... Avant-propos ...

Ce travail a été réalisé à l'I.N.R.A. de Dijon, station de faune du sol dirigée par Monsieur Bessard, dans le laboratoire de Monsieur Bouché.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin lors de mon stage et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE 2

I. GENERALITES 3

1.1 Principe 3

1.2 Cinétique de la réaction 3

1.3 Influence des facteurs physiques sur la vitesse 4

a - le pH 4

b - la température 5

II. DESCRIPTION DE LA METHODE 5

2.1 Stérilisation 5

2.2 Préparation des solutions 6

a - solution à inversion rapide (pH 1,21) 6

b - solution à inversion lente (pH 2,92) 6

c - solution antigel 7

2.3 Conservation 7

2.4 Détermination du pH 8

2.5 Détermination de β_o 9

2.6 Calcul de la température 9

2.7 Précision de la méthode 11

III. SIGNIFICATION DE LA TEMPERATURE MESUREE 12

3.1 Signification mathématique 12

3.2 Signification écologique 15

DEUXIEME PARTIE 17

I. MINIATURISATION DE LA METHODE 18

1.1 Nouveau procédé 18

1.2 Méthode de dosage 19

a - hydrolyse enzymatique 19

b - dosage du glucose 19

1.3 Calcul de la température 20

1.4 Description des techniques particulières mises en oeuvre..... 21
1.4.1 PREPARATION DES SOLUTIONS..... 21
1.4.2 FABRICATION DES AMPOULES..... 21
1.4.3 REMPLISSAGE..... 22
1.4.4 OBTURATION DE L'EXTREMITE..... 22
1.4.5 DOSAGE..... 23
a - préparation de l'échantillon..... 23
b - utilisation des ultrasons..... 23
c - dosage proprement dit..... 24
1.5 Manipulations réalisées..... 24
a - précision du dosage..... 24
b - application aux micro-ampoules..... 25
II. APPLICATION A LA MESURE DE TEMPERATURE CHEZ LES VERS DE TERRE.... 26
2.1 Justification..... 26
2.2 Description de la manipulation..... 27
2.2.1 CHOIX DES ANIMAUX..... 27
2.2.2 IMPLANTATION DES AMPOULES DANS LE VER..... 27
a - anesthésie..... 27
b - emplacement..... 28
c - opération..... 28
2.2.3 RECUPERATION DES AMPOULES..... 29
2.3 Expérimentation au laboratoire..... 29
2.4 Expérimentation au terrain..... 31
2.4.1 MATERIEL ET METHODE..... 31
a - lieu..... 32
b - capture..... 32
c - coloration..... 32
d - implantation des microampoules..... 33
e - mise au terrain..... 33
f - recapture..... 33
2.4.2 RESULTATS..... 34
a - température du sol..... 34
b - température des vers de terre..... 35

CONCLUSION ET DISCUSSION..... 37

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 39

ANNEXES..... 43

I. LES VITESSES DE REACTION..... 44

II. RELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS MOLAIRES ET LES POUVOIRS ROTATOIRES..... 45

III. LE COEFFICIENT DE TEMPERATURE Q_{10}..... 47

IV. DOSAGE DU GLUCOSE ET DU SACCHAROSE..... 48

V. CALCUL DE LA PART D'HYDROLYSE DUE AUX MANIPULATIONS ANNEXES..... 53

INTRODUCTION

La température est très souvent utilisée comme facteur physique de référence en écologie du sol et l'abondance des données est en grande partie liée à la facilité d'utilisation du thermomètre.

Cependant, pour l'étude dynamique des phénomènes, la multiplication de mesures ponctuelles mêmes rapprochées, est insatisfaisante et il est nécessaire de trouver de nouvelles méthodes permettant d'intégrer les données.

C'est ainsi que Berthet (1960) a repris et adapté une méthode initialement proposée par Pallmann et al. (1940) permettant de réaliser une intégration temporelle des températures et qui utilise la relation existant entre le taux d'hydrolyse d'une solution de saccharose et la somme des températures auxquelles elle a été exposée.

Depuis, cette méthode a été reprise par de nombreux auteurs (Damman, 1975 ; Grüll et Kvet, 1960 ; Jones, 1972 ; Lee, 1969 ; Lützke, 1963 ; Pattee, 1978 ; Petrik et Kvet, 1976 ; Smid, 1977) pour effectuer des mesures dans des milieux naturels tels l'air, l'eau ou le sol, en utilisant de grosses quantités de saccharose pouvant être dosées par polarimétrie.

L'originalité du travail proposé réside dans l'étude du lien entre la température et les lombriciens par une mesure in situ pour obtenir ainsi une intégration spatio-temporelle des températures. Pour cela, il s'agit de placer des micro-ampoules de saccharose dans le ver de terre, ce qui nécessite des modifications de la technique afin que sa miniaturisation soit possible.

Dans une première partie, je présenterai la "méthode d'inversion du saccharose", ses utilisations et la signification des valeurs mesurées. La seconde partie sera consacrée à la miniaturisation et à son application pratique sur les vers de terre, en replaçant ce travail dans le contexte des recherches effectuées sur les lombriciens.

PREMIERE PARTIE

MESURE DES ECHANGES THERMIQUES PAR LE TAUX D'INVERSION DU SACCHAROSE

I. GENERALITES

1.1 Principe
1.2 Cinétique de la réaction
1.3 Influence des facteurs physiques sur la vitesse

II. DESCRIPTION DE LA METHODE

2.1 Stérilisation
2.2 Préparation des solutions
2.3 Conservation
2.4 Détermination du pH
2.5 Détermination de β_o
2.6 Calcul de la température
2.7 Précision

III. SIGNIFICATION DE LA TEMPERATURE MESUREE

3.1 Mathématique
3.2 Ecologique

MESURE DES ECHANGES THERMIQUES PAR LE TAUX D'INVERSION DU SACCHAROSE

I. GENERALITES

1.1 Principe

En milieu acide, le saccharose s'hydrolyse en glucose et fructose. Zürchern et Hadorn (1977) ont vérifié qu'il ne se formait aucun autre produit en quantité appréciable.

$$\text{Saccharose} + H_2O \longrightarrow \text{Glucose} + \text{Fructose}$$

$$C_{12}H_{22}O_{11} \qquad C_6H_{12}O_6 \quad C_6H_{12}O_6$$

Dextrogyre (+) Dextrogyre (+) Lévogyre (-)

Lévogyre (-)

Le saccharose est dextrogyre tandis que le mélange glucose et fructose est lévogyre, d'où le terme usuel bien qu'impropre "d'inversion du saccharose".

La cinétique de cette réaction dépend du pH et de la température à laquelle est soumise la solution. Ainsi, en fixant le pH et en mesurant au bout d'un temps donné la proportion de sucre inverti, il devient possible de calculer un indicateur de la température moyenne qui a régné.

1.2 Cinétique de la réaction (cf. annexes)

L'inversion du saccharose est une réaction du premier ordre. La vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration de la substance réagissante A :

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = K[A]$$

On peut exprimer la constante de vitesse à une température et à un pH donnés par :

$$(1) \qquad \boxed{K_T = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A - x}}$$

(cf. annexe p. 44)

où : t est le temps

A la concentration de la solution de saccharose à t = 0

A - x la concentration de la solution de saccharose au temps t.

Mesures polarimétriques

La manière la plus simple et la moins coûteuse pour doser la quantité de sucre inverti, consiste à utiliser les propriétés optiques des sucres et à effectuer une mesure polarimétrique au bout d'un temps t.

Pallmann et al. (1940) ont établi la formule issue de *(1)* permettant de calculer K_T en fonction des pouvoirs rotatoires de la solution :

$$\boxed{K_T = \frac{1}{t} \log \left[\frac{\alpha_o - \beta_o}{\alpha - \beta_o} \right]}$$

(cf. annexe p. 45)

où t est le temps

α_o le pouvoir rotatoire de la solution au temps t = 0

α le pouvoir rotatoire de la solution au temps t

β_o le pouvoir rotatoire de la solution au temps t = infini, c'est-à-dire à inversion complète.

1.3 Influence des facteurs physiques sur la vitesse

a) le pH (Louisot, 1969)

Si l'on ne se trouvait pas en milieu acide, la réaction se produirait tout de même mais sa vitesse serait si faible, à la température ordinaire, qu'aucun signe d'inversion n'apparaîtrait même après plusieurs mois.

Le mécanisme de la réaction est relativement mal connu ; cependant, il apparaît que les ions H^+ jouent un rôle de catalyseur homogène. Il se forme dans un premier temps un composé intermédiaire instable par addition du catalyseur au substrat qui se dissocie ensuite

$$R \longrightarrow RH^+ + R' \longrightarrow RR' + H^+$$

La catalyse est homogène et, à température constante, la vitesse est proportionnelle à la concentration en ions H^+

$$v = \frac{dx}{dt} = K \left[H^+ \right] (A - x)$$

Après intégration, on peut exprimer :

$$K = \frac{1}{[H^+]t} \log \frac{A}{A - x}$$

b) la température

Comme la plupart des réactions chimiques, l'hydrolyse du saccharose est accélérée par une élévation de température.

Cette influence est bien représentée par une relation empirique due à Arrhénius, donnant la valeur de la constante de vitesse K_T à la température T :

$$K_T = C\, e^{-\frac{a}{T}}$$

où C et a sont des constantes.

Une autre manière d'exprimer l'influence de la température sur la vitesse de réaction est le Q_{10}, qui représente le facteur multiplicateur de la vitesse lorsqu'on s'élève de 10 °C (cf. annexe p. 47). Pour l'hydrolyse du saccharose, le Q_{10} a été estimé à 4,8 (Lee, 1969).

II. DESCRIPTION DE LA METHODE

Pour que la méthode donne des résultats valables, il est évidemment nécessaire de maintenir le pH à une valeur constante au moyen d'une solution tampon mélangée à la solution de saccharose. En outre, il faut empêcher le développement de micro-organismes, car ceux-ci dégraderaient le saccharose, le glucose ou le fructose.

2.1 Stérilisation

Pallmann et al. (1940) ont stérilisé séparément le tampon et le saccharose par la chaleur, pour les mélanger après refroidissement. Ceci présentait quelques difficultés techniques, aussi Berthet (1960) a proposé, à la place de la double stérilisation, l'usage d'un antiseptique neutre ajouté au mélange.

Il a vérifié que le formaldéhyde à la concentration de 0,35 % ne modifie ni le pouvoir rotatoire ni la vitesse de l'inversion.

De plus, l'usage du formol s'est avéré satisfaisant car Berthet n'a observé aucun signe de la présence de micro-organismes.

Utilisant le même antiseptique, Damman (1975) et Smid (1977) ont confirmé ces résultats.

Kundler (1954) a proposé l'utilisation de poudre de thymol. Schmitz et Volkert (1959) ont préféré le $Na_2\left[Hg\ Cl_4\right]$ car le thymol leur paraissait insuffisant vers 15 °C.

Adu (1968) et Jones (1972) ont obtenu de bons résultats avec le thymol mais pour des températures inférieures à 16 °C.

2.2 Préparation des solutions

On peut utiliser une solution à inversion rapide à pH 1,21 (Berthet, 1960) ou à inversion plus lente à pH 2,92 (Pallmann et al., 1940).

a) solution à inversion rapide (pH 1,21)

+ *solution tampon*
  3,730 g de KCl + 33,9 ml HCl N ; porter à 500 ml par H_2O (ce mélange ajouté à une partie égale d'eau donne un tampon à pH 1,5)
+ *solution de saccharose*
  400 g de saccharose sont dissous dans 260 ml H_2O + 10 ml formol 35 %. On obtient ainsi 521 ml de solution. Ce sirop est filtré sur papier Wattman N°1.
+ *Prendre exactement 100 ml de sirop dans un ballon jaugé ; les verser dans un Erlenmayer et rincer le ballon jaugé avec les 100 ml de solution tampon ; puis agiter énergiquement. Le pH de cette solution est d'environ 1,21.*

b) solution à inversion lente (pH 2,92)

+ *solution tampon*
  4,2016 g d'acide citrique dans 20 ml de NaOH 2N et porter à 100 ml par H_2O : prendre 40,4 ml de cette solution et compléter à 100 ml par HCl N/5

+ *solution saccharose*

  150 g de saccharose très pur sont dissous dans 96 ml H_2O et 4 ml de formol à 35 %. On a ainsi 194,2 ml de solution que l'on filtre.

+ *Le mélange à part égale de tampon et de saccharose est effectué comme précédemment exposé. Le pH de cette solution déterminé expérimentalement est de 2,92.*

La plupart des auteurs utilisent des fioles de verre scellées pour éviter toute fuite (Pallmann et al., 1940 ; Lee, 1969 ; Damman, 1975 ; Lütke, 1963). Berthet (1960) et Pattee (1978) ont employé des tubes à essais ou des flacons fermés par des bouchons en caoutchouc. Jones (1972) a utilisé directement des tubes polarimétriques.

c) solution antigel

La solution proposée gèle à - 4,7 °C (Pallmann et al., 1940). Si l'échantillon est exposé à une température inférieure, il se solidifie et l'hydrolyse cesse. Les températures basses ne sont donc pas prises en compte. Pour y remédier, Lee (1969) propose d'ajouter 150 g de NaCl par litre, ce qui abaisse le point de congélation en dessous de - 25 °C.

2.3 Conservation

Entre le moment de la préparation et le moment de l'emploi, il est possible de conserver la solution ou les échantillons à basse température pour empêcher l'inversion. Ceci est facilité du fait que la solution ne s'accroît pas en volume lors de la congélation (Pattee, 1978).

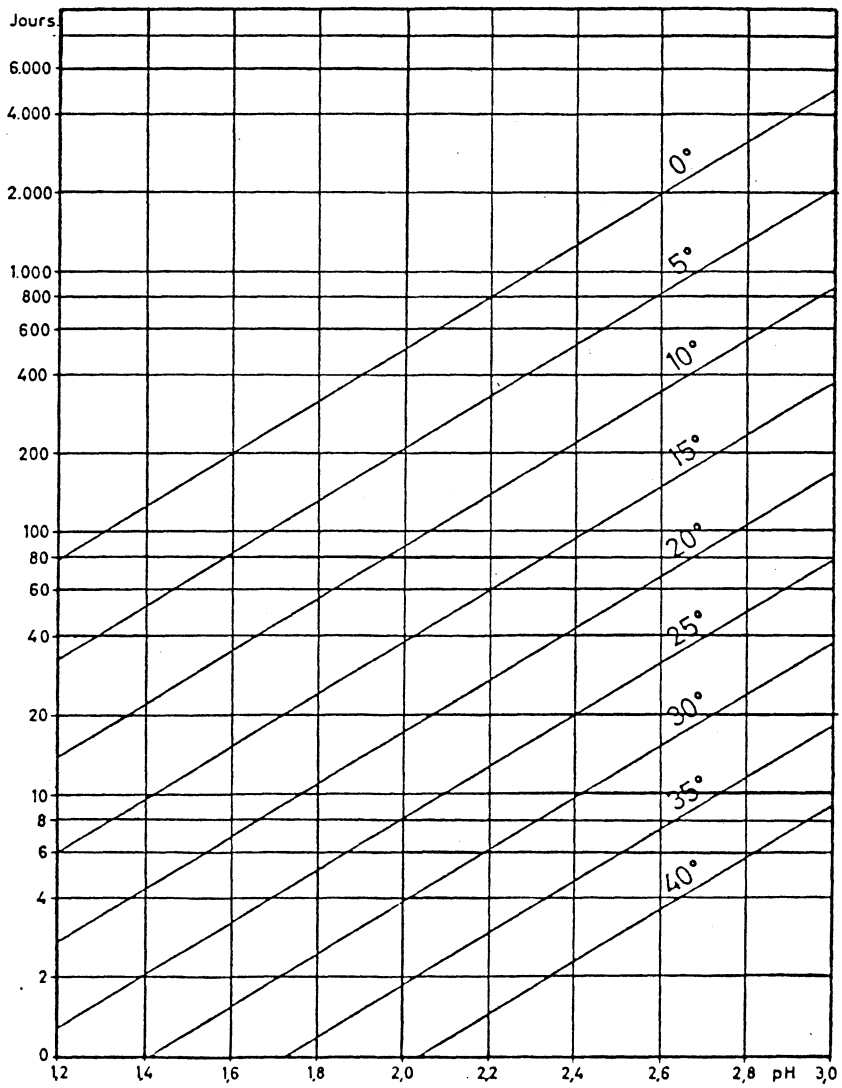
Les auteurs proposent différentes températures de conservation : - 30 °C (Dalbro, 1955), - 20 °C (Berthet, 1960), - 15 °C (Deshusses, 1953), - 4,7 °C (Schmitz et Volkert, 1959), - 2 à - 3 °C (Pallmann et al., 1940), - 2 °C (Jones, 1972).

Tous estiment qu'à ces températures l'inversion est négligeable pour des temps ne dépassant pas quelques jours, cependant, ils conseillent d'effectuer un témoin préparé en même temps que les échantillons et dosé au moment de leur mise en place.

2.4 Détermination du pH

La vitesse de la réaction dépend du pH de la solution tampon choisie. Ainsi, elle est environ 50 fois plus grande pour la solution à pH 1,21 que pour la solution à pH 2,92. Pour les mesures polarimétriques, il est nécessaire que plus de 10 % et moins de 90 % de la réaction ait eu lieu et il est même souhaitable, pour augmenter la précision de la mesure, que cette valeur se situe autour de 50 %.

En fonction de la durée de l'expérience et de l'estimation de la température moyenne que l'on va mesurer, il est intéressant de choisir le pH de la solution pour que l'on se trouve aux environs des 50 % d'hydrolyse. Pour cela, Berthet (1960) a établi les abaques suivants :



Relation entre le temps de demi-inversion, le pH et la température.

Par ailleurs, en choisissant une solution à un pH déterminé et en estimant la température mesurée, cela permet de connaître le temps au bout duquel il faudra retirer les échantillons pour obtenir la demi-inversion et avoir ainsi la meilleure précision.

2.5 Détermination de β_o

Nous avons vu précédemment que la constante de vitesse s'exprime en fonction des pouvoirs rotatoires mesurés α et α_o par la formule suivante :

$$K_T = \frac{1}{t} \log \left[\frac{\alpha_o - \beta_o}{\alpha - \beta_o} \right] \qquad \text{(cf. § 1.2 p. 4)}$$

Il faut calculer la valeur de β_o qui correspond au pouvoir rotatoire de la solution à inversion complète, c'est-à-dire pour un temps théoriquement infini.

Pour cela, Pallmann et al. (1940) ont immergé des ampoules scellées dans de l'eau bouillante pendant 8 heures. Ils ont ainsi trouvé $\beta_o = - 9,53$ °.

Berthet (1960) pense qu'à température élevée (> 50 °C) il se produit des réactions secondaires qui faussent la lecture polarimétrique. Il a donc déterminé la valeur de β_o par extrapolation de la courbe d'inversion d'une solution maintenue à température constante. Il a ainsi retenu, après une série d'approximations successives, la valeur $\beta_o = - 9,10$ ° qui a été admise par les auteurs ayant utilisé la méthode.

2.6 Calcul de la température

A partir de la valeur de la constante de vitesse K_T, il faut calculer la température T. Pour la solution à pH 2,92, Pallmann et al. (1940) ont effectué des mesures polarimétriques sur des solutions placées à différentes températures constantes et ont établi empiriquement deux relations linéaires :

$\log K_T = - 1,2200 + 0,0720\ T$ pour les températures comprises entre - 2 °C et 27,3 °C

$\log K_T = - 0,9064 + 0,0597\ T$ pour les températures comprises entre 27,3 °C et 40 °C.

Or ces formules ne sont que des approximations médiocres de la loi d'Arrhénius et elles ne s'appliquent qu'au cas particulier de la solution à pH 2,92.

C'est pourquoi Berthet (1960) a repris la formule d'Arrhénius :

$$K_T = C\, e^{-\frac{a}{T}} \qquad \text{(cf. § 1.3 p. 5)}$$

De cela on peut déduire :

$$\ln K_T = \ln C - \frac{a}{T} \longrightarrow \frac{a}{T} = \ln C - \ln K_T$$

$$T = \frac{a}{\ln C - \ln K_T}$$

En passant aux logarithmes décimaux :

$$T = \frac{a\,M}{\log C - \log K_T}$$

avec $M \simeq 0{,}4343$ la constante de conversion des logarithmes népériens en logarithmes décimaux ($\log x = M \ln x$).

Si on pose $P = a\,M$

et $Q = \log C$, il vient

$$(2) \qquad \boxed{T = \frac{P}{Q - \log K_T}}$$

Détermination des constantes

Berthet (1960) a déterminé à partir de températures connues les constantes P et Q :

pour la solution à pH 1,21 :

$$T = \frac{5854}{18{,}99053 - \log K_T}$$

pour la solution à pH 2,92 :

$$T = \frac{5854}{17{,}28778 - \log K_T}$$

Plus généralement, Petrik et Kvet (1976) ont établi, par interpolation, une relation exprimant la constante Q pour un pH variable :

$$Q = -\ 0{,}995742\ pH + 20{,}195348 \qquad (3)$$

N.B. : on retrouve aisément les nombres donnés par Berthet en remplaçant les pH par leur valeur.

En utilisant les formules *(2)* et *(3)*, on peut écrire la relation générale permettant de calculer la température en degrés Celsius :

$$T = \frac{5854}{-\ 0{,}995742\ pH + 20{,}195348 - \ln K_T} - 273{,}2$$

Solution antigel

Pour la solution antigel proposée par Lee (1969) (cf. § 2.2 p.7) les constantes P et Q se trouvent modifiées.

Le calcul effectué par l'auteur pour la solution à pH 2,92 donne les valeurs suivantes :

$$T = \frac{5656{,}3}{19{,}5797 - \log K_T}$$

2.7 Précision de la méthode

La reproductibilité de cette méthode ayant été constatée par les auteurs l'ayant utilisée, la précision dépendrait surtout de la préparation des solutions et des erreurs inhérentes à la manipulation, ce qui n'est pas toujours facile à déceler.

Schmitz (1964) soulève le problème des variations du pH au cours de l'expérience. Pallmann et al. (1940) et Berthet (1960) n'ont pas mentionné ce phénomène. Cependant Lee (1969) avec un pHmètre très précis a mis en évidence des variations de ± 0,002 pH au bout de plusieurs mois. Il estime malgré tout que, dans toutes les conditions, la variation est inférieure à 0,01 unité de pH. Ceci n'est cependant pas complètement négligeable car une telle erreur induit une modification sur le calcul de la température de ± 0,15 °C. Il faut donc apporter une attention particulière

au pH lors de la préparation des solutions.

Jones (1972) recommande aussi de ne préparer qu'une seule solution pour plusieurs séries de mesures, de manière à ce que le pH, α_0 et β_0 soient les mêmes.

Lee (1969) soulève aussi le problème de l'absorbtion de la radiation lumineuse. En effet, si un flacon transparent est exposé directement à la lumière solaire, l'effet d'absorbtion directe peut être suffisamment important pour induire une augmentation de température qui n'est pas caractéristique de l'air ambiant. L'auteur, après avoir effectué une série de mesures, a conclu que la répercussion sur la température de l'effet de la radiation directe était inférieure à 0,1 °C.

Enfin la plupart des auteurs s'accordent à penser que la précision est aussi due à la qualité des dosages polarimétriques et à la précision des appareils.

Dans tous les cas, l'erreur maximale estimée par les auteurs sur un grand nombre de mesures reste relativement faible : ± 0,1 °C (Lee, 1969), ± 0,3 °C (Berthet, 1960 et Pattee, 1978), ± 0,5 °C (Pallmann et al., 1940), ce qui fait que la précision est une des qualités de la méthode.

III. SIGNIFICATION DE LA TEMPERATURE MESUREE

3.1 Signification mathématique

D'après la loi d'Arrhénius on a une relation exponentielle entre la vitesse d'inversion du saccharose et la température :

$$K = C\, e^{-\frac{a}{T}} \qquad \text{(cf. § 1.3 p. 5)}$$

Lorsque la température augmente, la vitesse de réaction augmente de manière non linéaire mais exponentielle.

On peut traduire cette dépendance dans le cas particulier du Q_{10} qui est le rapport des vitesses à 10 °C de différence :

$$Q_{10} = \frac{v_{\theta+10}}{v_\theta} \qquad \text{(cf. annexe p. 47)}$$

Pour le saccharose Q_{10} = 4,8, c'est-à-dire que lorsque la température s'élève de 10 °C, *la vitesse est multipliée par 4,8.*

Cela revient aussi à dire que la quantité de sucre hydrolysé est beaucoup plus importante lorsque l'on s'élève de 10 °C entre 20 °C et 30 °C qu'entre 0 °C et 10 °C par exemple.

Ainsi, lorsqu'il y a des variations, la valeur de la température mesurée par la méthode d'inversion du saccharose diffère de la moyenne arithmétique des températures auxquelles a été soumise la solution. C'est en quelque sorte une "moyenne exponentielle" des différentes températures qui ont régné, les températures élevées étant affectées d'un poids beaucoup plus important que les basses (Berthet, 1960).

Exemple

Berthet (1960) a constaté que si une solution a séjourné durant 10 jours à 10 °C puis 10 jours à 20 °C, la température calculée, sur les 20 jours, est de 16,77 °C alors que la moyenne arithmétique est de 15 °C. Jones (1972) a montré que 15 jours à 10 °C et 15 jours à 20 °C donnent une valeur de 17,9 °C. Pour la même période et avec 5 °C et 25 °C on obtient une valeur de la température de 21 °C.

Comme on le constate, la valeur de la moyenne exponentielle des températures - T_e - s'écarte de la moyenne arithmétique - T_a -, d'autant plus que les écarts de température sont importants.

Pour préciser la signification exacte de la température exponentielle T_e, Lee (1969) a essayé de quantifier les écarts entre T_e et T_a en fonction de l'amplitude des variations de température R_T.

Dans un premier temps, il a choisi d'utiliser une relation sinusoïdale théorique donnant les variations de la température pendant la journée :

$$T = T_a + \frac{R_T}{2} \sin \frac{\pi t}{12}$$

avec T_a température moyenne

R_T différence entre les températures maximales et minimales

t temps en heures.

Il a ainsi pu calculer une série d'écarts théoriques entre la température exponentielle T_e, la moyenne arithmétique T_a et l'amplitude des températures journalières R_T.

Ces valeurs sont figurées dans le tableau ci-dessous :

Amplitude (°C)	Température moyenne T_a		
	10 °C	20 °C	30 °C
0	0,0	0,0	0,0
5	0,3	0,3	0,2
10	1,0	0,9	0,8
15	2,1	1,9	1,7
20	3,5	3,3	3,0
25	5,1	4,8	4,5
30	6,8	6,5	6,1
35	8,6	8,3	7,8

Il résulte de ce tableau que T_e et T_a sont proches lorsque les amplitudes n'excèdent pas 10 °C. Par contre, au delà de cette valeur, l'écart ne fait que s'accroître lorsque l'amplitude augmente. De plus, on constate que la moyenne des températures auxquelles s'effectue la mesure est peu importante par rapport à l'amplitude des variations qui ont lieu.

Lee (1969) s'est aussi attaché à établir des relations empiriques entre T_e et T_a. Pour cela, il a effectué une série de mesures climatiques avec des fioles de saccharose, tout en mesurant parallèlement la température moyenne et les amplitudes journalières.

Il a pu ainsi établir empiriquement par une analyse de régression multiple (5 stations et 12 périodes, soient 60 données) exprimant T_a en fonction de T_e et R_T :

$$\boxed{T_a = 2{,}23326 + 0{,}9731\ T_e - 0{,}2264\ R_T}$$

Avec les mêmes données mais en supposant que R_T ne soit pas connu, il a établi par une régression linéaire simple une relation entre T_e et T_a :

$$T_a = -\ 6{,}6262 + 1{,}1408\ T_e$$

Ces deux formules permettent de calculer la température moyenne théorique T_a lorsque l'on mesure une valeur de T_e, mais elles ne doivent être employées que pour des conditions expérimentales proches de celles de Lee (1969), c'est-à-dire des enregistrements de températures de l'air pendant plusieurs mois.

En fait, ce travail est très intéressant dans la mesure où la majorité des auteurs qui ont utilisé la méthode d'inversion du saccharose l'ont fait pour des mesures climatiques.

3.2 Signification écologique

Russier-Delolme (1972) a montré qu'entre 0 °C et 10 °C la planaire *Dugesia tigrina* survit sans se déplacer, s'alimenter ni se reproduire. Dans cette zone, le niveau précis de la température a donc peu d'importance. Par contre, les taux d'accroissement des populations sont, à 15, 20 et 25 °C, respectivement de X 55, X 118 10^3 et X 673 10^7. Ces phénomènes conduisent donc, du point de vue de l'écologie de cette planaire, à attribuer un moindre poids aux températures basses qu'aux températures élevées et de ce fait à valoriser une moyenne de type température exponentielle T_e par rapport à la moyenne arithmétique T_a.

Dans le même sens, Durand (1969) écrit : << Vers la fin du siècle dernier, une nouvelle idée germa. Pourquoi chercher à assimiler la vitesse de développement à une fonction linéaire de température alors que les plantes sont le siège de réactions chimiques dont la vitesse croît exponentiellement avec la température. La méthode du Q_{10} était née : elle consiste à remplacer la somme des températures journalières diminuées d'un seuil par celle d'un coefficient (Q_{10}) fonction exponentielle de la température... >>.

La réaction d'inversion du saccharose est justement une réaction de type exponentielle (cf. § 3.1 p.12) dont le Q_{10} peut être rapproché de celui des réactions biologiques.

A ce titre, la valeur T_e mesurée par la méthode d'inversion du saccharose peut avoir une signification propre par rapport à des réactions biochimiques qui se dérouleraient pendant le temps de la mesure.

A partir de ces deux exemples, il apparaît que la méthode d'inversion du saccharose, en plus de la mesure d'une température moyenne, est particulièrement adaptée à des évaluations d'échanges thermiques dans les processus biologiques.

Après avoir présenté la méthode de Pallmann et ses utilisations, la seconde partie de ce mémoire sera consacrée à l'application de cette méthode pour effectuer une mesure de température sur les vers de terre in situ.

DEUXIEME PARTIE

EXPERIMENTATION REALISEE

I. MINIATURISATION DE LA METHODE

1.1 Nouveau procédé
1.2 Méthode de dosage
1.3 Calcul de la température
1.4 Description des techniques particulières mises en oeuvre
1.4.1 Préparation des solutions
1.4.2 Fabrication des ampoules
1.4.3 Remplissage
1.4.4 Obturation de l'extrémité
1.4.5 Dosage
1.5 Manipulations réalisées

II. APPLICATION A LA MESURE DE TEMPERATURE CHEZ LES VERS DE TERRE

2.1 Justification
2.2 Description de la manipulation
2.2.1 Choix des animaux
2.2.2 Implantation des ampoules dans le ver
2.2.3 Récupération des ampoules
2.3 Expérimentation au laboratoire
2.4 Expérimentation au terrain
2.4.1 Matériel et méthode
2.4.2 Résultats

EXPERIMENTATION REALISEE

Pour effectuer une mesure de température chez les vers de terre au terrain, l'idée directrice est de placer des microampoules remplies d'une solution de saccharose directement dans le corps des animaux et de les récupérer au bout d'un temps donné pour doser la proportion de sucre hydrolysé.

Le travail effectué se situe sur deux plans distincts ; d'une part, la miniaturisation de la méthode et, d'autre part, sa mise en oeuvre dans le cas particulier des vers de terre.

I. MINIATURISATION DE LA METHODE

Pour réaliser la miniaturisation, il s'est avéré nécessaire d'apporter des modifications à la méthode elle-même et de mettre en oeuvre certaines techniques particulières.

1.1 Nouveau procédé

L'application aux vers de terre impose l'utilisation de microampoules dont la taille se situe aux environs de 2 mm de longueur pour 1 mm de diamètre, soit en volume quelques dixièmes de microlitre. Avec la solution proposée par Berthet à 384 g/l, cela représente une quantité de saccharose dans l'ampoule d'environ 100 microgrammes. Des quantités aussi faibles ne permettent pas d'effectuer des dosages par polarimétrie et, comme il est très difficile de connaître le volume exact de solution dans l'ampoule, j'ai modifié la technique.

Une quantité quelconque de solution de saccharose est mise au départ dans l'ampoule. Lorsque l'ampoule est récupérée, à la fin de l'expérience, la solution se compose de glucose et de fructose provenant de l'hydrolyse, ainsi que du saccharose restant. Le contenu de l'ampoule est alors partagé en deux parties égales :

+ dans la première on dose la quantité de glucose présent, qui est égale en molarité à la quantité de saccharose hydrolysé pendant l'expérience,

+ dans la seconde, on introduit une enzyme qui hydrolyse complète-

ment le saccharose restant en glucose et fructose. La quantité totale de glucose est alors dosée. Celle-ci est égale en molarité à la quantité totale de saccharose de l'échantillon puisque le glucose total provient d'une part du saccharose hydrolysé pendant l'expérience et d'autre part du saccharose restant, hydrolysé complètement par voie enzymatique.

Le premier dosage fournit donc la quantité de saccharose inverti et le second la quantité de saccharose total. On peut ainsi en déduire le pourcentage de sucre hydrolysé.

1.2 Méthode de dosage

Pour des quantités de sucre à doser aussi faibles, le dosage enzymatique s'est avéré être le plus précis. La méthode choisie est utilisée par les laboratoires Boehringer Mannheim (Anonyme, 1977-78) pour des dosages alimentaires de précision.

Il y a, comme nous l'avons vu ci-dessus, deux opérations distinctes : l'hydrolyse totale du saccharose et le dosage du glucose.

a) hydrolyse enzymatique

Le saccharose est hydrolysé à pH = 4,6 par la β-fructosidase

$$\text{Saccharose} + H_2O \xrightarrow{\beta\text{-fructosidase}} \text{Glucose} + \text{Fructose}$$

Pour les quantités que nous employons, la réaction totale s'effectue à 20 °C en moins de 15 minutes.

b) dosage du glucose

Seul, le principe est évoqué dans ce paragraphe, la manipulation pratique est décrite en annexe p. 48.

L'hexokinase (HK) catalyse la phosphorylation du glucose par l'adénosine-5-triphosphate (ATP) à pH = 7,6.

Dans une réaction catalysée par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6P DH), le glucose-6-phosphate formé (G6P) est oxydé spécifiquement en présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP)

en gluconate-6-phosphate avec formation de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit (NADPH).

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{G6P} + \text{ADP}$$

$$\text{G6P} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{Gluconate-6-phosphate} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

La formation de NADPH est mesurée au spectrophotomètre par l'augmentation de l'extinction à la longueur d'onde de 340 nm ; elle est proportionnelle à la quantité de glucose.

1.3 Calcul de la température

Par la méthode de dosage utilisée, on calcule la concentration en saccharose de départ, A, et la concentration en saccharose après inversion partielle, A - x.

On peut donc obtenir la constante de vitesse directement par la formule générale :

$$K_T = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A - x} \qquad \text{(cf. § 1.2 p. 3)}$$

De plus, les concentrations s'expriment en fonction des densités optiques (cf. annexe p. 43)

$$A = \frac{\Delta E_S}{\varepsilon\, d} \qquad \text{et} \qquad x = \frac{\Delta E_G}{\varepsilon\, d}$$

Avec ε : coefficient d'extinction du NADP à 340 nm,

d : épaisseur de la cuve,

ΔE_S : différence de densité optique observée pour l'essai saccharose,

ΔE_G : différence de densité optique observée pour l'essai glucose.

En reportant alors l'expression de la constante de vitesse, on obtient :

$$K_T = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A - x} = \frac{1}{t} \log \frac{1}{1 - \frac{x}{A}} = \frac{1}{t} \log \frac{1}{1 - \frac{\Delta E_G \cdot \varepsilon \cdot d}{\Delta E_S \cdot \varepsilon \cdot d}} = \frac{1}{t} \log \frac{1}{1 - \frac{\Delta E_G}{\Delta E_S}}$$

La température est ensuite calculée par la formule :

$$T = \frac{P}{Q - \log K_T} \qquad \text{(cf. § 2.6 p. 10)}$$

c'est-à-dire :

$$T = \frac{P}{Q - \log\left[\frac{1}{t}\log\frac{1}{1 - \frac{\Delta E_G}{\Delta E_S}}\right]}$$

Le calcul se trouve simplifié dans la mesure où la température s'exprime directement en fonction des différences de densité optique observées.

1.4 Description des techniques particulières mises en oeuvre

1.4.1 PREPARATION DES SOLUTIONS

J'utilise les solutions de saccharose tamponnées telles que Berthet (1960) les a décrites (cf. § 2.2 p. 6).

Cependant, il est impossible d'utiliser le formol comme antiseptique car il dénature les protéines et donc perturbe le dosage enzymatique. J'ai donc utilisé un autre antiseptique : le toluène qui est cité par Durand (1965) comme étant employé pour le traitement des sols tout en ne dénaturant pas les enzymes.

En outre, pour réduire au minimum les risques de contamination, la solution est stérilisée au moment du remplissage des ampoules, par filtration sur membrane 0,45 et 0,2 µm. De plus, les manipulations sont réalisées sous hotte stérile à flux laminaire.

On vérifie que le toluène n'a pas d'action sur le dosage enzymatique : on prépare une solution de saccharose pur à 0,5 g/l d'eau distillée et contenant du toluène à la concentration de 3 ml/l. Le dosage enzymatique effectué ensuite permet bien de retrouver la concentration initiale de 0,5 g/l.

1.4.2 FABRICATION DES AMPOULES

On utilise un tube de verre de 8 mm de diamètre étiré à la flamme pour obtenir un tube capillaire d'environ 1 mm de diamètre. A l'extrémité de ce dernier et en soufflant délicatement le verre, on façonne une ampoule dont une extrémité est scellée à la flamme, l'autre étant laissée ouverte pour le remplissage.

1.4.3 REMPLISSAGE

La très petite dimension de l'orifice à l'extrémité des ampoules empêche l'air de sortir et donc la pénétration du liquide. L'essai de plusieurs techniques a abouti à la solution suivante :

Les ampoules vides sont placées dans un petit flacon en verre (20 ml). L'ensemble est stérilisé à l'autoclave. Sous une hotte stérile à flux laminaire, on réalise le vide dans le flacon (650 mm de mercure), à l'aide d'une trompe à eau. Le liquide est ensuite injecté après filtration en piquant à travers le bouchon en caoutchouc qui obture le flacon. La dépression à l'intérieur du flacon et des ampoules suffit à les remplir complètement lorsque l'on introduit le liquide.

1.4.4 OBTURATION DE L'EXTREMITE

La faible dimension de l'ampoule ne permet pas de la sceller à la flamme. En effet, l'élévation de température entraîne une hydrolyse, non souhaitée, de saccharose.

Après plusieurs essais, j'ai retenu l'utilisation d'un bouchon constitué de mastic silicone Rubson qui s'est avéré être le plus satisfaisant car il présente des propriétés particulièrement bien adaptées à notre problème.

C'est un mastic qui se vulcanise spontanément grâce à l'humidité de l'air ambiant et qui se transforme en une masse élastique ferme présentant une très bonne adhérence sur le verre. Les caractéristiques techniques fournies par le fabricant (Anonyme, 1979) montrent que la vitesse de vulcanisation est fonction de l'humidité, de la température et de l'épaisseur du joint. Dans notre cas, pour une température proche de 0 °C, le temps de vulcanisation est de l'ordre de 5 heures.

Après obturation, les ampoules sont déposées délicatement sur de l'eau, ce qui présente plusieurs avantages :

+ *elles flottent à la surface à condition de bien les sécher au préalable,*

+ elles ne sont pas en contact avec un autre corps solide auquel le mastic adhérerait,

+ le mastic se vulcanise plus rapidement à l'humidité.

L'ensemble est ensuite placé au réfrigérateur à 4 °C pendant quelques heures pour la vulcanisation.

1.4.5 DOSAGE

Après utilisation, les ampoules sont récupérées et conservées au réfrigérateur à 4 °C ou dans la glace fondante (0 °C) jusqu'au moment du dosage de leur contenu.

a) préparation de l'échantillon

L'ampoule est extérieurement nettoyée avec de l'eau distillée, séchée avec du papier Joseph et placée au fond d'un petit tube en verre.

L'ampoule est cassée à l'aide d'un petit agitateur en verre qui est ensuite rincé 3 fois à l'eau distillée (500 µl + 500 µl + 200 µl).

Le contenu de l'ampoule et les débris de verre se trouvent ainsi dans le tube avec 1,2 ml d'eau : ceci constitue l'échantillon à doser.

b) utilisation des ultrasons

L'échantillon est passé dans un bac à ultrasons rempli d'eau à 0 °C pendant une minute pour homogénéiser la solution et surtout pour libérer tous les sucres qui seraient adhérents aux débris de verre.

Pour vérifier que les ultrasons n'entraînent pas une inversion supplémentaire du saccharose par échauffement de l'échantillon, on effectue un dosage sur une solution acide de saccharose de titre connu (0,5 g/l) après passage 1 minute et 30 secondes aux ultrasons. On retrouve très exactement le titre de la solution et on confirme ce résultat en vérifiant qu'il n'est pas apparu de glucose.

c) dosage proprement dit

Celui-ci s'effectue normalement suivant la méthode décrite précédemment et les différences de densite optique lues permettent de calculer la température T_e (cf. § 1.3 p.20).

1.5 Manipulations réalisées

Avant l'application au dosage des micro-ampoules, la précision et reproductibilité de la méthode ont été vérifiées en effectuant une série de manipulations préliminaires.

a) précision du dosage

On utilise une solution de saccharose à 0,5 g/l d'eau distillée avec laquelle on effectue 2 dosages de saccharose.

Dosages	E_{1S}	E_{2S}	ΔE_S	Concentration calculée	Erreur relative
1er dosage 0,5 g/l	0,037	0,330	0,293	0,4999	0,02 %
2ème dosage 0,5 g/l	0,035	0,323	0,288	0,4914	1,7 %

Il apparaît que les erreurs relatives sont 0,02 % et 1,7 %, ce qui est essentiellement dû aux incertitudes de lecture au spectrophotomètre. On peut, en effet, estimer l'erreur maximale de lecture à 0,005 unités de D.O. ce qui représente en concentration ± 0,008 g/l.

La solution à 0,5 g/l est ensuite mélangée avec la solution tampon proposée par Berthet (cf.§ 2.2 p.6) à part égale en ajustant le pH à 1,21.

Un échantillon est placé au bain-marie à 52 °C pendant 2 H. Le résultat du dosage montre que tout le saccharose a été hydrolysé à une telle température.

Un autre échantillon est alors placé à une température infé-

rieure (42 °C) et 3 prélèvements sont effectués au cours du temps. On calcule la température correspondante par la formule de Berthet.

	E_{1G}	E_{2G}	ΔE_G	E_{1S}	E_{2S}	ΔE_S	T °C
1/2 H à 42 °C	0,028	0,043	0,015	0,030	0,178	0,148	41,01
1 H à 42 °C	0,026	0,070	0,044	0,016	0,171	0,155	44,30
2 H 30 à 42 °C	0,043	0,084	0,061	0,035	0,183	0,148	41,58

On remarque que l'on trouve l'ordre de grandeur pour la valeur de la température mais qu'il y a cependant des écarts importants (maximum 2,3 °C). Cela peut s'expliquer du fait que les constantes utilisées pour le calcul de la température sont adaptées à une situation sensiblement différente. La température est en général plus faible et le temps beaucoup plus long (par exemple 15 °C pendant 10 jours).

De plus, comme il s'agit d'une manipulation préliminaire, le temps n'a pas été mesuré avec précision. Or, du fait des variations exponentielles, la réaction est beaucoup plus rapide à 42 °C qu'à 15 °C et l'imprécision sur le temps a des conséquences non négligeables sur la température. En effet, le calcul montre qu'en remplaçant, pour l'échantillon N° 2, le temps d'1 heure par celui d'1 heure et 5 minutes, on obtient une température calculée de 43,7 °C soit une différence de 0,6 °C.

b) application aux micro-ampoules

Pour mettre réellement en pratique les dosages avec les micro-ampoules, j'en ai placé 5 à l'étuve à 15 °C pendant 7 jours. Des problèmes de manipulation n'ont permis de doser que 3 ampoules.

Ampoules 15°C ; 6 jours	E_{1G}	E_{2G}	ΔE_G	E_{1S}	E_{2S}	ΔE_S	T °C	Q µg
Ampoule 1	0,070	0,454	0,384	0,076	0,880	0,804	15,11	137
Ampoule 2	0,080	0,360	0,280	0,074	0,704	0,630	14,50	107,5
Ampoule 3	0,080	0,110	≃ 0	0,083	0,120	≃ 0	-	0

On voit que la troisième ampoule donne une différence de D.O négligeable aussi bien pour le glucose que pour le saccharose, ce qui lais-

se supposer que le joint n'était pas étanche et que l'ampoule s'était vidée de son contenu. Pour les 2 autres ampoules, les erreurs sont de 0,12 et 0,5 °C, ce qui représente une erreur relative maximale de 3,3 %. Bien que les résultats soient satisfaisants, ils ne permettent cependant pas d'estimer la précision de la méthode car le nombre de données n'est pas suffisant.

Enfin à titre indicatif, nous pouvons calculer approximativement les quantités de saccharose contenues au départ dans chacune des ampoules : 137 µg et 108 µg. Connaissant la concentration de départ (384 g/l), il est possible de déduire le volume du contenu de chacune des ampoules : 0,36 µl et 0,28 µl.

II. APPLICATION A LA MESURE DE TEMPERATURE CHEZ LES VERS DE TERRE

2.1 Justification

Les vers de terre ont une importance agronomique reconnue de longue date. Leur activité dans le sol est dépendante des facteurs abiotiques du milieu et la température joue un rôle particulièrement important puisque ce sont des animaux poïkilothermes.

Une mesure de température chez les vers de terre in situ, par la méthode d'inversion du saccharose, présente plusieurs intérêts car elle permet de connaître au terrain les températures réellement subies par l'animal.

Une telle mesure peut aussi être effectuée pour connaître la position moyenne des vers de terre dans le sol en comparant avec des sondes de température placées à différentes profondeurs. En outre, la connaissance de la température est un des facteurs nécessaires à l'étude de l'activité physiologique et de la multiplication de la microflore de l'endentère (définition in Bouché, 1974). Enfin, il est possible d'effectuer la même mesure aussi bien au laboratoire qu'au terrain.

Certains auteurs ont étudié les preferendums de températures des différentes espèces de lombriciens. Wolf (1938) a observé les thermotropismes et les réactions de fuite des vers de terre par immersion des animaux dans des bacs d'eau à différentes températures.

Hopp (1948) a mis des vers de terre en boîtes d'élevage à différentes températures et a mesuré les variations de poids en fonction de la température.

Khalaf el Duweini et Ghabbour (1965), Reinecke et Ryke (1972) ont utilisé des appareils basés sur un principe commun et permettant de créer sur une bande de sol un gradient de température. Ils ont effectué des comptages par tranche de sol.

Toutes ces mesures, effectuées au laboratoire par des méthodes indirectes donnent les valeurs des preferendums de température des vers de terre mais ne permettent pas de connaître les températures réellement subies par les animaux au terrain en fonction de leurs déplacements et des variations climatiques.

2.2 Description de la manipulation

2.2.1 CHOIX DES ANIMAUX

Nous avons choisi les *Nicodrilus* anéciques (anéciques : voir Bouché, 1972) car la station de recherche sur la faune du sol de l'I.N.R.A. de Dijon réalise une étude stationnelle de la prairie permanente de Cîteaux (Côte-d'Or), dans laquelle 81,2 % de la biomasse lombricienne est représentée par des anéciques, essentiellement *Nicodrilus longus* (Ude) et *Nicodrilus nocturnus* var. *cistercianus*, Bouché (Bouché, 1975 ; 1976).

2.2.2 IMPLANTATION DES AMPOULES DANS LE VER

a) anesthésie

Nous avons choisi d'utiliser la chlorétone (= acétone chloroforme = trichloro-1,1,1-méthyl-2-propanol-2 = $C_4H_7Cl_3O$), mentionnée par Saussey (1966) pour ses qualités supérieures à celles des autres anesthésiants précédemment utilisés comme l'éther ou le chloroforme. Elle assure, au bout de 15 à 20 minutes, une parfaite immobilité des vers de terre et un relâchement convenable des fibres musculaires.

La chlorétone en poudre est placée dans un petit sac en tissu plongé dans de l'eau contenant les animaux à endormir. Le produit se libère progressivement dans le milieu et les cristaux de chlorétone

ne peuvent ainsi pas léser les animaux par contact.

b) emplacement

L'organisation morphologique des lombriciens s'est constituée autour de la continuité sélective de vie en galeries (ou pholéoïptomie) dont la silhouette vermiforme est la conséquence la plus visible.

D'une façon générale, le contenu des vers est rempli d'organes et l'introduction d'une ampoule, même petite, peut entraîner, outre le choc opératoire, des conséquences physiologiques modifiant le comportement du ver, c'est-à-dire allant à l'encontre du but visé.

Il faut donc introduire l'ampoule de manière à ce que d'une part, l'animal ne s'en débarasse pas et, d'autre part, il ne subisse que les conséquences minimes de la présence de ce corps étranger.

Les parties centrale et caudale sont remplies par un intestin à la paroi fragile et par ailleurs, elles sont susceptibles distalement d'autotomie. La zone des segments 15-19 est remplie d'un jabot-gésier dont les fonctions seraient perturbées par l'ampoule. La zone des segments 1-10 contient des muscles dissépimentaires puissants, assurant notamment le travail d'affouillement du sol et l'ingestion.

Reste la zone 11-14 qui est traversée par un tube digestif étroit et peu dilatable car les parois sont glandulaires et rigides (glande de Morren calcigène). Cette zone a donc une cavité coelomique importante, occupée essentiellement sur la face dorsale par des vésicules séminales servant au stockage des produits séminaux mâles. Les vésicules sont par ailleurs souvent parasitées par des grégarines ou regressées (immatures ou repos sexuel).

L'occupation de cet espace semble donc avoir des inconvénients réduits qui, sans léser la physiologie sexuelle, touchent au plus le pouvoir reproductif de l'individu.

c) opération

L'animal anesthésié est maintenu, face dorsale vers le haut, sur la planche à dissection par deux petites bandelettes élas-

tiques placées transversalement de part et d'autre de la zone 13-14 afin de tendre légèrement les tissus.

Au niveau de l'intersegment 13-14, on glisse dans le pore dorsal l'extrémité recourbée d'une petite épingle de type "minutie" avec laquelle on pratique une légère incision.

L'orifice ainsi agrandi permet de glisser l'ampoule dans la cavité coelomique,latéralement pour éviter de léser le vaisseau dorsal.

Lorsque l'on enlève les bandelettes élastiques, les tissus se distendent et l'orifice se referme en emprisonnant l'ampoule.

Les animaux sont plongés dans l'eau froide et ils reprennent leurs mouvements au bout de quelques minutes. Ils sont ensuite placés en boîtes d'élevage.

2.2.3 RECUPERATION DES AMPOULES

Les vers de terre sont anesthésiés comme précédemment. On récupère l'ampoule par dissection dorsale au niveau des segments 13-14. Elle est ensuite rincée et conservée au froid jusqu'au moment du dosage.

2.3 Expérimentation au laboratoire

Les premières manipulations sur vers de terre ont été effectuées avec des ampoules vides, afin de mettre au point les techniques d'implantation et d'extraction de l'ampoule. Ces techniques requièrent l'acquisition d'une certaine dextérité pour être valablement pratiquées.

Des ampoules sont implantées dans 6 vers de terre qui sont ensuite placés en boîte d'élevage. Dès le lendemain, la présence de galeries et la consommation de litière attestent leur activité et, au bout d'une semaine, la cicatrisation apparaît comme complète.

L'opération des 6 animaux au bout de 12 jours n'a permis de récupérer que 5 ampoules ; la sixième ayant pu être expulsée du corps de l'animal par la plaie encore ouverte. Pour éviter autant que possible que cela se produise, on pratique dans le corps de l'ani-

mal l'incision la plus petite possible quitte à forcer l'entrée pour introduire l'ampoule.

Une expérimentation sur les vers de terre a été effectuée au laboratoire sur 8 animaux en suivant l'ensemble des méthodes précédemment décrites.

La boîte d'élevage, contenant du sol, a séjourné 11 jours et 2 heures à environ 10 °C dans une chambre d'élevage. Les 8 ampoules ont été récupérées mais, à la suite de maladresses tenant à la difficulté et à la minutie des manipulations, 5 seulement ont pu être dosées. En outre, 3 tubes contenant 4 ml de la même solution de saccharose ont été placés dans la boîte, à la surface, à 5 cm et à 8 cm de profondeur.

Enfin, à l'issue de l'ensemble des manipulations précédant l'implantation dans les vers de terre, nous avons effectué un témoin. Le temps était d'environ 24 heures.

RESULTATS (solution à pH = 1,21 ; t = 11,08 jours)

	E_{1G}	E_{2G}	ΔE_G	E_{1S}	E_{2S}	ΔE_S	T_e °C	Moyenne
Témoin	0,040	0,040	0	0,036	0,475	0,419	0	
Surface	0,041	0,208	0,167	0,045	0,455	0,410	10,09	9,75 °C
- 5 cm	0,047	0,128	0,081	0,036	0,255	0,219	9,35	
- 8 cm	0,038	0,200	0,162	0,038	0,450	0,412	9,82	
Ampoule 1	0,036	0,076	0,040	0,040	0,149	0,109	9,30	9,81 °C
Ampoule 2	0,074	0,287	0,209	0,074	0,595	0,521	9,97	
Ampoule 3	0,043	0,230	0,187	0,040	0,490	0,450	10,25	
Ampoule 4	0,039	0,150	0,111	0,037	0,310	0,273	10,07	
Ampoule 5	0,038	0,162	0,124	0,040	0,370	0,330	9,47	

ELEMENTS D'INTERPRETATION

Témoin : On constate que le taux d'inversion est nul, c'est-à-dire que pour l'ensemble des manipulations préliminaires (remplissage, obturation, vulcanisation et implantation dans l'animal) la conservation au réfrigérateur (4 °C) et dans la glace fondante (0 °C) est satisfaisante.

Températures du sol : (les 3 dosages ont été faits sur des tubes contenant 4 ml de solution de saccharose, ils sont donc plus précis). C'est à la surface que la température est la plus élevée et ceci s'explique par le fait que de l'air humide est insufflé dans la boîte et lorsqu'il entre, il est à une température légèrement supérieure à 10 °C.

Le flacon situé à - 8 cm se trouvait au fond, contre la paroi et il a certainement été sensible à des variations de température de l'air ambiant qui ont pu se produire au cours des 11 jours, variations inhérentes au système de réfrigération, ou accidentelles (ouverture de la case).

Enfin le tube placé au centre (- 5cm) fournit la température la plus basse car l'inertie thermique du sol a suffit pour l'isoler des éventuelles variations extérieures.

Ampoules : on voit que les 5 dosages fournissent des valeurs de température cohérentes, s'écartant au maximum de 0,5 °C de la moyenne des 3 températures enregistrées dans le sol.

Il n'est pas possible actuellement d'interpréter les températures individuellement car on ne connait pas suffisamment la précision de la méthode pour pouvoir dire si les écarts sont significatifs. On peut cependant remarquer que la moyenne des températures des 5 vers de terre est très proche de la moyenne des températures du sol (9,81 °C pour 9,75 °C).

2.4 *Expérimentation au terrain*

2.4.1 MATERIEL ET METHODE

Une mesure écologique de température au terrain et en modifiant le moins possible le milieu nécessite l'utilisation de techniques particulières :

Les animaux sont capturés en prairie, amenés au labora-

toire puis colorés. Ils sont anesthésiés, opérés pour implanter une microampoule de saccharose. Ils sont relâchés au terrain et on récupère la microampoule dont on dose le contenu.

Pendant le temps de l'expérience, la température du sol est enregistrée à l'aide d'un thermographe à sonde. Les 4 sondes sont placées en surface, à - 10 cm, à - 20 cm et à - 50 cm.

a) lieu

La manipulation s'effectue sur une prairie de l'abbaye de Cîteaux (21) sur laquelle la station de faune du sol de l'I.N.R.A. expérimente depuis plusieurs années et dont la population de lombriciens est bien connue.

Des bacs métalliques de 0,5 m x 0,5 m de surface et de 0,5 m de profondeur ont été placés dans la prairie à l'automne 1979. Ce dispositif évite en grande partie le déplacement latéral des animaux.

b) capture

Quelques semaines avant le début de l'expérience, on capture des animaux en provoquant des vibrations à l'aide d'une bêche sur les bords des bacs. Transmises par le métal, les vibrations font sortir quelques vers de terre. On reproduit plusieurs fois cette manipulation à quelques jours d'intervalle, pour obtenir 4 Nicodrilus adultes par bac. Si le résultat n'est pas atteint, on complète par des vers de terre pris à la bêche autour des bacs métalliques. Les animaux sont conservés en élevage (10 °C) jusqu'à la coloration.

c) coloration (Mazaud, 1979)

+ Anesthésie à l'acétone chloroforme.
+ Colorants utilisés : vert menthe E et rouge E 124.

Les animaux sont préséchés sur papier filtre puis trempés dans le colorant (1 à 3 minutes selon leur taille). Ils sont séchés sur papier filtre jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de trace lorsque le ver bouge.

Ils sont ensuite mis en élevage (10 °C) pendant quelques jours pour qu'ils se rétablissent de l'anesthésie et l'on vérifie que la coloration a bien pris.

d) implantation des microampoules

Elle s'effectue de la manière décrite précédemment (§ 2.2.2 p. 27) et les vers de terre sont mis 24 H en élevage avant la mise au terrain.

N.B. : on note à quelles températures et pendant combien de temps les ampoules sont soumises depuis la fabrication jusqu'à la mise au terrain. En effet, les manipulations préliminaires provoquent une légère hydrolyse du saccharose dont on doit tenir compte au moment du calcul de la température.

e) mise au terrain

Les vers de terre sont déposés sur la prairie à l'intérieur des bacs et l'on vérifie qu'ils pénètrent dans le sol.

f) recapture

Les bacs métalliques sont arrachés totalement et l'on effectue un tri systématique de leur contenu pour retrouver les vers de terre colorés.

Ceux-ci, ramenés au laboratoire, sont anesthésiés, disséqués et l'on récupère les microampoules que l'on stocke au froid avant le dosage qui s'effectue comme décrit au § 1.2 p. 19.

2.4.2 RESULTATS

a) température du sol

A partir des relevés hebdomadaires, on calcule les températures moyennes journalières ainsi que la moyenne arithmétique pour les quatre périodes du 8/5 au 20/5, du 20/5 au 28/5, du 28/5 au 2/6 et du 2/6 au 9/6.

DATE	SURFACE				- 10 cm				- 20 cm				- 50 cm			
	Max	Min	$\bar{x}$	$\bar{X}$	Max	Min	$\bar{x}$	$\bar{X}$	Max	Min	$\bar{x}$	$\bar{X}$	Max	Min	$\bar{x}$	$\bar{X}$
8 - 5	16	12	14		14	11,5	12,75		12	10,5	11,25		11	9	10	
9 - 5	12	10,5	11,25		11,5	10	10,75		10,5	9,5	10		11	9	10	
10 - 5	17	9,5	13,25		14	9,5	11,75		12	9	10,5		11	9	10	
11 - 5	20	8	14		15,5	9,5	12,5		12,5	9	10,75		11	9	10	
12 - 5	21	9	15		16	10,5	13,25		15,5	9,5	12,5		11	9	10	
13 - 5	21	10	15,5		16	11,5	13,75		13	10	11,5		11	9	10	
14 - 5	20	13	16,5		16,5	12,5	14,5		14	11	12,5		11	9	10	
15 - 5	20	12	16	14,50	16,5	12,5	14,5	13	14	11,5	12,75	11,5	12	10	11	10,5
16 - 5	19	10	14,5		15,5	11,5	13,5		13,5	11	12,25		12	10	11	
17 - 5	20	8	14		15,5	10,5	13		13	10	11,5		12	10	11	
18 - 5	19	9	14		15	10,5	12,75		13	10	11,5		12	10	11	
19 - 5	20	9	14,5		16	11	13,5		13,5	10	11,75		12	10	11	
20 - 5	21,5	8,5	15		16,5	10,5	13,5		14	10	12		12	10	11	
21 - 5	17	11	14		14,5	12	13,25		13	11	12		12	10	11	
22 - 5	20,5	12	16,25		16	12	14		13,5	11	12,25		12	10,5	11,25	
23 - 5	21,5	12	16,75		17	12	14,5		14	11	12,5		12	10,5	11,25	
24 - 5	21	10,5	15,75		16,5	12	14,25		14	11	12,5		12	10,5	11,25	
25 - 5	21	10	15,5	15,75	17	11	14	14,25	14	11	12,5	12,5	12	10,5	11,25	11,25
26 - 5	20,5	9	14,75		17	11	14		14	10,5	12,25		12	11	11,5	
27 - 5	20	11,5	15,75		16	13,5	14,75		14	11,5	12,75		12	11	11,5	
28 - 5	20,5	13,5	17		16,5	13	14,75		14,5	12	13,25		12	11	11,5	
29 - 5	18	14	16		15,5	13	14,25		14	12,5	13,25		12	11	11,5	
30 - 5	18	11,5	14,75		15	12	13,5		14	11,5	12,75		12	11	11,5	
31 - 5	14,5	10,5	12,5	14,5	12,5	11	11,75	13	12	10,5	11,25	12,5	11	10	10,5	11
1 - 6	16,5	12	14,25		13	11	12		12,5	10,5	11,5		11	10	10,5	
2 - 6	19	11,5	15,25		16	11	13,5		13,5	11	12,25		12	10	11	
3 - 6	20	11,5	15,75		16,5	12	14,25		14	11	12,5		12	10,5	11,25	
4 - 6	24	12,5	18,25		18	13	15,5		15,5	12	13,75		12	11	11,5	
5 - 6	24,5	13,5	19		19,5	13,5	16,5		16,5	13	14,75		13	12	12,5	
6 - 6	24	14	19	18	19	14,5	16,75	16	16,5	14	15,25	14,5	14	13	13,5	12,75
7 - 6	21	16	18,5		18	15,5	16,75		16	14,5	15,25		14	13	13,5	
8 - 6	20,5	14	17,25		17,5	14,5	16		15,5	14	14,75		14	13	13,5	
9 - 6	22	15	18,5		18,5	15	16,75		16	14	15		14	13	13,5	

b) température des vers de terre

L'expérience a porté sur 16 animaux répartis en 4 bacs, soit 4 animaux par bac.

La mise au terrain a eu lieu le 8 mai 1980 à 10 H et les captures les 20 mai à 16 H, 28 mai à 10 H, 2 juin à 11 H et 9 juin à 11 H.

Pour différentes causes (animaux ayant franchi le bac, mortalité, prédatisme, etc.), tous les animaux n'ont pas été retrouvés et le nombre d'ampoules dosées a été réduit à :

- 4 le 20/5
- 2 le 28/5
- 3 le 2/6
- 3 le 9/6

soit 12 ampoules au total.

Echantillon	Mise au terrain	Récupération	Temps en jours	E_{1G}	E_{2G}	ΔE_G	E_{1S}	E_{2S}	ΔE_S	T °C
Ampoule 1	8/5 à 10 H	20/5 à 16 H	12,25	0,037	0,903	0,866	0,057	1,262	1,205	14,11
Ampoule 2	8/5 à 10 H	20/5 à 16 H	12,25	-	-	-	-	-	-	-
Ampoule 3	8/5 à 10 H	20/5 à 16 H	12,25	0,024	0,255	0,231	0,046	0,410	0,364	12,71
Ampoule 4	8/5 à 10 H	20/5 à 16 H	12,25	0,067	0,560	0,493	0,060	0,863	0,803	12,37
Ampoule 5	8/5 à 10 H	28/5 à 16 H	20,25	0,050	0,144	0,094	0,055	0,167	0,112	13,15
Ampoule 6	8/5 à 10 H	28/5 à 16 H	20,25	0,040	0,870	0,830	0,054	1,145	1,091	11,76
Ampoule 7	8/5 à 10 H	2/6 à 11 H	25,04	-	-	-	-	-	-	-
Ampoule 8	8/5 à 10 H	2/6 à 11 H	25,04	0,074	0,637	0,563	0,070	0,685	0,615	13,42
Ampoule 9	8/5 à 10 H	2/6 à 11 H	25,04	0,059	0,426	0,367	0,062	0,450	0,388	14,18
Ampoule 10	8/5 à 10 H	9/6 à 11 H	32,21	0,056	0,815	0,759	0,010	0,078	0,766	14,08
Ampoule 11	8/5 à 10 H	9/6 à 11 H	32,21	0,060	0,252	0,192	0,058	0,275	0,217	11,23
Ampoule 12	8/5 à 10 H	9/6 à 11 H	32,21	0,048	0,486	0,438	0,056	0,510	0,454	13,18

Les ampoules 2 et 7 n'ont pas donné de résultat lors du dosage ; on peut supposer qu'elles se sont vidées de leur contenu en cours d'expérience.

Dans le calcul de la température, il est tenu compte de la part d'hydrolyse due aux manipulations annexes ; le détail de ce calcul est décrit en annexe p. 53.

Les températures sont calculées avec une incertitude estimée à 0,5 °C, soit 0,25 °C de part et d'autre de la valeur calculée.

INTERPRETATION

Si l'on compare les températures entre elles, on constate qu'elles sont relativement dispersées entre les individus (2 °C pour une même période). Cependant, d'une période à l'autre les écarts ne sont pas significatifs.

En comparant avec les températures du sol, il n'est pas possible de conclure quant à la position des animaux car les écarts observés d'un animal à l'autre sont en moyenne comparables avec les écarts de température dans le sol.

On peut cependant donner quelques éléments d'interprétation, sachant que l'expérience a eu lieu à la fin du printemps, période transitoire d'entrée en diapause des animaux :

- Pendant les trois premières périodes, le temps était maussade avec des températures peu élevées et des précipitations suffisantes pour que les *Nicodrilus* ne soient pas encore tout à fait en diapause. Aux trois captures, on a retrouvé des animaux encore actifs et proches de la surface. Les températures observées sont compatibles avec le déplacement des animaux à tous les niveaux.
- A la dernière période, il y a eu un réchauffement sensible (18 °C de moyenne en surface) et le 9 juin, on a constaté que les *Nicodrilus* capturés étaient en quiescence à environ 35 cm de profondeur. Les températures de ces animaux sont alors significativement inférieures à la température du sol en surface, ce qui s'explique par le fait qu'ils soient restés en profondeur.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Le travail effectué aboutit à la mise au point d'une méthode miniaturisée permettant de mesurer la somme des températures subies par un ver de terre dans son milieu pendant un temps donné. L'application au terrain a permis essentiellement la mise au point de la méthode et les résultats ne sont pas suffisants pour être valablement interprétés dans le cadre de l'écologie prairiale.

Il apparaît donc intéressant d'effectuer ces mesures systématiquement sur plusieurs périodes de l'année afin de voir l'évolution en fonction des saisons et des périodes d'activité des lombriciens.

Cette technique présente en outre un caractère plus général puisqu'elle peut éventuellement être appliquée à d'autres animaux.

Améliorations envisageables

La précision de la méthode miniaturisée peut être évaluée en effectuant plusieurs mesures avec des micro-ampoules placées à différentes températures constantes.

Il est aussi envisageable d'augmenter la concentration en saccharose de la solution afin que la quantité contenue dans l'ampoule soit plus importante, ce qui augmente la précision du dosage. De même, on peut choisir une solution à pH plus acide ou plus basique pour réaliser dans les conditions naturelles une mesure sur un temps déterminé.

Extension de la notion de température

Au terrain, la température T_e calculée après détermination du taux d'hydrolyse du saccharose peut être rapprochée de la moyenne arithmétique des températures, si l'on connait l'amplitude des variations thermiques au cours de l'expérience. Les auteurs ont utilisé cette méthode essentiellement à cause de sa facilité d'emploi et le fait de calculer une va-

leur de température correspond au besoin d'avoir une estimation de la température moyenne.

Cependant, il est possible d'aller au-delà de cette notion :

Pour évoluer, la réaction reçoit une certaine quantité de chaleur et la constante de vitesse que l'on calcule traduit l'intégration des températures reçues. Il est donc possible de la considérer comme un "indice saccharose" qui mesure le taux d'évolution d'une réaction biochimique de Q_{10} connu, en milieu acide tamponné, pendant un temps donné. Ceci permet d'envisager de relier les différentes réactions du métabolisme ayant un Q_{10} connu avec l'hydrolyse du saccharose.

Il s'avère ainsi intéressant de comparer les "indices saccharose" pour une même solution pendant le même temps, pour évaluer les échanges thermiques qui ont lieu et dépasser la notion de température moyenne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANONYME, 1977/1978 - Guide Boehringer Mannheim. Methods of enzymatic food analysis. Ed. Boehringer, Meylan.

ANONYME, 1979 - Guide Rubson. Comment vaincre l'eau et l'humidité. Ed. Rubson, Rueil-Malmaison, 1-155.

ADU, S.V., 1968 - Studies of land capability assessment for Scots Pine in Strathdon. Ph. D. thesis, University of Aberdeen (cité in Jones, 1972).

BERTHET, P., 1960 - La mesure écologique de la température par détermination de la vitesse d'inversion du saccharose. Vegetatio, 9, 3, 197-207.

BOUCHE, M.B., 1972 - Lombriciens de France. Ecologie et systématique. Ed. I.N.R.A., Ann. zool. - écol. anim., numéro spécial, 72 - 2, 1-671.

BOUCHE, M.B., 1975 - Fonctions des lombriciens. III. Premières estimations quantitatives des stations françaises du P.B.I., coll. biologie du sol, Montpellier, 27 mai - 2 juin 1973. Rev. écol. biol. sol, 12, 1, 25-44.

BOUCHE, M.B., 1976 - Etude de l'activité des invertébrés épigés prairiaux. I. Résultats généraux et géodrilologiques (Lumbricidae : Oligochaeta). Rev. écol. biol. sol, 13, 2, 261-286.

BOUCHE, M.B., et A. KRETZSCHMAR, 1974 - Fonctions des lombriciens. II. Recherches méthodologiques pour l'analyse du sol ingéré (étude du peuplement de la station R.C.P. - 165/P.B.I.). Rev. écol. biol. sol, 11, 1, 127-139.

DALBRO, S., 1955 - A method of measuring temperature. Horticultura, 9, 49-51.

DAMMAN, A.W.H., 1975 - Plant distribution in Newfoundland especially in relation to summer temperatures measured with the sucrose inversion method. Can. j. bot., 54, 1561-1585.

DESHUSSES, L.A., 1953 - Two simple methods for the study of microclimate. Bull. inst. natn. genev., 56, 205-228. (cité in Jones, 1972).

DRILLAT, J., E. BORDIER, J. DUCOM, H.P. GERVAIS et Y. NOEL, 1967 - La chimie générale au 1er cycle et dans les classes préparatoires. II. La réaction chimique. Collection : du cours aux applications. Ed. Colin, 1-142.

DURAND, G., 1965 - Les enzymes dans le sol. Rev. écol. biol. sol, 2, 2, 141-205.

DURAND, R., 1969 - Signification et portée des sommes de températures. Bull. tech. Inf. minist. agric., 238, 185-190.

GRANT, W.C.Jr., 1955 - Temperature relationships in the megascolecid earthworm *Pheretima hupeiensis*. Ecology, 36, 3, 412-417.

GRÜLL, F., et J. KVET, 1976 - Charakteristik der Bodentemperaturen in natürlichen Pflanzengesellschaften des Mährischen Karstes mit Anwendung der Invertzuckermethode. Preslia, 48, 247-258.

HOPP, H., 1948 - The ecology of earthworm in Cropland. Proc. soil sci. soc. amer., 12, 503-507.

JONES, R.J.A., 1972 - The measurement of mean temperatures by the sucrose inversion method. Soil fert., 35, 6, 615-619.

JONES, R.J.A., et M.N. COURT, 1980 - The measurement of mean temperatures in plant and soil studies by the sucrose inversion method. Plant and soil, 54, 15-31.

KHALAF EL-DUWEINI, A., et S.I. GHABBOUR, 1965 - Temperature relations of three Egyptian oligochaete species. Oikos, 16, 9-15.

KUNDLER, P., 1954 - Zur Anwendung der Invertzuckermethode für standortskundliche Temperaturmessungen. Z. Pflanzenernähr. Düngung Bodenk., 66, 239-246.

LEE, R., 1969 - Chemical temperature integration. J. appl. meteorol., 8, 3, 423-430.

LOUISOT, P., 1969 - Biochimie métabolique. I. Enzymologie, catabolismes. Ed. Simep, Lyon, 1-257.

LÜTZKE, R., 1963 - Über die Problematik von Temperaturmessungen mit der eT-Methode bei lokalklimatologischen und standortskundlichen Untersuchungen. Archiv. Forstwesen, 12, 10, 1053-1065.

MAZAUD, D., 1979 - Evaluation de méthodes de marquage permettant le repérage des lombriciens au terrain ; premières applications. Thèse docteur-ingénieur, sciences agronomiques, I.N.A. Paris-Grignon, Paris, 1-178 + annexes 1-80.

PALLMANN, H., E. EICHENBERGER et A. HASLER, 1940 - Eine neue Methode der Temperaturmessung bei ökologischen oder bodenkundlichen Untersuchungen. Ber. Schweiz. bot. Ges., 50, 337-362.

PATTEE, E., 1978 - Un indice thermique utile en écologie. I. La mesure de la température par la méthode d'inversion du saccharose. Bull. écol., 9, 3, 253-258.

PETRIK, B., et J. KVET, 1976 - Computer programme for processing data from ecological sucrose-inversion measurements of temperature. Folia geobot. phytotax., 11, 327-331.

RAVAILLE, M., 1968 - Chimie générale. Ed. J.B. Baillière et fils, 1-368.

REINECKE, A.J., et P.A.J. RYKE, 1972 - The temperature preferences of *Microchaetus modestus* Mich. and *Eisenia rosea* Sav. Natuurwetenskappe, 46, 1-15.

RUSSIER-DELOLME, R., 1972 - Coefficients thermiques et écologie de quelques planaires d'eau douce. VI. *Dugesia tigrina*. Annls Limnol., 8, 119-140. (cité in Pattee, 1978).

SAUSSEY, M., 1966 - Contribution à l'étude des phénomènes de diapause et de régénération caudale chez *Allolobophora icterica* Sav. Mem. soc. Linnéenne de Normandie, 1, N.S., 1-158.

SCHMITZ, W., 1964 - Messprobleme bei reaktionskinetischen Untersuchungen mit dem Kreispolarimeter dargestellt am Beispiel der reaktionskinetischen Temperaturmessung. Zeiss Mitt., 3, 227-249.

SCHMITZ, W., et E. VOLKERT, 1959 - Die Messung von Mitteltemperaturen auf reaktionskinetischer Grundlage mit dem Kreispolarimeter und ihre Anwendung in Klimatologie und Biookologie, speziell in Forst- und Gewässerkunde. Zeiss Mitt., 1, 300-337.

SMID, A.V., 1938 - Notes on the effect of heat in *Lumbricus terrestris* L. Ecology, 19, 2, 346-348.

ZÜRCHER, K., et H. HADORN, 1977 - Zur Problematik der Hydrolyse von Zuckern und Glucose-sirup mit Salzsäure (Saccharose-Inversion). Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 68, 200-212.

ANNEXES

I. LES VITESSES DE REACTION

- Réaction du premier ordre
- Expression de la constante de vitesse

II. RELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS MOLAIRES ET LES POUVOIRS ROTATOIRES

III. LE COEFFICIENT DE TEMPERATURE Q_{10}

IV. DOSAGE DU GLUCOSE ET DU SACCHAROSE

- Réactifs
- Préparation des solutions
- Mode opératoire
- Calculs

V. CALCUL DE LA PART D'HYDROLYSE DUE AUX MANIPULATIONS ANNEXES

II. RELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS MOLAIRES ET LES POUVOIRS ROTATOIRES

$$K_T = \frac{1}{t} \log \left[\frac{\alpha_o - \beta_o}{\alpha - \beta_o} \right]$$

α_o : pouvoir rotatoire de la solution de saccharose au temps t = 0

α : pouvoir rotatoire de la solution de saccharose au temps t

β_o : pouvoir rotatoire de la solution de saccharose au temps t = infini c'est-à-dire à inversion complète.

D'après la loi de Biot, le pouvoir rotatoire d'une solution mesuré au polarimètre est proportionnel à la concentration de la substance active et à la longueur d'onde du tube polarimétrique.

$$\delta = [\delta]_\lambda^T \cdot c.l$$

$[\delta]_\lambda^T$ est le pouvoir rotatoire spécifique de la substance active pour une température et une longueur d'onde données.

Dans notre cas, si :

A est la concentration de saccharose à t = 0

A - x est la concentration de saccharose au temps t

x est la concentration en saccharose disparue au temps t

Comme une mole de saccharose donne une mole de glucose plus une mole de fructose, x est aussi la concentration en glucose et en fructose au temps t.

Soit α_s le pouvoir rotatoire spécifique du saccharose

α_g le pouvoir rotatoire spécifique du glucose

α_f le pouvoir rotatoire spécifique du fructose

l la longueur du tube polarimétrique

En appliquant la loi de Biot, nous avons les relations suivantes :

$$\alpha_o = \alpha_s . A . l$$

$$\alpha = \left(\alpha_s (A - x) + \alpha_g x + \alpha_f x \right) l$$

$$\beta_o = (\alpha_g A + \alpha_f A)\, l$$

Il vient alors :

$$\frac{\alpha_o - \beta_o}{\alpha - \beta_o} = \frac{\alpha_s A\, l - (\alpha_g A + \alpha_f A)\, l}{\left(\alpha_s (A - x) + \alpha_g x + \alpha_f x\right) l - (\alpha_g A + \alpha_f A)\, l}$$

En ordonnant et en simplifiant :

$$\frac{\alpha_o - \beta_o}{\alpha - \beta_o} = \frac{A\,(\alpha_s - \alpha_g - \alpha_f)\, l}{(A - x)\,(\alpha_s - \alpha_g - \alpha_f)\, l} = \frac{A}{A - x}$$

Il est donc équivalent d'écrire :

$$K_T = \frac{1}{t} \log \left[\frac{A}{A - x}\right] = \frac{1}{t} \log \left[\frac{\alpha_o - \beta_o}{\alpha - \beta_o}\right]$$

III. LE COEFFICIENT DE TEMPERATURE Q_{10}

(D'APRES DURAND, 1969)

Le terme Q_{10} désigne le rapport entre la vitesse de réaction à la température $\theta + 10$ et celle à la température θ (en degrés Celsius). S'il est constant, cela entraîne que la fonction $v(\theta)$ est exponentielle et tend vers zéro lorsque θ décroît.

Nous avons la relation :

$$v = a\ e^{b\theta}$$

où a et b sont des constantes.

Il vient : $$Q_{10} = \frac{v_{\theta+10}}{v_\theta} = \frac{a\ e^{b(\theta + 10)}}{a\ e^{b\theta}} = e^{10b}$$

Le terme b est donc égal à : $\dfrac{\log Q_{10}}{10}$

On prend habituellement a = 1, d'où :

$$v = e^{\frac{\log Q_{10}}{10}\theta} = Q_{10}^{\theta/10}$$

Pour la croissance et le développement des végétaux, on trouve habituellement des Q_{10} compris entre 2 et 4 lorsque les températures sont exprimées en degrés centésimaux.

IV. DOSAGE DU GLUCOSE ET DU SACCHAROSE

(D'APRES ANONYME, 1977/1978)

Réactifs

1 - Triéthanolamine-hydrochloride
2 - Soude 5 mole/l
3 - Sulfate de magnésium $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
4 - Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate $NADP\text{-}Na_2H$
5 - Hydrogéno-carbonate de sodium $NaHCO_3$
6 - Adénosine-5-triphosphate $ATP\text{-}Na_2H_2$
7 - Hexokinase/glucose-6-phosphate-déshydrogénase HK/G6PDH
8 - Acide citrique$\cdot H_2O$
9 - Citrate de tri-sodium$\cdot 2\ H_2O$
10 - Soude 0,2 mole/l
11 - β-fructosidase (invertase)

Préparations des solutions

1 - Tampon citrate : (0,32 mole/l ; pH 4,6)

Dissoudre 6,9 g d'acide citrique$\cdot H_2O$ et 9,1 g de citrate tri-sodique$\cdot 2\ H_2O$ dans à peu près 150 ml d'eau distillée. Ajuster à pH 4,6 avec de la soude (0,2 mole/l) et compléter à 200 ml avec de l'eau distillée. Le tampon est stable pendant au moins un an à 4 °C.

2 - β-fructosidase (5 mg/ml)

Dissoudre 10 mg de β-fructosidase dans 2 ml d'eau distillée. La solution est stable pendant au moins une semaine à 4 °C.

3 - Tampon TEA (triéthanolamine 0,75 mole/l ; pH 7,6 ; Mg^{++} 10^{-2} mole/l)

Dissoudre 14 g de triéthanolamine-hydrochloride et 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ dans 80 ml d'eau distillée, ajuster à pH 7,6 avec de la soude (5 mole/l) et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. La solution est stable pendant au moins 4 semaines à 4 °C.

4 - Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP 11,5 10^{-3} mole/l)

Dissoudre 60 mg de NADP-Na_2H dans 6 ml d'eau distillée. La solution est stable pendant au moins 4 semaines à 4 °C.

5 - Adénosine-5-triphosphate (ATP 81 10^{-3} mole/l)

Dissoudre 300 mg ATP-Na_2H et 300 mg $NaHCO_3$ dans 6 ml d'eau distillée. La solution est stable pendant au moins 4 semaines à 4 °C.

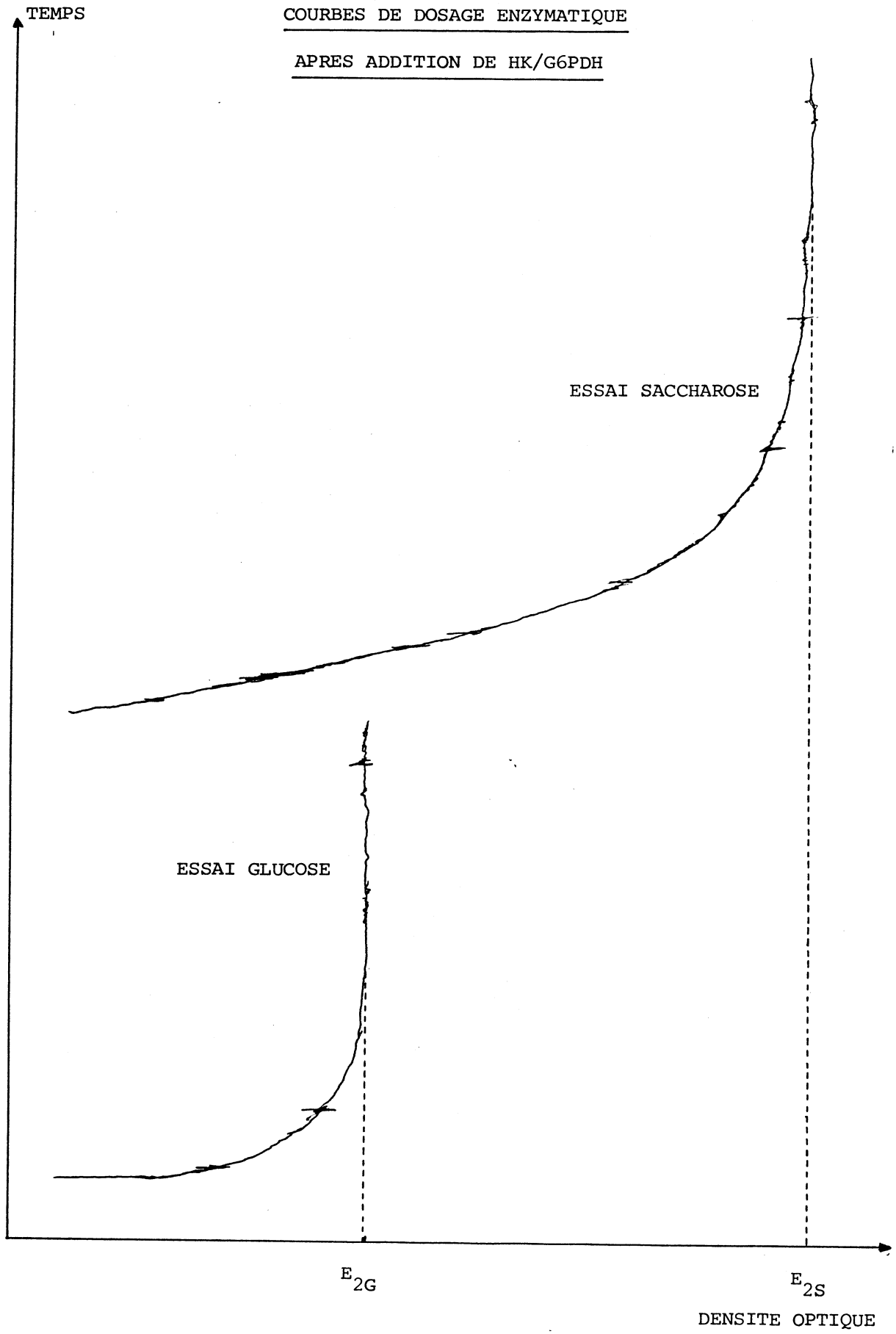
6 - Hexokinase/glucose-6-phosphate-déshydrogénase (HK/G6PDH 2 mg HK/ml ; 1 mg G6PDH/ml)

Utiliser la suspension non diluée. Celle-ci est stable pendant au moins 1 an à 4 °C.

Mode opératoire

Longueur d'onde : 340 nm (Hg)
Cuve de verre : 1 cm d'épaisseur
Température : 20 à 25 °C
Volume final : 3,14 ml
Quantité : 5 à 150 µg de glucose et saccharose par cuve
Echantillon à doser : il est constitué par l'ampoule cassée dans 1,2 ml d'eau distillée.

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai glucose	Essai saccharose
Tampon citrate	0,20 ml	-	0,20 ml
Echantillon à doser	-	-	0,50 ml
β-fructosidase	0,02 ml	-	0,02 ml
Agiter, maintenir les solutions à 20-25 °C pendant 15 minutes. Le reste de l'échantillon à doser est conservé à 0 °C.			
Tampon TEA	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Echantillon à doser	-	0,50 ml	-
Eau	1,70 ml	1,42 ml	1,20 ml
NADP	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
ATP	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
Agiter et lire la densité optique des solutions après environ 3 minutes (E_1). Démarrer la réaction en ajoutant :			
HK/G6PDH	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
Agiter, lire la densité optique (E_2) lorsque la réaction enzymatique est terminée (environ 10 à 15 mn). Il est possible de suivre l'augmentation de densité optique sur un enregistreur et de lire la valeur lorsque la courbe atteint le pallier (cf. figure p. 45).			


TEMPS
COURBES DE DOSAGE ENZYMATIQUE
APRES ADDITION DE HK/G6PDH
ESSAI SACCHAROSE
ESSAI GLUCOSE
E_{2G}
E_{2S}
DENSITE OPTIQUE

Durée

La manipulation complète pour une ampoule dure environ 1 H.

Calculs

La différence de densité optique se calcule pour chacun des essais par différence entre les valeurs lues avant et après avoir mis l'hexokinase/glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

Pour l'essai glucose :

$$\Delta E_G = E_{2G} - E_{1G}$$

Pour l'essai saccharose :

$$\Delta E_S = E_{2S} - E_{1S}$$

D'après la loi de Beer-Lambert, la densité optique est proportionnelle à la concentration du produit actif qui est ici le NADPH.

$$E = \varepsilon\ d\ C$$

E : densité optique
ε = 6,3 : coefficient d'extinction du NADPH à 340 nm
d : longueur de la cuve (1 cm)
C : concentration molaire du NADPH dans la cuve.

Comme une mole de NADPH est issue d'une mole de glucose provenant elle-même d'une mole de saccharose, on peut déduire :

Pour le saccharose :

$$\Delta E_S = \varepsilon\ d\ C_S$$

Pour le glucose :

$$\Delta E_G = \varepsilon\ d\ C_G$$

D'après les conventions préalablement choisies, les concentrations sont $C_S = A$ et $C_G = A - x$, d'où

$$\Delta E_S = \varepsilon\ d\ A \qquad \Delta E_G = \varepsilon\ d\ (A - x)$$

On peut aussi exprimer la masse de glucose contenue dans l'échantillon par :

$$G = \frac{V\ M_G}{\varepsilon\ d}\ \Delta\ E_G \text{ (en } \mu g)$$

et la masse de saccharose par :

$$S = \frac{V\ M_S}{\varepsilon\ d}\ \Delta\ E_S \text{ (en } \mu g)$$

$V = 3{,}14$ ml : volume final de la cuve

$M_G = 180{,}16$ g : masse molaire du glucose

$M_S = 342{,}30$ g : masse molaire du saccharose.

V. CALCUL DE LA PART D'HYDROLYSE DUE AUX MANIPULATIONS ANNEXES

Lors du remplissage, de l'obturation et du stockage, les ampoules sont soumises, pendant des temps variables, à des températures qui provoquent une hydrolyse du saccharose non inhérente à l'expérience elle-même.

On peut calculer théoriquement cette proportion afin de la déduire de la valeur générale après dosage.

- Du remplissage à l'implantation dans le ver de terre, les ampoules sont conservées pour le séchage du bouchon à 4 °C.
- De l'implantation à la mise au terrain, les vers sont sont gardés en élevage à 10 °C.
- De la récupération au dosage, les ampoules sont stockées à 4 °C.

Pour la conservation à 4 °C, il est apparu que le taux d'hydrolyse était tout à fait négligeable pour des temps de l'ordre de quelques heures (cf. § 2.3 p. 31).

Il nous suffit donc de tenir compte du temps passé à 10 °C en salle d'élevage.

Calcul

Nous savons que :

$$K_T = \frac{1}{t} \log \frac{1}{1 - \frac{\Delta E_G}{\Delta E_S}}$$

Nous pouvons exprimer :

$$\log \frac{1}{1 - \frac{\Delta E_G}{\Delta E_S}} = t\ K_T$$

d'où : $1 - \frac{\Delta E_G}{\Delta E_S} = 10^{-\ t.K_T}$ et $\frac{\Delta E_G}{\Delta E_S} = 1 - 10^{-\ t.K_T}$

Nous connaissons t = 22 H = 0,917 jours (du 7 mai 12 H au 8 mai 10 H).

D'autre part, Berthet (1960) a calculé en fonction de la température la valeur de la constante de vitesse K_T

pour T = 10 °C, K_T = 0,0209

Nous pouvons donc calculer :

$$\frac{\Delta E_G}{\Delta E_S} = 1 - 10^{-0,917.0,0209}$$

$$\frac{\Delta E_G}{\Delta E_S} = 0,0432$$

Cette valeur théorique est déduite du rapport global que l'on observe au moment du dosage.