

Écologie générale/General Ecology  
(Zoologie/Zoology)

## Composition chimique du mucus cutané de *Allolobophora chaetophora chaetophora* (Oligochaeta : Lumbricidae)

Jacques CORTEZ et Marcel BOUCHÉ

**Résumé** — On sait que le mucus cutané de lombricien représente une source d'azote importante pour la microflore du sol et les plantes. A titre d'exemple, les auteurs ont étudié la composition chimique du mucus cutané d'*Allolobophora chaetophora chaetophora*. Cette mucoprotéine, obtenue par précipitation sélective, est composée de 69% de protéines et peptides et de 31% d'osides et oses. Elle est formée de deux grands types de molécules; l'une relativement homogène, de masse moléculaire voisine de 25 000 daltons, semble être de nature glycoprotéique. Les autres, plus hétérogènes, de masse moléculaire > 2 200 sont composés essentiellement de peptides et polypeptides. La richesse en azote de ces molécules (C/N=6,9 et 3,3) d'une part, et leur masse moléculaire relativement faible, d'autre part, présagent de leur biodégradation rapide dans le sol.

### Chemical composition of epidermal mucus from *Allolobophora chaetophora chaetophora* (Oligochaeta: Lumbricidae)

**Abstract** — Epidermal mucus of earthworms is an important nitrogen source for soil microflora and plants. The authors studied the chemical composition of epidermal mucus from *Allolobophora chaetophora chaetophora*. This mucoprotein, obtained by selective precipitation, was composed of 69% of proteins and peptides and of 31% of carbohydrates. It included two types of molecules. The first molecule, relatively homogeneous, had a molecular weight near 25,000 daltons and seemed to be a glycoprotein. The others molecules, more heterogeneous, had molecular weights below 2,200 daltons and were principally composed of peptides and polypeptides. The nitrogen content of these molecules (C/N=6.9 and 3.3) in one way and, in the other way, their relatively low molecular weights were an indicator of their fast biodegradation in soil.

**INTRODUCTION.** — De nombreux travaux attribuent une grande importance au mucus de lombricien excrété par voie cutanée. Lee [1] indique qu'il agit comme un lubrifiant durant le fouissage, tout en maintenant une humidité suffisante de la cuticule afin de favoriser les échanges gazeux nécessaires à la respiration. Laverack [2] montre aussi que ce mucus cutané est un mode de défense de l'animal vis-à-vis des stimulus nocifs du milieu environnant. Ainsi en 1982, Krivolutsky et coll. [3] ont montré par exemple que le nombre des cellules excrétrices intestinales et cutanées productrices de mucus augmentait en même temps que la radioactivité du milieu. En outre, Richards [4] suggère que cette substance agit aussi comme une barrière pour tamponner les éventuels changements ioniques du milieu environnant.

Le mucus de lombricien, primordial pour la vie de l'animal, est aussi d'une grande importance pour le milieu dans lequel le ver de terre évolue. En effet, Needham [5] indique que 50% de l'excrétion de l'azote d'un lombricien se fait par l'intermédiaire du mucus cutané, ce qui serait par ailleurs un indicateur de la nature mucoprotéique de cette substance. Les observations de El Duweini et Ghabbour [6] vont dans le même sens puisqu'ils montrent que les lombriciens excrètent dans le sol à la fois des formes azotées directement assimilables par les plantes (urée, ammoniacale, acide urique, allantoiné) mais aussi une fraction azotée plus importante sous forme de macromolécules complexes (mucopolysaccharides et protéines) qui seraient biodégradées avant de devenir assimilable.

Or Bouché et Ferrière [7] ont constaté que, durant leur expérience dans une prairie permanente, 26% de l'azote assimilé par les plantes ont transité dans les adultes de

Note présentée par Théodore MONOD.

TABLEAU

Répartition des protéines et des polysaccharides après chromatographie sur gel du mucus cutané de *Allolobophora chaetophora chaetophora*.  
*Repartition of proteins and polysaccharides of epidermal mucus from Allolobophora chaetophora chaetophora after gel chromatography.*

|                           | Masse totale (mg) | $6 \cdot 10^4 > M > 10^4$ (%) | $10^4 > M > 2,2 \cdot 10^3$ (%) | $2,2 \cdot 10^3 > M > 4 \cdot 10^2$ (%) | $M < 4 \cdot 10^2$ (%) |
|---------------------------|-------------------|-------------------------------|---------------------------------|---|------------------------|
| Protéines . . . . .       | 14 055            | 28,7                          | 5,3                             | 55,8                                    | 10,2                   |
| Peptides . . . . .        |                   |                               |                                 |   |                        |
| Acides aminés . . . . .   |                   |                               |                                 |   |                        |
| Polysaccharides . . . . . | 6 640             | 79,2                          | 2,7                             | 2,3                                     | 16,8                   |
| Osides . . . . .          |                   |                               |                                 |   |                        |
| Oses . . . . .            |                   |                               |                                 |   |                        |

*Nicodrilus longus*. En extrapolant ce résultat à l'ensemble des lombriciens de la prairie, ils en concluent que 82% des assimilats azotés des végétaux ont transité par les vers de terre. La fraction mucoprotéique étant quantitativement la plus élevée, son importance dans le cycle de l'azote justifie une étude approfondie de ses propriétés. La présente Note rend compte de quelques-unes des propriétés physico-chimiques du mucus cutané de *Allolobophora chaetophora chaetophora* Bouché 1972.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Une centaine d'adultes d'*Allolobophora chaetophora chaetophora* ont été débarrassés de leur contenu digestif, en plaçant les animaux dans des boîtes de Petri contenant du papier filtre humidifié. Celui-ci est rapidement ingéré et la terre déféquée est éliminée, au fur et à mesure, jusqu'à l'obtention de fèces en papier. On considère que l'animal a expurgé la totalité du sol qu'il contenait lorsque ses déjections sont blanches (= en papier). Les lots de vers sont répartis dans des erlenmeyers contenant un mélange d'eau distillée stérile et de merthiolate de Na (1%) comme antiseptique. Après 10 jours d'excrétion à la température du laboratoire, le liquide contenant le mucus cutané est recueilli puis concentré sous vide à basse température. On ajoute ensuite lentement au concentrat deux volumes du mélange acétone-éthanol (v/v=1/1), maintenu à 4°C, ce qui entraîne la formation d'un précipité. Celui-ci est recueilli par centrifugation à 4 000 g pendant 15 mn, lavé 3 fois à l'aide du mélange éthanol-acétone et lyophilisé. Nous avons obtenu 81,7 mg de mucus lyophilisé.

25 mg de ce lyophilisat sont dissous dans 20 ml d'une solution NaCl 0,3% par agitation pendant 8 h. La fraction non redissoute est éliminée par centrifugation à 4 000 g pendant 15 mn. Le surnageant est recueilli et concentré sous vide à basse température jusqu'à un volume de 10 ml. 2 ml de ce concentrat sont appliqués au sommet d'une colonne (90 × 1,5 cm) de type Biogel P60 préalablement équilibrée pendant 24 h avec une solution NaCl 0,3% qui sert d'éluant. Les substances éluées sont recueillies par fractions de 3 ml. Les protéines et les polysaccharides sont dosés respectivement selon les méthodes de Lowry et coll. [9] et de Dubois et coll. [10]. La masse moléculaire des substances éluées est déterminée par filtration sur gel. Cette méthode, préconisée par Granath et flodin [11], établit une relation linéaire entre le rapport du volume d'élué au volume total d'une colonne de gel et le logarithme décimal du poids moléculaire des substances éluées. Nous avons donc noté les volumes d'élué du glucose et de deux polysaccharides étalons (Dextrane T10 MW=9 300; Dextrane T40 MW=44 400) et calculé le rapport de ces volumes d'élué au volume total d'une colonne de gel de type Biogel P60 (90 × 1,5 cm) sur lesquels nous avons chromatographié ces échantillons. La détermination du poids moléculaire du mucus et des substances l'accompagnant se fait par simple lecture sur la courbe d'étalonnage obtenue.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — La figure 1 rend compte des résultats obtenus après chromatographie sur gel du mucus cutané de *Allolobophora chaetophora chaetophora*. L'analyse d'une part des polysaccharides, osides et oses, et, d'autre part, des protéines et peptides dans les fractions recueillies, montre plusieurs pics distincts. Un premier pic, composé à la fois de polysaccharides et de protéines, entre 48 et 69 ml est suivi d'un second pic composé exclusivement de peptides et de polypeptides entre 90 et 120 ml. Un troisième pic d'oses et de peptides ou d'acides aminés est élué en fin de colonne.

L'analyse globale du lyophilisat de mucus avant chromatographie nous indique une teneur en polysaccharides, osides et oses de 31,0% et de 69,0% en protéines et peptides. Après chromatographie on retrouve des résultats à peu près identiques (32,4% de glucides et 67,6% de protéines).

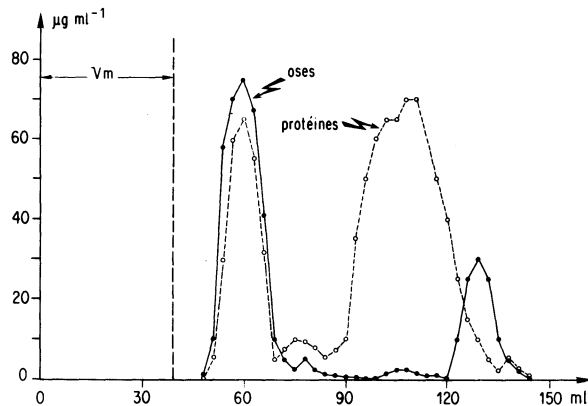


Fig. 1

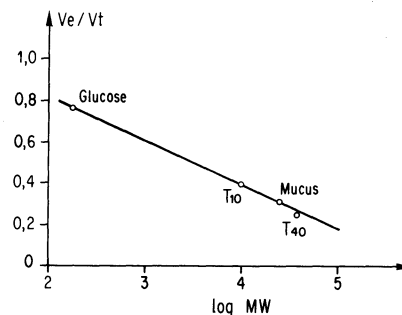


Fig. 2

Fig. 1. — Chromatographie sur gel Biogel P60 du mucus cutané d'*Allolobophora chaetophora chaetophora*.  $V_m$  : volume mort de la colonne. Dimensions du gel  $90 \times 1,5$  cm. Débit de la colonne : 15 ml/h. Éluant : NaCl 0,3%.

Fig. 1. — Gel chromatography of epidermal mucus from *Allolobophora chaetophora chaetophora* on Biogel P60.  $V_m$ : void volume. Bed volume:  $90 \times 1.5$  cm. Flow rate: 15 ml/h. Eluant: NaCl 0.3%.

Fig. 2. — Courbe d'étalonnage de polysaccharides étalon sur Biogel P60. Glucose, T10 et T40 sont les masses moléculaires respectives du glucose (MW=180) du Dextrane T10 (MW=9 300) et du Dextrane T40 (MW=44 400). Dimensions du gel  $90 \times 1,5$  cm. Débit de la colonne : 20 ml/h. Éluant : NaCl 0,3%.

Fig. 2. — Calibration curve of standard polysaccharides on Biogel P60. Glucose, T10 and T40 were the molecular weights of glucose (MW=180), dextran T10 (MW=9,300) and dextran T40 (MW=44,400). Bed volume= $90 \times 1.5$  cm. Flow rate=20 ml/h. Eluant: NaCl 0.3%.

A la vue de ce chromatogramme, on peut distinguer deux grands types de molécules :

(1) L'un correspondant au premier pic contient 56,6% de polysaccharides et 43,4% de protéines. Il constituerait la principale molécule du mucus cutané d'*Allolobophora chaetophora chaetophora* (55,4% des molécules excrétées). Son C/N est de 6,4. Les courbes de protéines et de polysaccharides de ce pic se superposent parfaitement, ce qui pourrait indiquer la nature glycoprotéique de cette substance. Ces résultats se rapprochent de ceux de Haggag et El Duweini [12] qui indiquent que généralement le mucus cutané des vers de terre est une mucoprotéine (polysaccharide et protéine). Ewer et Manson [13] ont montré, de leur côté, la nature mucoprotéique du mucus de certaines espèces par des colorations spécifiques.

La masse moléculaire de ces molécules, déterminée par filtration sur gel, est de 25 100 daltons (fig. 2). Halpern et coll. [14] ont montré que *Lumbricus terrestris* excrète par voie cutanée une glycoprotéine de masse moléculaire voisine de 67 000 daltons et ils supposent que cette molécule jouerait un rôle « attractif » pour un ophidien prédateur de cette espèce.

(2) L'autre type de molécules est composé essentiellement de protéines, de peptides et d'oses. Le tableau montre la répartition en classes de masse moléculaire des composés recueillis. Nous voyons que 55,8% des fractions azotées se trouvent dans des limites de masse moléculaire allant de 2 200 à 400 daltons, ce qui laisse supposer qu'il s'agit plutôt de polypeptides et de peptides. Ces composés de C/N=3,3 sont très peu associés aux glucides (2,3% d'oses). En dessous de 400 daltons, on trouve des peptides et surtout des osides et oses (mono ou disaccharides).

*Allolobophora chaetophora chaetophora* excrète donc par voie cutanée une glycoprotéine de poids moléculaire voisin de 25 000 daltons et simultanément des peptides de  $400 < M < 2 200$  et des osides de  $M < 400$ .

Richards [4] distingue chez les vers de terre trois types de glandes productrices de mucus cutané;

(1) l'une excrète une substance complexe associant polysaccharides, protéines et lipides. Ce composé est généralement utilisé par l'animal comme lubrifiant pendant le fouissage;

(2) la seconde produit un mucus de faible viscosité à groupements COOH;

(3) la troisième fournit un composé riche en protéines.

Étant donné que, d'une part, la teneur en lipides du mucus isolé est très faible (moins de 2%) et que, d'autre part, les titrages effectués ont montré une teneur pratiquement nulle en COOH, il semblerait que le mucus isolé ait été produit par le troisième type de glandes cutanées.

Par ailleurs, on sait que les lombriciens sont susceptibles d'excréter deux formes d'azote relativement différenciées. La moitié de l'azote rejeté par les animaux [2] se ferait principalement par les néphridies sous forme d'urée, d'ammoniaque et d'allantoïne, tandis que l'autre moitié serait excrétée par voie cutanée sous forme de mucus [6]. L'excrétion d'azote par les fèces est par contre très faible (0,4% en moyenne) [1] hormis le cas où l'urine, excrétée dans le tube digestif par les néphridies septales, est évacuée avec les turricules.

Dans notre cas, l'ensemble des molécules excrétées par voie cutanée contient une quantité importante d'azote qui, pour être assimilée par les plantes, devra subir une dégradation préalable par la microflore tellurique. La masse moléculaire relativement faible des peptides accompagnant la mucoprotéine et leur C/N relativement bas (C/N=3,3) permet de penser à une minéralisation rapide de l'azote apporté par ces substances. De même la glycoprotéine, bien que de masse moléculaire et de C/N plus élevés, doit être relativement vite biodégradée dans le sol à moins que la structure tertiaire de la molécule soit telle que les charges situées sur son pourtour établissent des ponts salins avec les sites dissociés des argiles [15].

Note reçue le 11 mai 1987, acceptée le 28 mai 1987.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] K. E. LEE, In *Earthworms. Their ecology and relationships with soil and land use*, Academic Press, London, 1985, p. 33-55.
- [2] M. S. LAVERACK, The physiology of earthworms, *Int. Ser. Monographs on Pure and Appl. Biol., Zool.*, n° 15, Pergamon Oxford, 1963.
- [3] D. KRIVOLUTSKY, V. TURCANINOVA et Z. MIKHALTOVA, *Pedobiologia*, 23, 1982, p. 263-265.
- [4] K. S. RICHARDS, In *Physiology of Annelids*, Acad. Press, London, 1978, p. 33-61.
- [5] A. E. NEEDHAM, *J. Exp. Biol.*, 34, 1957, p. 425-446.
- [6] A. K. EL DUWEINI et S. I. GHABBOUR, In *IV Colloquium Pedobiologiae*, Inst. nat. des rech. agric., Publ. 71-77, Paris, 1971, p. 495-501.
- [7] M. B. BOUCHÉ et G. FERRIÈRE, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 302, série III, 1986, p. 75-80.
- [8] M. B. BOUCHÉ, In *Lombriciens de France. Écologie et systématique*, I.N.R.A., Ann. zool. Ecol. anim., N.S. 1972, p. 1-671.
- [9] H. O. LOWRY, J. N. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 28, 1956, p. 265-275.
- [10] M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBBERS et F. SMITH, *Ann. Chem.*, 28, 1956, p. 350-356.
- [11] K. A. GRANATH et P. FLODIN, *Makromol. Chem.*, 48, 1961, p. 160-171.
- [12] G. HAGGAG et K. A. EL DUWEINI, *Proc. Egypt. Acad. Sci.*, 13, 1959, p. 1-15.
- [13] D. W. EWER et J. HAMSON, *J. R. microsc. Soc.*, 65, 1945, p. 40-48.
- [14] M. HALPERN, N. SCHULMAN, L. SCRIBAN et D. M. KIRSCHENBAUM, *Pharmacol. Biochem. and Behavior*, 21, n° 4, 1984, p. 655-662.
- [15] J. CORTEZ, *Soil Biol. Biochem.*, 9, 1977, p. 25-32.