

# **Pouvoir neutralisant des pH acides par les excréments cutanés de *Lumbricus terrestris* L.**

## **Neutralizing acidic pH by cutaneous excreta of *Lumbricuss terrestris* L.**

Manuscrit reçu le 16 janvier 2015 et accepté le 13 décembre 2015

**Mohamed RAOUANE<sup>1</sup> et Abdellatif EL HARTI<sup>2</sup>**

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

### **Résumé :**

Cette étude tente d'élucider le rôle de *Lumbricus terrestris* dans la régulation du pH. L'approche expérimentale adoptée permet d'écartier toutes les interférences possibles avec les composantes du sol. L'immersion des vers dans les solutions réactionnelles à différents pH acides a permis la délimitation *in vitro* d'une zone de tolérance comprise entre pH = 2 et pH = 7. Dans cette zone, plus le pH s'écarte de la neutralité plus la réaction des vers est intense et plus la production des excréments cutanés est abondante. On assiste à une tendance à la neutralisation progressive des solutions réactionnelles. La pulvérisation régulière des vers par les mêmes solutions réactionnelles a permis de constater que plus le pH s'écarte de la neutralité, plus la variation du poids frais moyen des lots de vers est importante. Cette chute du poids frais des vers témoigne de la libération des excréments cutanés sous l'effet du pH. Le pouvoir neutralisant est d'autant plus important que le poids frais des lots de vers est grand. L'application des excréments cutanés seules entraîne la neutralisation des solutions réactionnelles acides. Compte tenu de ces résultats, on peut dire que dans la nature, *Lumbricus terrestris* interviendrait directement sur le pH acide du sol par l'intermédiaire de ses excréments cutanés.

*Mots clés* : excréments cutanés, effet neutralisant, pH, *Lumbricus terrestris*, vers de terre.

### **Abstract:**

This study attempts to reveal the role of *Lumbricus terrestris* in the regulation of pH. The experimental approach adopted will allow the removal of any possible confusion with soil components. In fact, immersing worms in reactional solutions with different acidic pH has permitted the delineation of an *in vitro* tolerance range contained between pH = 2 and pH = 7. In this range, the reaction's intensity and the abundance of cutaneous excreta increase along with the deviation of the pH from the neutral zone. Thus, we can notice a trend to gradual neutralization of the reactional solutions. By spraying the worms regularly with those same acidic solutions showed that the higher the pH deviates from neutrality, the more significant the change of worm's weight is. This drop in worm's fresh weight proves the release of cutaneous excreta under the effect of pH. The neutralizing power is more important when the fresh weight of the worms is great. It is also essential to point out that applying the cutaneous excreta alone, causes the neutralization of acidic solutions. Holding account of these results, we can affirm that, in the nature, *Lumbricus terrestris* affects directly the soil's pH by its cutaneous excreta.

*Keywords* : cutaneous excreta, neutralizing effect, pH, *Lumbricus terrestris*, worms.

---

<sup>1</sup> Adresse électronique : [mohamed\\_raouane@yahoo.fr](mailto:mohamed_raouane@yahoo.fr)

<sup>2</sup> Adresse électronique : [elharti.abdel@yahoo.fr](mailto:elharti.abdel@yahoo.fr)

## **1. Introduction :**

Il est aujourd'hui définitivement établi que les vers de terre jouent un rôle primordial dans la fertilité des sols. Ce rôle est déterminant dans les processus d'aération et de structuration du sol, dans les mécanismes d'infiltration de l'eau et de brassage de la matière organique et minérale et enfin, dans les cycles de minéralisation et d'humification (Edwards et Bohlen 1996 ; Lee 1985 ; Lavelle 1988 ; Parkinson et McLean 1998 ; Bernier et Ponge 1994 ; Satchell 1958, 1967). Sont également établis leur effet direct dans l'amélioration de la production racinaire chez les plantes supérieures (Rhee 1969 a, 1969b ; Eisenhauer et al. 2007 ; Lavelle et al. 2006 ; Lavelle et Spain 2001 ; El Harti *et al.* 2001a, 2001b) ainsi que dans la dissémination des microorganismes indispensables à la fertilité du sol (Macfadyen 1968 ; Fayolle 1982 ; Double et al. 1994 ; Alpehi *et al.* 1996). Le rôle des vers de terre sur le pH du sol reste encore sujet à discussion. Des études à caractère écologique et agronomique se sont focalisées sur l'impact du pH sur le mode de vie de ces animaux ainsi que sur la répartition des différentes espèces de vers dans le sol (Bornebusch 1930 ; Bouché 1970). D'autres études, plus récentes, se sont plutôt intéressées à l'impact des vers de terre sur le pH du substrat dans lequel ils vivent. Ces recherches, dont les résultats sont parfois contradictoires, ont été réalisées dans des sols le plus souvent acides. Le rôle neutralisant des 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). Dans tous les cas, des incertitudes subsistent en raison des interférences multiples sur le pH, notamment à partir des composantes biologiques et chimiques du sol.

Le rôle éventuel de ces animaux invertébrés dans la régulation du pH du sol a suscité l'intérêt de notre laboratoire pour diverses raisons :

- (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 *et al.* 2013) ;
- (ii) aussi, en raison de l'impact du pH sur les mécanismes d'absorption racinaire chez les plantes supérieures comme 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.

Dans ce travail, on se propose d'étudier de manière systématique l'impact des vers de terre sur le pH.

Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi *Lumbricus terrestris*, espèce omniprésente et commune à divers écosystèmes ou agro-biocénose. Aussi, nous avons mis au point un protocole expérimental permettant d'écartier toutes les interférences possibles sur le pH. Toutes nos expériences se déroulent *in vitro*. Nous avons testé l'action et la réaction des vers dans des solutions réactionnelles connues à différents pH acides. Nous avons suivi instantanément l'évolution du pH de ces solutions ainsi que la variation du poids frais des vers. La perte en poids frais des vers met en évidence l'implication des excréments cutanés dans la neutralisation du pH des solutions réactionnelles en question. Enfin, nous avons testé directement le pouvoir neutralisant de ces excréments cutanés.

## **2. Matériels et méthodes :**

*Lumbricus terrestris* est récolté dans une zone marécageuse située à 40 km au Nord Ouest de Rabat (Kénitra-Maroc). Cette espèce est très représentative car elle appartient au groupe des vers anéciques qui constitue environ 60% 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. A chaque 24 H on élimine les déjections par rinçage des lots de vers et nettoyage du tissu enrobant à l'eau désionisée. Au 7<sup>ème</sup> 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 à différents pH**

Les solutions expérimentales à différents pH acides sont préparées par dilutions successives d'une solution mère de HCl 1M. Les valeurs de pH acides (1, 2, ..., 6) préparés à partir de monoacides forts (HCl) correspondent théoriquement aux valeurs des concentrations molaires (C) successives de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , ... et  $10^{-6}$  M selon la formule  $\text{pH} = -\log C$ . 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 HCl très diluée. Étant donné que l'eau distillée est légèrement acide, le pH de la solution neutre est obtenu par ajustement avec quelques gouttes d'une solution de NaOH très diluée. On prélève des volumes déterminés de ces solutions expérimentales pour les utiliser dans les 4 séries d'expériences.

### **2.3. Préparation de la solution d'excréments cutanés des vers**

On utilise la méthode de stimulation de la production des excréctions 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, 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 ( $P_i$ ). 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 cristalliseur puis dès que son atmosphère se charge en éther de pétrole volatil, les vers réagissent énergiquement en libérant des excréctions abondantes. 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 excréctions 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 ( $P_f$ ) des vers. La quantité des excréctions cutanées est déterminée par la différence du poids frais du lot de vers avant et après stimulation ( $P_i - P_f$ ). 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 cutanées. Le poids frais total de vers utilisés étant de 23,5 g, celui des excréments cutanées 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 mise à sec des excréments est une étape nécessaire pour éliminer l'ammoniaque, une des composantes de l'urine libérée par les vers au même temps que les excréments. L'ammoniaque, base faible est volatile est susceptible d'intervenir dans la neutralisation des solutions réactionnelles acides.

Le terme excréments cutanées sous-entend tous les liquides biologiques produits par la surface corporelle des vers. Le pH de la solution d'excréments reconstituée à la concentration de 1,2 g/100 ml est égal à 7,6.

## **2.4. Protocole expérimental**

### **2.4.1. Immersion des lots de vers de même poids frais dans des solutions à différents pH.**

Les vers de terre préalablement préparés à l'expérimentation sont répartis en 7 lots. Le poids frais de chacun des lots est de 5 g environ. Chaque lot de vers est introduit dans un tube à essai contenant 20 ml de la solution expérimentale de pH déterminé. Au total 7 lots de vers pour 7 valeurs de pH. On commence l'expérience à partir du tube 1 de pH 1 et on termine par le tube 7 de pH 7. 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.

#### 2.4.2. Pulvérisation des lots de vers par des solutions à différents pH

Comme dans l'expérience précédente, on utilise 7 lots de vers préalablement préparés à l'expérimentation. Le poids frais initial (Pi) de chacun des lots étant de 5 g environ. Chaque lot de vers est déposé dans un entonnoir de Buchner pour y subir des pulvérisations répétitives pendant 5 min par 20 ml de solution à pH déterminé (lot1, pH = 1) ;(lot2, pH = 2) ;... ;(lot7, pH = 7). 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'excrétions cutanées 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.

#### 2.4.3. Immersion des vers de poids frais différents dans des solutions à pH = 4

Comme précédemment, des lots de vers préalablement préparés à l'expérimentation sont introduits dans 10 ml d'une solution de HCl à pH = 4. On utilise pour chaque expérience un lot de 5 g, 8 g et 11 g environ. La valeur du pH de la solution réactionnelle est relevée toute les 2 min et ce jusqu'à 30 min. L'expérience est répétée 5 fois pour chaque valeur de poids frais avec de nouveaux lots de vers.

#### 2.4.4. Effet des excrétions cutanées sur la variation du pH des solutions réactionnelles acides

La solution des excrétions cutanées à 1,2 g/100 ml d'eau distillée obtenue par la méthode de stimulation 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 1 ml sur 10 ml de solutions de HCl à différents pH (pH = 3. pH = 4 et pH = 5). Des mesures de pH sont alors effectuées au fur et à mesure. La même expérience est réalisée uniquement à partir d'eau distillée dont le pH est ramené à celui de la solution d'excrétions cutanées (pH = 7,6) par ajout de quelques gouttes d'une solution de NaOH diluée. Cette solution d'eau distillée ainsi obtenue est utilisée comme témoin en la faisant réagir par fraction d'1 ml sur les mêmes solutions acides.

### 2.5. 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 exprimée en unité de pH (U) après immersion pendant 30 min, le test de Dunnett est retenu pour comparer les résultats obtenus à partir des poids frais de 5 g d'une part et ceux obtenus à partir des poids frais de 8 g et 11 g.

### **3. Résultats :**

#### **3.1. 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 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 6 et 7. En effet, plus le pH des solutions est acide (pH=5 ; 4 ; 3 ; 2 et 1), plus l'agitation des vers est importante et plus les solutions réactionnelles respectives deviennent troubles, visqueuses et de couleur blanchâtre à jaunâtre. L'observation minutieuse des vers en agitation montre une libération plus ou moins importante des excrétions cutanées à partir de leur surface corporelle. Quelle que 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 acides (pH = 1), les vers s'aplatissent et durcissent avant de périr en fin d'expérience. À pH = 2, les vers semblent supporter cette valeur extrême de pH acide même s'ils sortent plus ou moins affaiblis après 30 min d'immersion.

#### **3.2. Variation du pH et du poids frais des vers après immersion**

##### **3.2.1. 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 au pH = 1 en raison de leur effet léthal sur les vers. L'immersion des lots de vers dans les solutions aux pH voisins de la neutralité ( $6 \leq \text{pH} \leq 7$ ) n'apporte pas de variations importantes des valeurs moyennes du pH en fonction du temps. Les solutions au pH = 6 se stabilisent lentement au pH voisin de 7. Les solutions à pH = 7 restent pratiquement stables avec une très légère augmentation d'environ 0,1 unité dans les premières minutes de l'expérience. L'immersion des lots de vers dans les solutions réactionnelles aux pH franchement acides ( $\text{pH} < 6$ ) provoque une augmentation importante des valeurs moyennes du pH en fonction du temps (Tableau 1). Ces variations ont tendance à se stabiliser dans la zone s'approchant de la neutralité du pH. Dans tous les cas, 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 mn d'immersion.

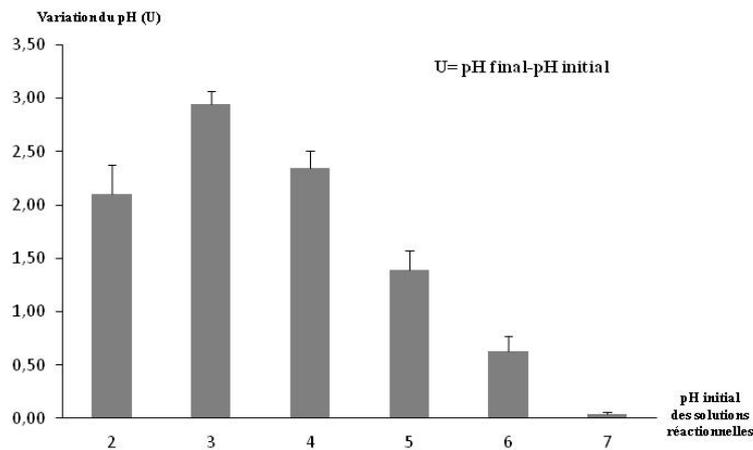
La différence de pH moyen des solutions réactionnelles, exprimée en unité moyenne de pH (U), après 30 min d'immersion des lots de vers est représentée dans la figure 1. Cette différence ( $U = \text{pH}_{\text{final}} - \text{pH}_{\text{initial}}$ ) traduit l'évolution du pH des solutions réactionnelles en fin d'expérience. Dans cette figure, une augmentation du pH des solutions réactionnelles acides est représentée par des unités positives. Nous constatons que la variation moyenne du pH des solutions réactionnelles

**Tableau 1 :** Évolution du pH moyen des solutions réactionnelles acides en fonction du temps (mn) après immersion des lots de vers (*Lumbricus terrestris. L.*).

Temps (min)	Zone de pH acide létale	Zone de pH acide tolérable pendant 30mn					Zone de neutralité	
	Lot 1 (pHi=1)	Lot 2 (pHi=2)	Lot 3 (pHi=3)	Lot 4 (pHi=4)	Lot 5 (pHi=5)	Lot 6 (pHi=6)	Lot 7 (pHi=7)	
5	-	2,86±0,20	3,84±0,26	5,62±0,28	5,84±0,28	6,42±0,16	7,11±0,06	
10	-	3,22±0,39	4,22±0,39	5,96±0,27	6,05±0,31	6,51±0,15	7,10±0,06	
15	-	3,53±0,46	5,17±0,55	6,09±0,29	6,17±0,29	6,55±0,11	7,09±0,07	
20	-	3,67±0,42	5,67±0,04	6,25±0,20	6,29±0,29	6,62±0,15	7,07±0,05	
25	-	3,86±0,35	5,83±0,13	6,31±0,20	6,36±0,25	6,65±0,14	7,04±0,03	
30	-	4,06±0,30	5,96±0,14	6,35±0,19	6,37±0,25	6,67±0,14	7,03±0,02	

neutre (pH = 7) est très faible (0,04 U). Aux valeurs de pH acide décroissant (pH = 6 ; 5 ; 4 ; 3 et 2), la variation du pH augmente progressivement. Cette variation atteint une valeur moyenne de 2,94 U

pour la solution réactionnelle à pH initial égale à 3. Pour la solution réactionnelle à pH initial égal à 2, la variation du pH est moins importante (2.1 U), vraisemblablement en raison de l'épuisement des vers dans cette zone de pH extrêmement acide. 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 d'acidité 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 (Fig.1) donne une différence hautement significative ( $Pr < 0,0001$ ) par rapport à la modalité témoin (solution à pH=7).



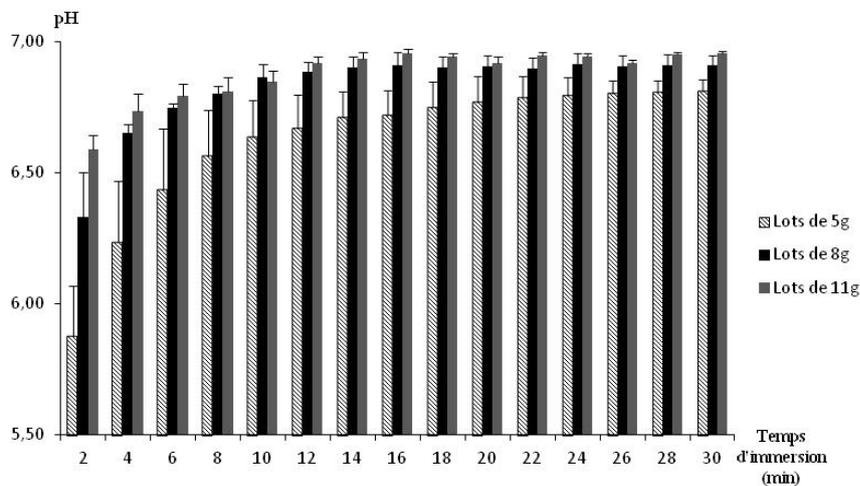
**Fig.1 :** Variations moyennes du pH des solutions réactionnelles acides exprimées par la différence (U) entre le pH final et le pH initial après 30 min d'immersion des lots de vers (*Lumbricus terrestris*. L). (Test de Dunnett : différences très significative ( $Pr < 0,0001$ ) entre les variations du pH de la solution réactionnelle à  $pH_i = 7$  (modalité témoin) et les variations du pH des autres solutions réactionnelles de  $pH_i = 2$  à  $pH_i = 6$ ).

### 3.2.2. Variation du poids des vers

Parallèlement à la variation du pH des solutions réactionnelles, nous avons tenu de 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. 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 expérimental (pulvérisation au lieu de l'immersion) pour mettre en évidence la variation du poids frais des vers en fonction du pH des solutions réactionnelles.

### 3.3. 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 ( $6 \leq \text{pH} \leq 7$ ) est atteinte beaucoup plus rapidement en augmentant la quantité de vers de 5 ; 8 à 11 g tout en réduisant le volume des solutions réactionnelles respectives à 10 ml. La figure 2 montre que la vitesse de neutralisation de la solution acide (pH = 4) est fonction de la quantité des vers utilisée. La zone de neutralité est atteinte après un temps moyen d'immersion de 4 min pour les lots de poids frais moyen de 5 g. Pour les lots de poids frais moyen de 8 g et 11 g, le temps moyen de neutralisation est de 2 min seulement. Nous constatons 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



**Fig. 2 :** Évolution du pH moyen d'une solution acide (pH = 4) en fonction du temps d'immersion (min) et en fonction du poids frais moyen (g) des lots de vers (*Lumbricus terrestris*, L).

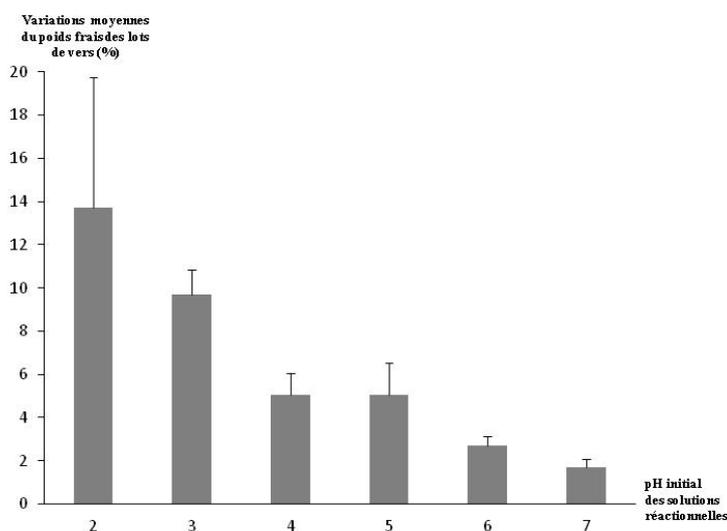
zone de neutralité indépendamment du poids frais moyen des lots de vers. Concernant la variation du pH de la solution réactionnelle en fin d'expérience après immersion des lots de vers de poids frais différents, le test de Dunnett révèle une différence hautement significative ( $Pr < 0,0001$ ) entre les variations du pH de la solution réactionnelle après immersion des lots de 5 g (lots témoins) et celles de 11 g, et seulement significative ( $Pr < 0,001$ ) entre les lots de 5 g et de 8 g.

### 3.4. Variation moyenne du poids frais des vers après pulvérisation

La pulvérisation régulière et homogène des lots de vers par les solutions réactionnelles à différents pH (pH=2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 et 7) engendre une réaction des vers qui est identique à celle observée lors de l'immersion totale des vers dans ces mêmes solutions. La réaction des vers est couplée à une émission d'excrétions cutanées. Plus la solution pulvérisée est acide, plus l'agitation des vers est intense et plus

la production des excréments cutanés est abondante. Les excréments sont entraînés par les solutions de pulvérisation au travers l'entonnoir de Buchner.

La variation moyenne du poids frais des lots de vers exprimée en pourcentage (%) en fonction des valeurs de pH des solutions pulvérisées est exposée dans la figure 3. L'analyse des résultats montre que plus la solution pulvérisée est acide plus la perte en poids frais des lots de vers est importante. Aux pH neutre (pH = 7) et voisin de la neutralité (pH = 6), la variation du poids frais des vers est



**Fig. 3:** Variation en pourcentage du poids frais moyen des lots de vers (*Lumbricus terrestris*) après pulvérisation des solutions réactionnelles 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 à pH = 12 ; pH = 2 et pH = 3).

l'ordre de 5%. À pH = 3, les vers perdent 9,7 % de leur poids frais sous forme d'excréments cutanés. À pH = 2, la perte en poids frais est maximale (13,71 %).

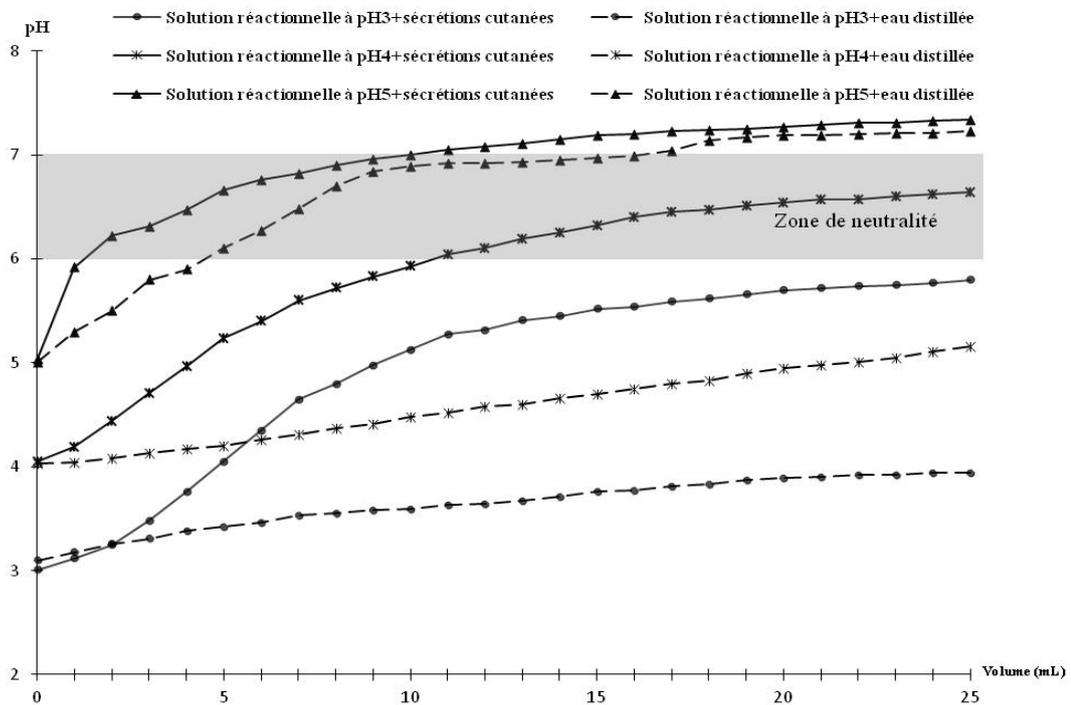
Le test de Dunnett au seuil de 0,95 montre une différence hautement significative ( $Pr < 0.0001$ ) entre le traitement des vers avec la solution à pH = 7 considérée comme témoin et les traitements des vers avec des solutions à pH extrême (pH = 2 et pH = 3).

### 3.5. Effet direct des excréments cutanés sur le pH

La solution d'excréments cutanés à 1,2 g/100 ml est obtenue comme indiqué dans matériels et méthodes. Son pH étant égal à 7,6. La figure 4 illustre la variation du pH des solutions réactionnelles acides (pH = 3, pH = 4, pH = 5) en fonction du volume ajouté de la solution d'excréments cutanés.

En effet, l'application par fraction d'1 ml de cette solution engendre une augmentation importante du

pH par comparaison aux solutions réactionnelles témoins où la solution d'excrétions est remplacée par de l'eau distillée préalablement ajustée au même pH (pH = 7,6).



**Fig. 4:** Effet neutralisant d'une solution d'excrétions cutanées sur des solutions acides (pH = 3, pH = 4 et pH = 5) en comparaison avec l'effet d'une solution d'eau distillée.

Nous constatons que plus la solution réactionnelle est acide, plus la tendance à atteindre la zone de neutralité ( $6 \leq \text{pH} \leq 7$ ) nécessite un volume de solution d'excrétions plus grand.

À pH=5, la limite inférieure de la zone de neutralité est atteinte très rapidement à partir du premier ml de la solution d'excrétions contre 4 à 5 ml d'eau distillée ajustée au pH = 7,6. À pH = 4, la zone de neutralité est atteinte après l'ajout de 10 à 11 ml de la solution d'excrétions. Un volume équivalent d'eau distillée fait remonter le pH de 4 à 4,5 seulement, loin de la zone de neutralité. À pH = 3, l'ajout de 25 ml de solution d'excrétions fait passer le pH à 5,8 très proche de la zone de neutralité. Un volume équivalent d'eau distillée fait déplacer le pH de 3 à 3,9 seulement encore plus loin de la zone de neutralité.

D'une manière générale, nous constatons que l'effet neutralisant par les excréments cutanées est plus intense dans les 10 premiers ml. Au-delà, l'effet neutralisant devient relativement faible en s'approchant de la zone de neutralité. Également, plus le pH initial des solutions réactionnelles est acide, plus l'effet neutralisant des excréments est supérieur à celui de l'eau distillée. Nous rappelons au passage que l'eau distillée utilisé comme témoin a été ramenée à un pH comparable à celui des excréments (pH = 7,6). De ce fait, son effet neutralisant est normalement plus important que celui

d'une eau distillée pure, légèrement acide, utilisée pour la récolte des excréctions cutanées. En effet, si de l'eau distillée n'avait pas été ajustée (pH = 7,6), l'écart des effets neutralisant entre l'eau et les excréctions serait encore plus important.

#### **4. Discussion**

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 et que les vers sont affaiblis. Ils ne supportent pas l'immersion même dans des solutions réactionnelles à pH modéré. À 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 par conséquent 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 acides. 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 acides a permis de délimiter une zone de tolérance de pH située entre pH = 2 et pH = 7. 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 tendent à neutraliser les solutions réactionnelles d'immersion quelle que soit la valeur de leur pH. On peut dire que l'effet neutralisant des vers est globalement beaucoup plus efficace et plus rapide à pH = 4 et à pH = 5 qu'aux pH acides compris entre pH = 3 et pH = 2. Lorsque le pH des solutions réactionnelles est proche de la zone de neutralité, la réaction des vers est faible et la variation du pH

est moins importante. Dans les solutions réactionnelles strictement neutres (pH = 7) une légère variation de leur pH est observée dans le sens de l'alcalinité. Ce résultat serait vraisemblablement en relation avec la valeur du pH de la solution d'excrétions cutanées qui est légèrement basique (pH = 7,6). 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 est à mettre en relation avec une production plus élevées d'excrétions cutanées. Ainsi, pour une solution réactionnelle à pH = 4, le temps moyen de neutralisation est écourté de deux fois quand la quantité de vers est augmentée d'environ deux fois.

La quantification des excrétions cutanées libérées 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 le 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'excrétions, 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'excrétions cutanées 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 grâce notamment à l'érythrocrurine (Laverack 1963). 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 acides 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 de ces excréments cutanés à des solutions réactionnelles acides à pH = 3, pH = 4 et pH = 5 entraîne une tendance à la neutralisation progressive de ces solutions en fonction du volume de la solution des excréments ajouté. Globalement, les profils de neutralisation pour ces différentes solutions réactionnelles sont comparables à ceux obtenus lors de l'immersion totale des vers. Ainsi, la neutralisation est plus intense au début qu'à la fin de l'expérience. Elle est également plus rapide en solutions acides faibles (pH = 4 et pH = 5) qu'en solutions acides fortes (pH = 3). L'application des excréments seules, sans les vers, apporte donc la preuve définitive de l'implication des excréments cutanés dans le pouvoir neutralisant de *Lumbricus terrestris*. L'ammoniaque, éventuellement libéré en même temps que les excréments cutanés, est une base faible susceptible d'intervenir dans la neutralisation des solutions réactionnelles acides. Cette éventualité a été écartée par évaporation de la solution mère d'excréments pendant 48 heures à 70 °C. Par conséquent la neutralisation observée dans les solutions réactionnelles acides ne pourrait être expliquée que par la présence de substances solubles et non volatiles. Celles-ci interagiraient en captant les protons libres en solution. Ce constat laisse supposer que les excréments cutanés libérées au niveau du sol, résisteraient aux températures estivales élevées en conservant leur pouvoir neutralisant. Il est établi que lors des périodes défavorables, caractérisées par une température élevée couplée à une pluviométrie faible, les lombricidés entrent en léthargie en arrêtant ou en réduisant leur activité biologique. Ainsi, les excréments cutanés libérées pendant la saison favorable par des vers en pleine activité biologique, interviendraient par leur effet neutralisant en période d'inactivité des vers.

Dans le sol, le facteur pH intervient dans la répartition des espèces de vers de terre (Lee 1985). Ainsi, selon la classification de Bornebusch (1930) améliorée par Bouché (1970), on distingue trois catégories écologiques de lombricidés : les épigés vivants en litière sont acidiphiles, les endogés vivants en profondeur du sol sont basiphiles et en fin les anéciques, représentés ici par *Lumbricus terrestris*, se déplaçant sur toute la hauteur du sol sont neutrophiles. L'amplitude de tolérance vis à vis du pH ( $2 \leq \text{pH} \leq 7$ ) enregistrée au laboratoire par notre équipe expliquerait en partie l'aptitude de cette espèce à se déplacer sur toute la hauteur du sol quelle que soit la valeur du pH des horizons traversés. Ainsi, *Lumbricus terrestris* non seulement résisterait aux variations du pH du sol mais contribuerait à neutraliser ces variations par l'intermédiaire de ses excréments cutanés. Le classement de *Lumbricus terrestris* parmi les espèces neutrophiles ne devrait pas sous-entendre que sa présence est strictement limitée aux sols de pH voisin de la neutralité mais serait vraisemblablement la conséquence de son propre effet neutralisant sur les pH acide du sol. Ce résultat pourrait avoir des applications intéressantes dans la fertilisation des sols initialement pauvres du fait de leur pH défavorables ainsi que dans la restauration de la fertilité des sols fragilisés par des polluants acides. En effet, 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 & Cie, Paris, **5**(1): 224-470.
- Bernier, N., Ponge, J.F. 1994. Humus form dynamics during the sylvogenetic cycle in a mountain spruce forest. *Soil Biol. Biochem.* **26** : 183–220.
- Bornebusch, C.H. 1930. The fauna of forest soil. *Pet. Forstlige Forsogsvaesen, Danmark*, **11** : 1-158.
- 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. Études 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. Étude 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., Spain, A.V. 2001. Soil ecology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 654p.

- 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.
- Laverack M.S., 1963. The physiology of earthworms. New York, USA: Pergamon Press, Ltd.
- Lee, K.E., 1985. Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use. Academic Press, London.
- Macfadyen, A. 1968. The animal habitat of soil bacteria. In: The ecology of soil bacteria. ed. Liverpool univ. Press, 66-76.
- 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.
- 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.
- Rhee, J.A., Van. 1969a. Inoculation of earthworms in a newly drained polder. *Pedobiologia*, **9**(1-2):128-132.
- Rhee, J.A., Van. 1969b. Development of earthworm populations in polder soils. *Pedobiologia*, **9**(1-2):133-140.
- 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.