N°46

N° 146

ECOPHYSIOLOGIE (ÉCOLOGIE GÉNÉRALE). — *Première mesure écophysiologique d'un débit d'élément dans un animal endogé : le débit d'azote de Nicodrilus longus longus (Ude) (Lumbricidae, Oligochaeta) dans la prairie de Cîteaux.* Note de **Gérard Ferrière** et **Marcel B. Bouché**, présentée par Jean Dorst.

La mesure globale du débit (transit) d'azote a pu être effectuée sur un lombricien adulte en prairie permanente non perturbée. Cette mesure est possible grâce à un double marquage préalable (coloration + ^{15}N) d'individus, à leur réintroduction et à leur recapture à différentes dates, permettant d'observer la quantité de l'azote corporel initial restant en fonction du temps. Cette fonction permet le calcul du débit de l'ensemble de l'azote corporel. Le débit observé (105 mg/jour/g N corporel) est cohérent avec la mesure en laboratoire préalable (149 mg/jour/g N corporel à 15°C) compte tenu des imprécisions relatives à la valeur du Q_{10} et à celle de la température ayant prévalu au champ (le Q_{10} serait $\simeq$1,6 à 2 et la température corporelle au champ $\simeq$8 à 10°C).

ECOPHYSIOLOGY (GENERAL ECOLOGY). — The first ecophysiological measure of chemical element flow through a soil animal: the nitrogen flow of *Nicodrilus longus longus* (Ude) (Lumbricidae, Oligochaeta) in a permanent pasture (Cîteaux, France).

The measure of the nitrogen flow (mg/day) through an adult earthworm was made in a non-disturbed permanent grassland. This measure was possible thanks to a double labelling (coloration + ^{15}N) of individuals, followed by a reinoculation in field and then by recaptures versus time. This procedure allows us to calculate the level of the initial nitrogen remaining in the body. The fitting of level data versus time to a mathematical function allows the measure of the infield nitrogen flow. The observed flow (105 mg/day/g N of the body), is consistent with the former laboratory result (149 mg/day/g N body at 15°C) regarding the fact that Q_{10} is not precisely known and the body temperature in field just estimated (the Q_{10} should be $\simeq$1.6 to 2 and the body temperature in filed around 8 to 10°C).

INTRODUCTION. — L'azote joue dans le monde vivant, un rôle fondamental ne serait-ce que comme constituant des enzymes et d'autres protéines. Les plantes l'assimilent essentiellement sous forme minérale (ammoniaque, nitrate). Elles restituent cet élément principalement sous forme organique, c'est-à-dire lié à des molécules carbonées. La dégradation de ces molécules libère à nouveau cet élément essentiel sous forme minérale. Les modalités de cette dégradation effectuée surtout par les hétérotophes commandent donc le recyclage de cet élément vers les plantes. Si le rôle des micro-organismes dans ces processus est reconnu de longue date, celui des animaux endogés n'a été estimé qu'à partir de mesures en conditions artificielles extrapolées, après diverses approximations hypothétiques, sans possibilité de contrôle dans le sol [1]. Une première approximation hypothétique [2] avait montré que les lombriciens pouvaient jouer un rôle non négligeable dans le recyclage de l'azote. Nous avons développé une technique évitant toute perturbation du sol.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les animaux étudiés sont des *Nicodrilus longus longus* (Ude 1886) sélectionnés au stade adulte, pour limiter les variations pondérales en cours d'expérience, les individus à ce stade ayant une masse quasi constante [3]. Les conditions de l'expérience sont celles du milieu où ces animaux vivent : la prairie permanente (depuis 1840 assurément, très probablement depuis la fondation de l'Abbaye de Cîteaux par Saint-Bernard-de-Clairvaux au XIIe siècle). Sur ce milieu équilibré, pousse un *Lolio-cynosuretum* (Tuxen 1974) sur sol argilo-limono-argileux à pH $\simeq$ 7. Les conditions climatiques ayant prévalu au cours de l'expérience sont celles d'un climat océanique frais, régulièrement dominant durant la période du 13/04/82 au 29/05/82. Seulement 4 jours sans pluie et en moyenne 4,7 mm/jour avec une température moyenne du sol à -10 cm de 8°C oscillant entre 6,2 et 13,2°C, débutant à 6,9°C (le 13/04) et s'élevant à 7,7°C (le 29/05). Nous savons qu'en fait ce lombricien ajuste sa température moyenne en choisissant la position optimale dans le profil hygrothermique du sol grâce à ses galeries verticales ([4], [5]).

PRÉPARATION DES ANIMAUX. — Nous nous sommes appuyés sur deux études préliminaires :

(1) La mise au point d'une méthode de coloration par accumulation dans les vacuoles des chloragocytes du typhlosolis d'un corps étranger coloré en l'occurence par un colorant alimentaire (E 102 + E 132) ([6], [7]).

0249-6313/85/03010789 $2.00 © Académie des Sciences

(2) La mise au point d'une méthode de marquage global de *N. longus* à partir d'animaux élevés en présence d'une algue que l'on trouve également dans la prairie de Cîteaux, *Synechococcus cedorum* (Nägeli 1849) (souche 6808 fournie par le Museum national d'Histoire naturelle). Cette algue a été préalablement cultivée dans un milieu classique ([8], [9]) à l'exception du $Na^{14}NO_3$ remplacé par KNO_3 dont l'azote est enrichi en ^{15}N à 30 %. Cet aliment marqué a été ensuite apporté dans des élevages de *N. longus*. Le sol de cet élevage (issu de Cîteaux) est traité à l'eau oxygénée électrolytique pour oxyder les formes organiques ^{14}N pré-existantes.

Les lombriciens ont été élevés depuis leur éclosion jusqu'au stade adulte au laboratoire à 15°C, à l'obscurité continue afin d'obtenir un marquage corporel aussi homogène que possible. Au stade adulte, les animaux ont été divisés en 7 lots de 4 individus de masse peu différente et placés en élevage dans la terre de Cîteaux à 15°C à l'obscurité, avec une alimentation « normale » (feuilles sèches de *Festuca pratensis* Hudson à azote naturel). En fait, le premier lot a été sacrifié au moment de la mise en élevage et disséqué pour éliminer le contenu du tube digestif, 6 autres lots ont subi le même traitement au bout de 2, 4, 6, 14, 20, 26 jours d'élevage en milieu à l'alimentation « normale ». Les individus disséqués ont été broyés au mortier, minéralisés (méthode Kjeldhal). La solution de $(NH_4)_2SO_4$ obtenue est ensuite distillée selon la méthode de Bremmer et Edwards [10] pour chasser par distillation l'azote sous forme gazeuse N_2. La proportion de l'isotope ^{15}N par rapport à l'azote total a été déterminée par spectrométrie de masse. Les études de laboratoire (présentée plus bas) nous ont permis de modifier la technique pour le marquage des animaux utilisés *in situ*. Ce sont des adultes capturés dans la même prairie qui ont été colorés comme indiqué ci-dessus, puis marqués à l'isotope ^{15}N de façon quasi homogène par élevage en 50 jours avec une alimentation d'algues ^{15}N dans les mêmes conditions que ci-dessus. Ils ont été relâchés au terrain en sol non travaillé depuis des siècles, par lots de 4 individus, et sacrifiés puis analysés comme ci-dessus directement au temps t_0, puis après recapture dans le sol aux temps 1, 2, 4, 8, 14, 20, 26 et 40 jours. Les données numériques obtenues sur la moyenne des 4 individus à chaque date ont été ajustées sur micro-ordinateur grâce à la méthode Nelder Mead [11], à l'aide d'un programme écrit par F. Sorrantino et mis en œuvre par P. Soto et J. C. Heidet.

RÉSULTATS. — (1) Échange d'azote naturel contre l'azote constitutif marqué dans le corps de *N. longus* au laboratoire (tableau I).

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE I

Fig. 1. — Variation, pendant 26 jours, de la teneur en ^{15}N des lombriciens marqués placés dans un milieu à azote naturel : valeurs individuelles (points) et moyennes (croix), $y'0$ fonction dérivée à l'origine. Simulation de la fonction inverse d'incorporation d'azote sur 50 jours.

Fig. 1. — Variation of the ^{15}N content of labelled earthworm introduced in a natural nitrogen environment during 26 days: individual values (points) and means (cross), $y'0$ derived function at time 0. Simulation of the inverse function of the nitrogen incorporation during 50 days.

Fig. 2. — Variation de la teneur individuelle en ^{15}N des lombriciens marqués relâchés dans la prairie permanente. Valeurs moyennes observées (points) et calculées (carrés) exprimées en pour mille de la teneur initiale.

Fig. 2. — Variation of ^{15}N content of labelled earthworm released in a permanent grassland. Mean observed values (points) and calculated (squares) as thousandth of the initial content.

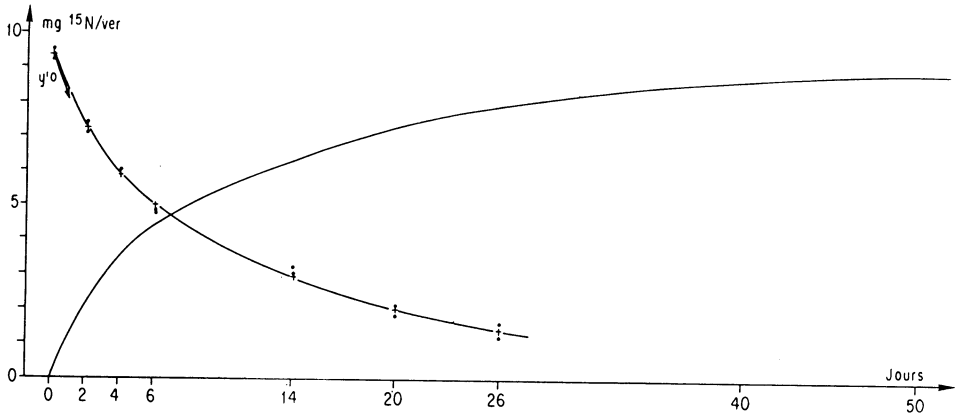
mg 15N/ver
y'o
10
5
0
0 2 4 6 14 20 26 40 50
Jours

Fig. 1

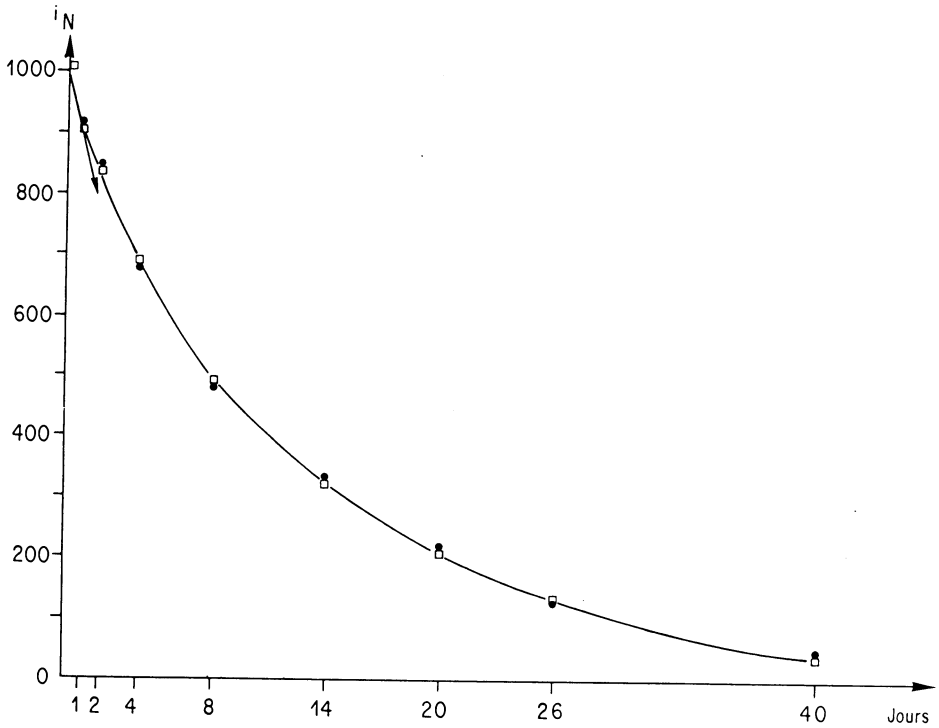
iN
1000
800
600
400
200
0
1 2 4 8 14 20 26 40
Jours

Fig. 2

TABLEAU I

Émanation de l'azote : résultats bruts de l'expérience conduite au laboratoire (sur 4 individus : I et leur moyenne $\bar{x}$)

Emanation of nitrogen: raw results of the laboratory trial (data from 4 individuals: I and the mean value $\bar{x}$)

	I	0	2	4	6	14	20	26
N total (mg)	1	34,9	35,6	34,8	35,1	39,8	41,7	39,0
	2	39,0	36,4	32,0	33,7	35,9	29,8	37,7
	3	35,5	32,8	36,6	36,8	33,9	36,6	32,0
	4	37,6	32,5	38,0	30,7	33,2	35,2	31,4
	$\bar{x}$	36,8	43,3	35,4	34,1	35,7	35,8	35,0
^{15}N (mg)	1	9,4	7,3	5,9	4,8	2,9	2,1	1,1
	2	9,4	7,1	5,9	4,8	3,2	1,9	1,3
	3	9,4	7,3	6,3	4,7	2,9	2,0	1,3
	4	9,3	7,3	6,0	4,9	2,7	1,9	1,6
	$\bar{x}$	9,4	7,3	6,0	4,8	3,0	2,0	1,3

TABLEAU II

Mesure écophysiologique du débit d'émanation de l'azote. Résultats bruts (sur 4 individus : I et leur moyenne $\bar{x}$).

Ecophysiological measures of the nitrogen emanation. Observed data (from 4 individuals: I and the mean value $\bar{x}$)

	I	0	1	2	4	8	14	20	26	40
N total (mg)	1	34,7	34,9	34,7	43,3	34,2	35,1	34,3	34,2	34,6
	2	35,1	34,6	35,0	34,5	34,0	35,0	34,8	33,8	35,1
	3	36,4	34,4	34,0	34,3	34,7	34,9	35,1	36,0	34,1
	4	33,6	35,6	34,1	35,2	36,0	34,2	(1)	34,4	34,4
	$\bar{x}$	35,0	34,9	34,5	36,8	34,7	34,8	34,7	34,6	34,6
^{15}N (mg)	1	9,9	9,0	8,2	6,8	4,4	3,3	2,1	1,3	0,6
	2	9,9	8,8	8,1	6,9	4,7	3,2	2,1	1,2	0,6
	3	8,9	8,9	8,1	7,0	4,6	3,3	2,0	1,2	0,5
	4	10,0	8,9	7,9	6,8	4,5	3,2	(1)	1,2	0,6
	$\bar{x}$	9,7	8,9	8,1	6,9	4,6	3,2	2,1	1,2	0,6

(1) Ver non retrouvé.

Au cours de l'élevage en nutrition « normale », la quantité individuelle de ^{15}N a diminué régulièrement

Le meilleur ajustement obtenu donne une fonction en double exponentielle (différentes fonctions mathématiques ayant été éprouvées) :

$$y = e^{-0,061\ x+1,904} + e^{-0,368\ x+0,981},$$

qui semble témoigner qu'il y a deux ensembles d'azote corporel ayant des dynamiques sensiblement différentes (azote métabolisé + azote constitutif recyclé ?). La dérivée à l'origine (lorsque les animaux sont marqués de façon homogène, c'est-à-dire avant substitution par une fraction d'assimilat à l'azote naturel) est $y'(0) = -1,391$ ce qui montre que les échanges assimilation = excrétion (les variations pondérales d'azote total étant négligeables) sont de 149 mg/g d'azote corporel/jour.

La fonction mathématique permet de constater qu'à 40 ou 50 jours (*fig.* 1), la fraction d'azote initial restant dans le corps depuis le premier jour, dans les conditions de laboratoire, est négligeable (respectivement 6,2 et 3,4 %), et que son débit d'échange tend vers 0 (vers l'horizontale). D'où l'utilisation de ce constat pour marquer des animaux le plus brièvement possible dans les conditions de laboratoire, à partir de leur capture au terrain et avant leur relâchage (*cf* : matériel et méthodes).

(2) Échange d'azote naturel contre l'azote corporel initialement marqué de *N. longus* replacés dans leur milieu après comarquage.

Les adultes capturés, colorés, marqués de façon quasi totale en ^{15}N pendant 50 jours ont été relâchés, recapturés et analysés.

Le tableau II donne les résultats analytiques bruts (1 individu non retrouvé le 20e jour).

Les résultats sont présentés cette fois en fonction de l'azote total (pour 1 000) dont le marquage permet d'établir la substitution par le double processus d'assimilation d'azote naturel et d'excrétion de produits azotés d'origine corporelle. Les données ont été corrigées en tenant compte du taux naturel de ^{15}N des lombriciens de la même espèce (0,3... %).

La figure 2 montre la dynamique de départ de l'azote corporel initialement marqué, les valeurs moyennes observées (points) et les valeurs ajustées selon la meilleure fonction qui est :

$$y = e^{-0,218\ x+5,571} + e^{-0,064\ x+6,613}.$$

Le débit d'échange calculé sur l'animal avec marquage uniforme (à l'origine) est de : $y'0 = -105$ ou 105 mg/g N corporel/jour.

Discussion et conclusion. — Pour la première fois sur un animal du sol, il a été possible d'effectuer directement une mesure du débit d'un élément chimique. Ce résultat diffère sensiblement des estimations très hypothétiques antérieures fondées sur des animaux placés dans des conditions étranges (animaux baignant dans l'eau et maintenus à température élevée). Ramenés aux mêmes températures, selon une loi Q_{10} comme cela a été fait [2], nos résultats apparaissent, à températures comparables, environ 10 fois supérieurs.

Connaissant le débit normal observé au terrain, nous pouvons toutefois nous demander si notre résultat au laboratoire est cohérent avec celui du terrain. La comparaison est délicate car nous ne connaissons pas précisément le Q_{10} de ces animaux qui pour les lombriciens semble se situer dans l'intervalle de 1,7 à 2,8, de sorte que la valeur 2 est couramment retenue [12]. Un ajustement d'activité observée directement au terrain à Cîteaux, sur la même espèce, conduit à un Q_{10} de 2,2. La température corporelle, celle des lombriciens durant l'expérience de température, nous est d'autre part inconnue. En

retenant la température moyenne du sol à -10 cm (8°C) dans la prairie, nous obtenons en comparaison avec les données obtenues au laboratoire.

$$\mathrm{Log}\,Q_{10} = \frac{10}{\theta_2 - \theta_1}\,\mathrm{Log}\frac{D1}{D2} = \frac{10}{15-8}\,\mathrm{Log}\frac{149}{105} = 1{,}6$$

(D 1 = débit prairial considéré à la température du sol θ_1, D 2 = débit de « laboratoire » à la température θ_2).

Constatons que cette valeur de Q_{10} ne s'écarte sensiblement pas de celle observée et indiquée ci-dessus. Elle apparaît plutôt faible, probablement en raison de l'absence de « travail » pour des animaux placés au laboratoire dans un sol meuble et avec nourriture *ad libitum*.

On peut à l'inverse chercher à connaître la température corporelle au terrain en adoptant un $Q_{10} = 2$:

$$\mathrm{Log}\,2 = \frac{10}{15-\theta_1}\,\mathrm{Log}\frac{149}{105} \quad \text{soit } \theta_1 = 9{,}9°\mathrm{C}.$$

Ce résultat est plausible car nos mesures de température corporelle faites dans une autre expérience ont montré un comportement d'optimisation thermique de l'espace conduisant *N. longus* à un choix dans le gradiant thermique de ses galeries subverticales tendant vers 12-13°C. Dans les conditions prairiales printanières de l'expérience, cela suggèrerait que l'animal se tiendrait plutôt au-dessus de -10 cm dans les horizons les plus réchauffés.

Ne pouvant attendre de la loi du Q_{10} une rigueur très grande et l'utilisant dans des conditions imprécises, nous pouvons retenir un Q_{10} de l'ordre de 1,6 à 2,2 et une température corporelle de 8 à 10°C au terrain et surtout conclure que les données de laboratoire ne diffèrent pas ici très sensiblement des résultats observés dans la nature, si ce n'est par une certaine diminution du métabolisme.

Remise le 22 avril 1985, acceptée après révision le 30 septembre 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] M. B. BOUCHE, *Ecol. bull. (Stockholm)*, 25, 1977, p. 157-163.
[2] J. E. SATCHELL, in *Soil organisms*, J. DOEKSEN et J. VAN DER DRIFT éd., 1963, p. 60-66.
[3] J. MICHON, *Thèse*, Poitiers, 1954, p. 1-192.
[4] J. C. HEIDET et M. B. BOUCHE, *Int. Symp. on Earthworms* (Bologne) (sous presse).
[5] M. B. BOUCHE, *Int. Symp. on Earthworms* (Bologne) (sous presse).
[6] U. MEINHARDT, *Nach. Deut. Pflanzenschutz*, 28, 1976, p. 84-86.
[7] D. MAZAUD et M. B. BOUCHE, in *Soil biology as related to land use practives*, D. L. DINDAL éd., 1980, p. 687-701.
[8] W. A. KRATZ et J. MYERS, *Ann. J. Botany*, 42, 1955, p. 282-287.
[9] K. C. TOVEY, G. H. SPILLER, K. G. OLDHAM, N. LUCAS et N. G. CARR, *Biochem. J.*, 142, 1974, p. 47-56.
[10] J. M. BREMMER et A. D. EDWARDS, *Soil Sci. Sc. Amer. Proc.*, 29, 1965, p. 504-507.
[11] J. A. NELDER et R. MEAD, *The Computer Journal*, 7, 1965, p. 308-313.
[12] M. E. MALDAGUE, *Thèse, Etud. Agron. Congo*, 1970, p. 1-245.

G. F. : *Muséum d'Histoire naturelle*, 21000 *Dijon;*
M. B. B. : *Laboratoire de Zooécologie du Sol,*
C.E.P.E., C.N.R.S./I.N.R.A., B.P. n° 5051, 34000 *Montpellier Cedex.*