UV (366 nm), il émet une fluorescence au vert-vif également identique à celle de l'extrait brut total de vers. Ces observations préliminaires

laissent supposer que la couleur et la fluorescence caractéristique de l'extrait de vers proviendrait vraisemblablement du tissu chloragogène.

L'étude spectrophotométrique de l'extrait de tissu chloragogène (fig.2) fait apparaître des zones d'absorbance très voisines de celles obtenues à partir d'une solution méthanolique d'AIA. En effet, dans les 2 cas les spectres présentent 2 zones d'absorbance se situant respectivement entre 300 à 250 nm et entre 240 à 200 nm.

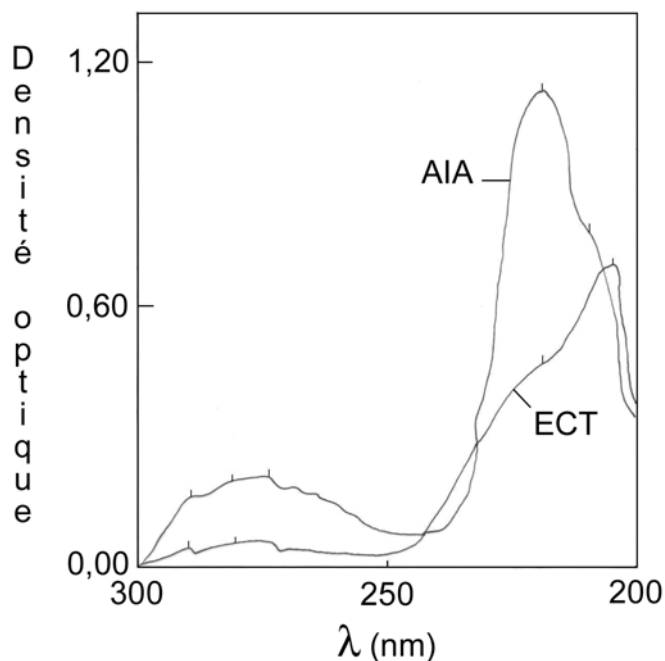


Fig.2. Spectres d'absorbance en UV représentant la densité optique en fonction des longueurs d'ondes (300 à 200 nm) d'une solution d'AIA et d'un extrait de tissu chloragogène (ECT) de *Lumbricus terrestris*.

L'extrait brut de tissu chloragogène et la solution d'AIA absorbent moins dans la zone comprise entre 250 et 240 nm. Les pics d'absorbance enregistrés dans les 2 spectres se chevauchent parfaitement; ils se situent respectivement à 290, 281 et 221 nm. Le pic à 205 nous rappelle celui obtenu à partir de l'extrait de liquide cœlomique. Ce pic correspondrait vraisemblablement à l'épaulement très discret du spectre de l'AIA entre 215 et 200 nm. Dans la zone de faible absorbance, située entre 300 et 250 nm, une faible dépression est enregistrée à 270 nm. À cette même longueur d'onde, l'extrait de liquide cœlomique présente au contraire un pic de faible absorbance (fig.1). En dépit de quelques différences mineures, le spectre d'absorbance de l'extrait de tissu chloragogène est globalement superposable à ceux de l'AIA et de l'extrait de liquide cœlomique. Le tissu chloragogène contiendrait vraisemblablement les mêmes composés indoliques que le liquide cœlomique. Ces composés indoliques ne résulteraient pas d'une contamination à partir du liquide

coelomique, dans la mesure où le dernier bain de rinçage des fragments de tissu chloragogène avant l'extraction, présente une absorbance nulle témoignant de l'absence de composés indoliques.

L'étude des caractéristiques chromatographiques de l'extrait de tissu chloragogène fait apparaître des similitudes évidentes avec celles de l'extrait brut total de vers. Le développement chromatographique dans les systèmes CA et AMIN met en évidence la présence des mêmes produits, aux mêmes R_f , émettant les mêmes fluorescences avant et après application du réactif de Prochazka. L'application du réactif de Dragendorff donne également les mêmes réactions positives aussi bien sur les produits aux R_f nuls à voisins de zéro dans le système CA, que sur les produits aux R_f respectifs: 0,28; 0,54; 0,65 et 0,91 dans le système AMIN. Certains de ces produits ont été supposés être dans l'extrait brut total de vers de l'hydroxyl acide indole acétique ($R_f = 0,19$), du DL.5. méthyltryptophane ($R_f = 0,28$) et de la sérotonine ($R_f = 0,65$) (El Harti et al.2001b). Les autres produits, réagissant aussi aux réactifs de Prochazka et Dragendorff, n'ont pu être identifiés. Ils seraient également des dérivés indoliques à comportement neutre à basique.

3.3. Examen spectrométrique de l'extrait du tissu chloragogène (ETC)

L'analyse par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse de 4 fractions fluorescentes majoritaires S1, S2, S3 et S4, purifiées à partir de l'extrait brut de tissu chloragogène, révèle que seule la fraction S3 renferme des structures indoliques. En effet, la résolution chromatographique en phase gazeuse de la fraction S3, dérivatisée par silylation, a donné le chromatogramme exposé dans la figure 3.

Ce chromatogramme fait apparaître une zone indole comprise entre les pics 609 et 736. Le premier composé indolique majoritaire numéroté 609 est résolu après un temps de rétention égal à 13,151 min.

Les autres composés indoliques numérotés 632, 668, 702, 722 et 736 apparaissent plus tard aux temps de rétention respectifs 13,534 ; 14,134 ; 14,701 ; 15,034 et 15,268. Ces derniers ne sont pas signalés dans la figure 3 car ils sont prédominés par des composés majoritaires non indoliques (585, 633,...,818) qui apparaissent à des temps de rétention respectifs très voisins de ceux des composés indoliques minoritaires.

L'analyse par spectrométrie de masse des composés indoliques répertoriés donne les spectres de masse (A 1, ..., A6) exposés dans la figure 4. On voit apparaître les mêmes ions caractéristiques, particulièrement l'ion 299, dans chacun des spectres.

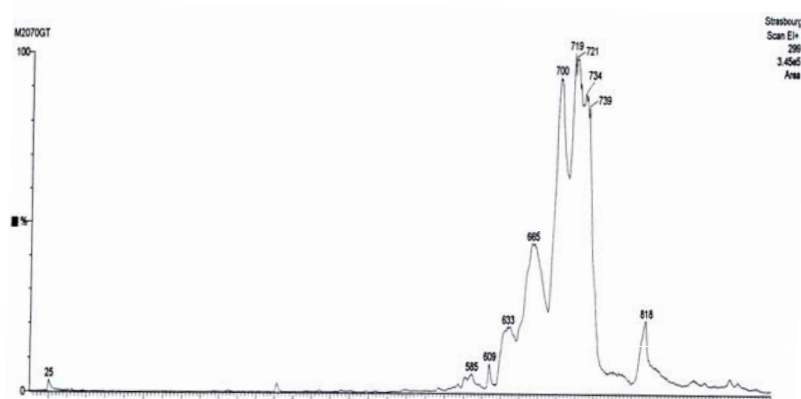


Fig.3. Résolution chromatographique en phase gazeuse de la fraction S3 de l'extrait du tissu chloragogène. Les produits majoritaires indoliques (609) et non indoliques (585, 633,...,818) sont numérotés en fonction de leurs temps de rétention respectifs. Les produits indoliques minoritaires (632, 668, 702, 722 et 736) ne sont pas représentés.

Le dérivé indolique proposé par la bibliothèque de spectres du National Institute of Health (NIST) serait le 1 H-indole-2 acide carboxylique 1- triméthylsilyl-5-(triméthylsilyl) oxytriméthylsilyl ester. Ce dérivé indolique, détecté également dans l'extrait brut total de vers à des temps de rétention différents (El Harti *et al.* 2001b), serait présent sous forme de plusieurs isomères de position du même composé indolique : l'hydroxyl acide indole carboxylique.

Les similitudes, combien évidentes, entre les résultats enregistrés à partir de l'extrait de tissu chloragogène et l'extrait brut total de vers, laissent supposer que les dérivés indoliques excrétés par *Lumbricus terrestris* prendraient naissance dans le tissu chloragogène du ver.

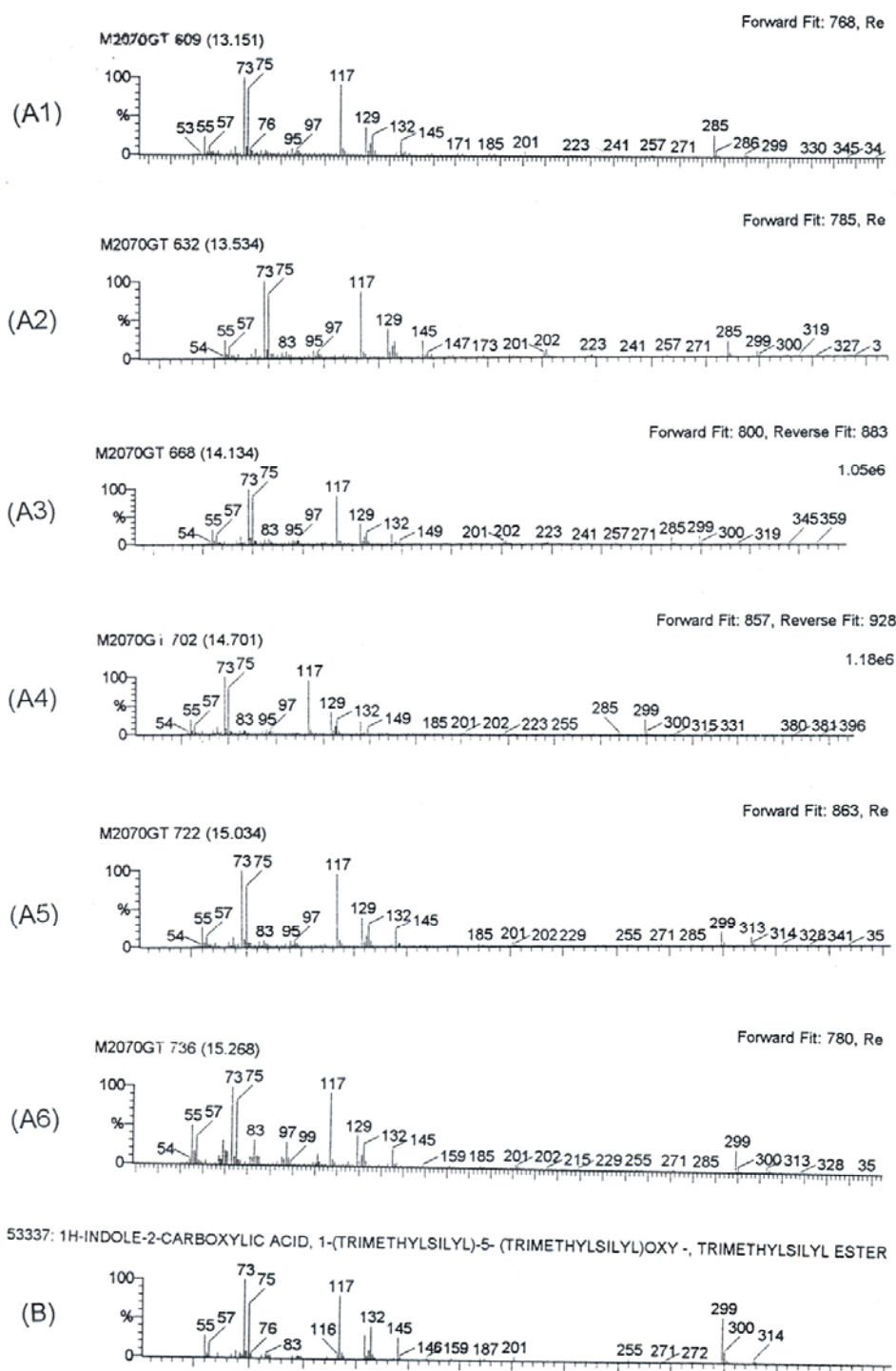


Fig.4. Spectres de masse des produits 609 (A1), 632 (A2), 668 (A3), 702 (A4), 722 (A5) et 736 (A6) comparés à l'ion 299 correspondant au dérivé indolique fourni par la bibliothèque NIST (B).

4. DISCUSSION

La totalité des dérivés indoliques déjà identifiés dans l'extrait brut total de vers, aussi bien par spectrométrie de masse que par chromatographie sur couches minces (El Harti *et al.* 2001b), ont été retrouvés dans l'extrait de tissu chloragène. Rappelons au passage, que

l'extrait brut total de vers ainsi que les excréctions cutanées montrent un effet rhizogène incontestable sur les plantules de *Phaseolus vulgaris* (El Harti *et al.* 2001a, 2001b). La similitude dans les produits détectés laisse supposer qu'une grande partie des composés excrétés dans la rhizosphère par *Lumbricus terrestris* prendrait naissance dans le tissu chloragène enrobant le tube digestif. Parmi les dérivés indoliques détectés par simple chromatographie sur couches minces se trouve le 5-méthyltryptophane, la sérotonine et l'hydroxyl acide indole acétique. L'hydroxyl acide indole carboxylique a été identifié par spectrométrie de masse. Ce composé apparaît à différents temps de rétention ce qui laisse penser qu'il s'agit d'isomères de positions du même composé indolique. Ces isomères nous rappellent ceux identifiés dans l'extrait brut total de vers. L'isomérisation éventuelle de l'hydroxyl acide indole carboxylique ainsi que la non confirmation par spectrométrie de masse de la présence du 5 méthyltryptophane, de la sérotonine et de l'hydroxyl acide indole acétique seraient vraisemblablement liées à la procédure de fractionnement et d'analyse adoptée pour cette catégorie d'indoles. Une amélioration de cette procédure est en cours d'étude par notre laboratoire.

L'observation du tissu chloragène, après ouverture du ver par dissection longitudinale, montre que sa répartition tout au long du tube digestif n'est pas homogène. Il est relativement plus développé dans la région dorsale de l'intestin, particulièrement la région postéro-dorsale correspondant au typhlolosis. Dans la partie antérieure du corps, sa densité diminue progressivement et finit par disparaître dans la région la plus antérieure correspondant aux premiers métamères proches de la tête. Cette répartition hétérogène du tissu chloragène laisse supposer que la production des composés indoliques serait plus importante dans la partie postérieure du ver. Le tissu chloragène est un tissu bien connu des zoologistes (Grasset 1961, Grasset *et al.* 1970, Ernö Fischer 1993). Des études récentes ont montré, entre autres, le rôle de ce tissu dans la bioaccumulation et le stockage des métaux lourds par le ver de terre (Grelle et Descamps 2000 ; Amaral et Rodrigues 2005, Amaral *et al.* 2006). Ces métaux lourds parviennent jusqu'au tissu chloragène essentiellement par ingestion d'aliments contaminés et non pas par voies cutanées (Morgan *et al.* 2004, Becquer *et al.* 2005). Jusqu'à ce jour, aucun travail n'a fait référence à la présence de dérivés indoliques dans ce tissu.

Le tissu chloragène prend naissance à partir des cellules péritonéales qui s'hypertrophient, prennent une forme en massue et se saturent en inclusions qui donnent à ce tissu une couleur jaune verdâtre caractéristique. Selon Semal-Van Gaussen (1956), les cellules de ce tissu (chloragocytes) contiennent du glycogène en quantité variable selon le type de

nutrition, et est très riche en phosphatase. Les inclusions les plus importantes sont des granules jaune-verdâtres caractéristiques. Ces chlorozomes sont complexes; ils contiennent un chromolipide jaune doré ne diminuant pas au cours du jeûne, une purine qui n'est pas de la guanine comme on l'avait cru, mais de l'hétéroxanthine de couleur jaune-verdâtre. Le tissu chloragène est également le siège d'une partie importante du métabolisme glucidique, il intervient aussi dans le métabolisme protidique, il est le lieu de désamination et forme la majeure partie de l'ammoniaque excrété. C'est en outre l'organe le plus riche en urée.

Partant de ces données bibliographiques, on peut s'interroger sur l'origine des composés indoliques du tissu chloragène. Sont-ils des produits de synthèse élaborés sur place à partir du tryptophane précurseur ? Ou alors, sont-ils des déchets azotés issus du métabolisme interne du ver qui seraient stockés temporairement dans le tissu chloragène en attendant d'être éliminés à l'instar de l'urée, de l'ammoniaque, ... ?

D'après Liebmann (1942, 1945 et 1946), lorsque les cellules du tissu chloragène sont pleinement développées, elles se détachent et tombent dans le coelome rempli de liquide coelomique (Coelomocytes). Certaines de ces cellules poursuivent leur évolution sous forme d'éléocytes dotées d'un pouvoir phagocytaire comparable à celui des leucocytes des vertébrés. De telles cellules participent alors au pouvoir immunitaire des vers de terre (Massicotte *et al.* 2004, Kauschke *et al.* 2007, Kasschau *et al.* 2007). D'autres coelomocytes dégénèrent et se désintègrent, libérant ainsi leur contenu dans le liquide coelomique. L'apparition des composés indoliques dans le liquide coelomique ne serait-elle par liée à la désintégration des coelomocytes ? Cette hypothèse est plausible dans la mesure où les mêmes composés indoliques ont été retrouvés également dans l'extrait du liquide coelomique.

Lors de la dissection de *Lumbricus terrestris*, nous avons pu vérifier la correspondance exacte entre la métamérie coelomique et celle de la paroi du corps. Les cavités coelomiques remplies de liquide coelomique ne sont pas étanches. Chaque cavité communique avec les cavités adjacentes par un sphincter péri-neural ventral situé au niveau de chaque dissépinement. Chez *Lumbricus terrestris*, les cavités coelomiques communiquent avec le milieu extérieur par des pores coelomiques dorsaux comme c'est le cas chez la plupart des oligochètes terricoles. Les pores coelomiques apparaissent à partir d'un niveau très antérieur par rapport au niveau de chaque ligne médiane intersegmentaire. Ces pores sont normalement clos et ne laissent pas passage à un liquide extérieur à l'animal. À la suite de fortes excitations, le liquide coelomique est émis à l'extérieur, et même projeté sur plusieurs

centimètres chez certains vers de terre géants. L'émission du liquide coelomique servirait à maintenir une certaine différence de pression entre les différentes parties du corps afin d'assurer une meilleure mobilité dans la rhizosphère. En outre, l'excrétion du liquide coelomique chargé de composés indoliques provenant du tissu chlorogène stimulerait par la même occasion la croissance racinaire. Cette stimulation de la rhizogénèse serait bénéfique pour le développement des vers de terre. En effet, le système racinaire des plantes offre un abri humide et constitue une source de nourriture très convoitée par les lombricides (Ferrière 1980, Cortez et Bouché 1992).

Les pores coelomiques dorsaux ne constituent pas les seuls orifices de communication avec le milieu extérieur. En effet, les cavités coelomiques de *Lumbricus terrestris* communiquent également mais indirectement avec la rhizosphère par l'intermédiaire des pores urinaires ventraux en relation avec l'appareil excréteur. En effet, l'appareil excréteur du ver est constitué d'une paire de néphridies par métamère, à cheval sur le dissépiment. Chaque néphridie comporte un néphrostome qui est directement en contact avec le liquide coelomique via un long tube ayant une morphologie variable, possédant généralement un élargissement (la vessie) et débouchant à l'extérieur du métamère suivant par un pore urinaire (néphridiopore) latéro-ventral. L'évacuation par les pores urinaires ventraux des composés indoliques accumulés dans le liquide coelomique constituerait une deuxième voie d'excrétion où les dérivés indoliques seraient cette fois-ci éliminés en tant que déchets azotés du métabolisme interne du ver, à l'instar de l'urée et de l'ammoniaque. Les composés indoliques à effets rhizogènes prendraient donc naissance au niveau du tissu chlorogène, puis s'accumuleraient temporairement dans le liquide de la cavité coelomique. Ces composés indoliques seraient alors libérés dans la rhizosphère par la surface cutanée du ver au niveau des pores coelomiques dorsaux et des pores urinaires ventraux communiquant avec la cavité coelomique par l'intermédiaire du néphrostome.

Références

- Amador JA. and Görres JH. (2005). Role of the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* L. in the distribution of plant residue nitrogen in a corn (*Zea mays*)-soil system. *Applied Soil Ecology*. **30**, 203-214.
- Amador JA., Görres JH., and Savin MC. (2006). Effects of *Lumbricus terrestris* L. on nitrogen dynamics beyond the burrow. *Applied Soil Ecology*. **33**, 61-66.
- Amaral AFS. and Rodrigues ADS. (2005). Metal accumulation and apoptosis in the alimentary canal of *Lumbricus terrestris* as a metal biomarker. *BioMetals*. **18**, 199-206.

- Amaral A., Soto M., Cunha R., Marigomez I., and Rodrigues A. (2006). Bioavailability and cellular effects of metals on *Lumbricus terrestris* inhabiting volcanic soils. *Environmental Pollution*. **142**, 103-108.
- Becquer T., Dai J., Quantin C., and Lavelle P. (2005). Sources of bioavailable trace metals for earthworm a Zn-, Pb- and Cd- contaminated sol. *Soil Biology and Biochemistry*. **37**, 1564-1568.
- Bossuyt, H., Six, J. and Hendrix, P.F. (2005). Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. *Soil Biology & Biochemistry*. **37**, 251-258.
- Cortez J. and Bouché M.B. (1992). Do earthworms eat living roots ? *Soil Biology and Biochemistry*. **24**, 913-915.
- Diamantstein T. and Ehrhart H. (1961). Hoppe-seyler's. *Z. Physiol. Chem.* **326**, 131.
- El Harti A., Saghi M., Molina JAE. et 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*. *Can. J. Zool.* **79**, 1911-1920.
- El Harti A., Saghi M., et Molina JAE., Teller G. (2001b). Production de composés indoliques rhizogènes par le ver de terre *Lumbricus terrestris*. *Can. J. Zool.* **79**, 1921-1932.
- Ferrière G. (1980). Fonctions des lombriciens. VII. Une méthode d'analyse de la matière organique végétale ingérée. *Pedobiologia*. **20**, 263-273.
- Fischer E. (1993). The myelo-erythroid nature of the chloragogenous-like tissues of the annelids. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*. **106**, 449-453.
- Ge F., Shuster WD., Edwards CA., Parmelee RW., and Subler S. (2001). Water stability of earthworm casts in manure-and inorganic-fertilizer amended agroecosystems influenced by age and depth. *Pedobiologia*. **45**, 12-26.
- Grassé P.P. (1961). *Traité de zoologie. Anatomie, systématique, biologie. Tome V. Fascicule I.*, Masson et Cie.
- Grassé P.P., Poisson R.A. et Tuzeto O. (1970). *Précis de sciences biologiques, 2^{ème} édition zoologie. Tome I. Invertébrés.* Masson et Cie.
- Grelle C. et Descamps M. (2000). L'autométallographie appliquée à un modèle oligochète : *Eisenia fetida typica* : Avantages et limites de la technique. *Bull. Soc. Zool. Fr.* **125**, 9-16.
- Hais IM. und Macek K. (1958). *Handbuch der Papier Chromatographie.* Veb Verlag G. Fischer, Jena.

- Horn, M.A., Mertel, R., Gehre, M., Kästner, M., and Drake, H.L.(2006). In vivo emission of dinitrogen by earthworms via denitrifying bacteria in the gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1013-1018.
- Kasschau M.R., Ngo T.D., Sperber L.M., and Tran K.M. (2007). Formation of filopodia in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomocytes in response to osmotic stress. *Zoology.* **110**, 66-76.
- Kauschke E., Mohrig W., and Cooper E. (2007). Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms. *European Journal of Soil Biology.* **43**, 5110-5115.
- Le Bayon RC. and Binet F. (2001). Earthworm surface casts affect soil erosion by runoff water and phosphorus transfer in a temperate maize crop. *Pedobiologia.* **45**, 430-442.
- Liebmann E. (1942). The coelomocytes of lombricidae. *Ibidem.* **71**, 221-249.
- Liebmann E. (1945). Experimental study on the role of trephocytes in regenerations of *Eisenia foetida*. *Growth.* **9**, 430-454.
- Liebmann E. (1946). On trephocytes and trephocytosis; a study of the role of leucocytes in nutrition and growth. *Growth.* **10**, 291-329.
- Massicotte R., Robidoux P.Y., Sauvé S., Flipo D., Mathiot A., Fournier M., and Trottier B. (2004). Immunotoxicological response of the earthworm *Lumbricus terrestris* following exposure to cement kiln dusts. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **59**, 10-16.
- Morgan A.J., Stürzenbaum S.R., Winters C., Grime G.W., Nor Azwady A., Aziz., and Kille P. (2004). Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **57**, 11-19.
- Munier R. (1951). Paper partition microchromatography of alkaloids and various biological nitrogenous bases. IV. Separation of some derivatives of nicotinic acid and tryptophan. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **33**, 857-861.
- Munier R. (1953). Separation of alkaloids from their N-oxides by paper chromatography. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **35**,: 1225-1291.
- Muscolo A., Bovalo F., Gionfiddo F., and Nardi S. (1999). Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil. Biol. Biochem.* **31**, 1303-1311.
- Postma-Blaauw MB., Bloem J., Faber JH., Groenigen JWV., de Goede RGM., and Brussaard L. (2006). Earthworm species composition affects the soil bacterial community and net nitrogen mineralization. *Pedobiologia.* **50**, 243-256.

- Pulleman MM., Six J., Uyl A., Marinissen JCY., and Jongmans AG. (2005). Earthworms and management affect organic matter incorporation and microaggregate formation in agricultural soils. *Applied Soil Ecology*. **29**, 1-15.
- Randerath K. (1971). Alcaloïdes, amines et autres composés basiques dans la chromatographie sur couches minces. 2^{ème} édition. Gauthier villars. pp. 87-109.
- Schramm, A., Davidson, S.K., Dodsworth, J.A., Drake, H.L., Stahl, D.A. and Dubilier, N. (2003). Acidovorax-like symbionts in the nephridia of earthworms. *Environ Microbiol* ; **5**, 804-809.
- Semal-Van Gaussen P. (1956). Les cellules chloragogènes des Lombriciens. *Bul. Biol. France et Belgique* . **90**, 335-356.
- Singleton D.R., Hendrix P.F., Coleman D.C., and Whitman W.B. (2003). Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). *Soil Biology & Biochemistry*. **35**, 1547-1555.
- Stahl E., Kaldewey H. (1961). Spurenanalyse physiologisch aktiver, einfacher Indolderivate. *Hoppe-seyler's. Z. Physiol. Chem.* **323**,182-191.