

Unité d'Entomologie
Fonctionnelle et Evolutive
Pr. E. Haubrûge



Rapport sur l'état d'avancement de ma thèse de doctorat en vue du dépôt de l'essai

ZIRBES LARA

Unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive
Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech
Passage des Déportés, n°2
5030 Gembloux

1. Résumé du projet FRIA

Ce projet a été réalisé dans le but de comprendre les interactions existant entre la moisissure *Geotrichum candidum* d'une part, et le ver rouge *Eisenia fetida* d'autre part. En effet, la réalisation de mon travail de fin d'études a permis de mettre en évidence que le filtrat de culture de cette moisissure était significativement (p-value inférieure à 0,001) attractif pour *E. fetida*. La compréhension de cette attraction permettrait d'optimiser l'utilisation d' *E. fetida* notamment dans le domaine de la lombriculture.

La première étape a été de mettre au point un olfactomètre à 4 voies (Figure 1) et de le valider afin de déterminer son efficacité à étudier le comportement d' *E. fetida* vis-à-vis des filtrats de culture de la moisissure.

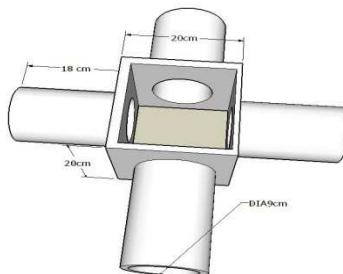


Figure 1: Olfactomètres à 4 voies

La deuxième étape a consisté à rechercher la molécule synthétisée par la moisissure qui est responsable de l'attraction d' *E. fetida*. Dans cette optique, les expériences se sont axées sur les molécules organiques volatiles.

Enfin, une application industrielle est envisagée: la mise au point d'un système d'extraction d' *E. fetida* dans le cadre du lombricompostage.

2. Mise en élevage des vers

Les vers de terre utilisés pour ce projet appartiennent à l'espèce *Eisenia fetida* et proviennent de la société Euroboros s.a. *E. fetida* est mis en élevage dans une salle conditionnée de l'Unité d'entomologie fonctionnelle et évolutive (GxABT). Les vers de terre sont placés dans des bacs en plastique avec couvercle (42cm de longueur, 30cm de largeur et 10cm de hauteur) remplis avec environ 3,6kg de terreau universel DCM. Le contenu des bacs est entièrement renouvelé tous les 2 mois.

Afin de maintenir une humidité convenable pour les vers, chaque bac est arrosé une fois par semaine. Vingt trous sont percés dans chaque bac dans le but d'évacuer le trop plein d'eau qui entraînerait l'anaérobiose du milieu, et de fournir une aération suffisante au système.

3. Modification de l'olfactomètre à 4 voies et sa validation

Afin d'éviter que certains vers se retrouvent piégés dans la partie inférieure centrale de l'olfactomètre à 4 voies, une plaque en plexiglas a été placée à la base des ouvertures vers les 4 voies. Une fois modifiés, les olfactomètres sont testés dans l'étude du comportement d'*E. fetida* vis-à-vis des jus de culture de la moisissure (Figure 2). 20 vers ont été placés au centre de l'olfactomètre et 25 ml d'attractant dans un bras de l'olfactomètre à 4 voies rempli de terreau universel DCM (6 répétitions).

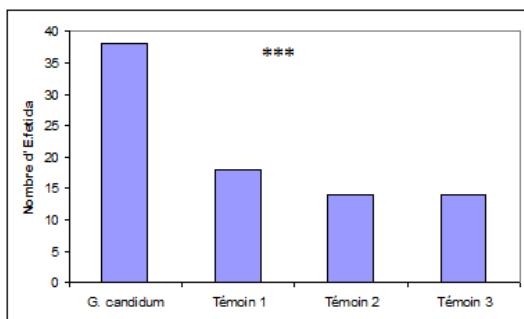


Figure 2: Comportement d'*E. fetida* vis-à-vis du jus de culture de *G. candidum* ($a, p = 0,000$) après 24h dans un olfactomètre à 4 voies.

Un test χ^2 d'ajustement est réalisé afin de comparer la distribution observée à une distribution théorique, distribution observée si le choix des vers était dû au hasard c'est-à-dire que chacune des voies aurait la même probabilité d'être visitée.

La figure 2 met en évidence que les changements apportés à l'olfactomètre à 4 voies ne modifient pas le comportement d'*E. fetida* vis-à-vis de la moisissure d'intérêt.

Le milieu 863 sans microorganisme a été testé afin de voir si ce n'est pas le milieu dans lequel se trouvent les moisissures qui attirent les vers.

4. Interaction vers de terre – moisissures du sol

Pour rappel, *Eisenia fetida* est attiré par le jus de culture de *G. candidum*. Afin de comprendre cette attraction, les molécules volatiles du jus de culture de cette moisissure du sol ont été étudiées. Une technique de prélèvement a été utilisée : le prélèvement passif par SPME avec une fibre CAR/PDMS.

Après affinement de la méthode de prélèvement et du programme de température GC/MS, plusieurs répétitions ont été réalisées avec une fibre CAR/PDMS et une colonne apolaire Factor Four sur le GC/MS. Les 18 molécules détectées sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1: Identification des molécules volatiles de *G. candidum* par GC/MS après prélèvement par SPME

Molécules	Tr
Acetic acid, ethyl ester	2,37
2-méthylpropan-1-ol	2,52
Ethyl propionate	3,38
3-méthylbutan-1-ol	4,08
2-méthylbutan-1-ol	
Propanoic acid, 2-méthyl, ethyl ester	4,28
Molécule n.i.	4,33
Molécule n.i.	4,53
Butanoic acid, ethyl ester	5,09
2-Butenoic acid, ethyl ester	6,07
Butanoic acid, 2-méthyl, ethyl ester	6,16
Butanoic acid, 3-méthyl, ethyl ester	6,28
Ethyl pentanoate	7,54
2-butenoic acid, 3-méthyl, ethyl ester	8,22
2-butenoic acid, 2-méthyl, ethyl ester	8,64
3-octanone	10,03
Hexanoic acid, ethyl ester	10,39
2-hexenoic acid, ethyl ester	11,77

Deux témoins (milieu de culture sans moisissure et vial sans échantillon) ont été réalisés et permettent d'affirmer que ces molécules volatiles sont bien produites par la moisissure.

Parmi les 16 molécules identifiées, 8 molécules (celles commercialement disponibles) ont été testées (10 répétitions) dans l'olfactomètre à 4 voies afin de déterminer si elles sont impliquées dans l'attraction des vers de terre. Pour ce faire, 1ml de chaque molécule est placé sur 50g de terreau DCM dans un des bras de l'olfactomètre. Les 3 autres bras sont les témoins et ne contiennent que du terreau. L'olfactomètre est ensuite entièrement rempli de terreau et 20 vers sont déposés dans la partie centrale de ce dispositif. Le nombre de vers dans chaque bras est déterminé après 24h. Les résultats sont repris dans le tableau 2.

Tableau 2: Etude du comportement des vers de terre vis-à-vis de 8 molécules identifiées en GC/MS

Molécules testée	Attraction
2-méthylbutan-1-ol	x
3-méthylbutan-1-ol	x
2-méthylpropan-1-ol	x
3-octanone	x
Acétate d'éthyle	x
Propionate d'éthyle	x
Pentanoate d'éthyle	♦
Hexanoate d'éthyle	♦

x = absence d'attraction

♦ = attraction

L'analyse des résultats montre que deux molécules (le pentanoate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle) produites par la moisissure *G. candidum* sont attractives pour le ver de terre *E. fetida*.

Afin de s'assurer que la perception des molécules est d'ordre olfactif et non pas cutané, une grille métallique a été placée à mi distance dans chaque bras et l'expérience est répétée avec le pentanoate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle en déposant les molécules sur un papier filtre. L'analyse des résultats montre qu'*E. fetida* est toujours attiré par ces 2 molécules et qu'ils perçoivent donc bien les molécules volatiles.

Ensuite, différentes quantités de ces 2 esters ont été testées dans les olfactomètres en présence des vers afin de déterminer leur seuil de détection des molécules. Le tableau 3 reprend les résultats obtenus.

Tableau 3: Résultats de l'attraction des vers de terre pour différentes quantités d'esters. - absence d'attraction, ◇ attraction

Molécules	Quantité	Attraction	p-valeur
Pentanoate d'éthyle	1µl	◇	0.032
	10µl	◇	0.006
	100µl	◇	< 0.001
	1000µl	◇	< 0.001
Hexanoate d'éthyle	1µl	◇	0.030
	10µl	-	0.67
	100µl	◇	< 0.001
	1000µl	◇	< 0.001

5. Application industrielle

Une des applications industrielles proposée dans la réalisation de cette thèse de doctorat est la mise au point d'un système d'extraction d'*E. fetida* dans le cadre du lombricompostage.

Des expériences ont été réalisées sur la distance à laquelle les vers pouvaient être attirés et sur l'influence de la densité des vers sur l'attraction du jus de culture de *G. candidum*.



Figure 3 : Olfactomètre vertical

Un olfactomètre vertical (Figure 3) a été mis au point afin de déterminer si les vers étaient capables de monter dans le tube quand le jus de culture était présent et jusqu'à quelle distance.

Trois distances ont été testées: 25cm, 42cm et 105cm. Le comportement des vers a été étudié en présence (25ml de jus de culture dans le haut de l'olfactomètre) et en absence de jus de culture afin de pouvoir faire une comparaison. Après 24h, le nombre de vers dans les 5cm de la partie supérieure de l'olfactomètre est déterminé. Pour la distance de 105cm, les vers sont comptés après 65h. 18 répétitions ont été réalisées pour chaque traitement (avec ou sans moisissures). Les résultats obtenus pour la distance de 105cm sont représentés par la figure 4.

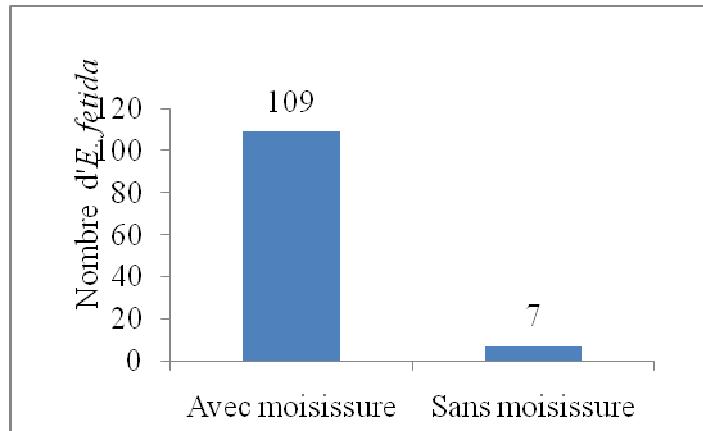


Figure 4: Attraction de 10 vers dans un olfactomètre vertical de 105 cm en présence et en absence de *G. candidum*

L'analyse des résultats montre qu'*E. fetida*, un ver de terre épigé se déplaçant naturellement horizontalement, est capable de modifier son comportement face à une source de nourriture attractive et ce sur une distance de 1m. En absence de source de nourriture, le ver n'atteint pas la partie supérieure de l'olfactomètre.

Ces résultats sont particulièrement intéressants pour la mise en place du système d'extraction des vers de terre hors du lombricompost. On pourrait imaginer qu'après lombricompostage, des tubes contenant la moisissure soient placés à la surface du lombricompost afin que les vers montent dans ces tubes et puissent ainsi être récupérés.

Ensuite, six densités de vers (5, 10, 20, 40, 80 et 160 vers) ont été étudiées dans les olfactomètres à 4 voies afin de déterminer l'impact de la densité sur l'attraction des vers par le jus de culture de *G. candidum*. Les vers sont placés au centre de l'olfactomètre après que 25ml de jus de culture aient été placés dans un des bras de l'olfactomètre. Le reste du système est rempli avec du terreau. Après 24h, le nombre de vers dans chaque bras est déterminé. Quelle que soit la densité, l'attraction des vers de terre par le jus de culture de *G. candidum* est vérifiée (test χ^2 d'ajustement, $p = 0,000$). L'impact de la densité sur cette attraction est alors évalué par une analyse de la variance à un facteur. Le pourcentage moyen de vers

présent dans le bras de l'olfactomètre contenant la moisissure est déterminé pour chaque densité (Tableau 4).

Tableau 4: Pourcentage moyen de vers ayant choisi le bras de l'olfactomètre traité avec *G. candidum* en fonction de la densité de vers de départ

Densité des vers	Pourcentage des vers dans le bras traité (%)
5	72
10	61
20	53,1
40	64,5
80	56,3
160	75,1

L'analyse statistique montre qu'il y a une différence significative du pourcentage de vers dans le bras traité en fonction de la densité. Une structuration de moyenne met en évidence que les densités de 5, 10, 40 et 160 vers donnent les plus grands pourcentages de vers dans le bras de l'olfactomètre avec moisissure.

Après avoir montré que les vers de terre sont attirés sur une distance de 1m par le jus de culture de *G. candidum* et ce quelle que soit la densité des vers (de 5 à 160 vers), des essais d'extraction de vers de terre sont réalisés en laboratoire. Cinq cm de terreau ainsi que 200 vers de terre (100 matures – 100 immatures) sont placés dans un bac en PVC (56 x 36 x 8 cm). Un 2^e bac en PVC (37 x 26 x 9 cm) comprenant 5 fentes de 30 cm de long et 0,5cm de large dans le fond est déposé à la surface du 1^{er} bac. Dans le bac du haut, 275ml de jus de culture de *G. candidum* sont versés. Après 120h, le nombre de vers de terre récupérés est compté dans le bac supérieur. L'analyse des résultats montrent que significativement plus de vers sont récupérés lorsque le jus de culture est présent (Figure 5). En effet, 89,5% des vers sont en moyenne récupérés en présence de jus de culture alors que seulement 43% le sont en absence du jus de la moisissure. Ces résultats sont particulièrement intéressants pour la mise en place du système d'extraction des vers de terre hors du lombricompost.

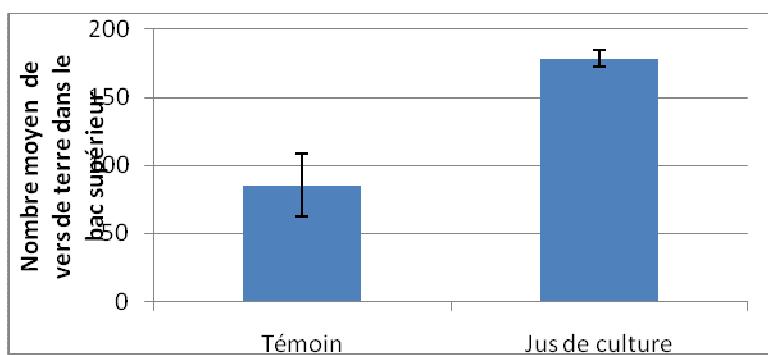


Figure 5: Nombre de vers de terre récupérés dans le bac supérieur

Suite à ces expériences, une augmentation de poids est observée. Une expérience pour étudier l'influence du jus de culture sur la croissance des vers de terre est mise en place. Six caisses sont remplies avec 1335 g de terreau et 10 vers sont placés dans chacune des boites. Les vers de terre utilisés lors de cette expérience ont au départ un poids moyen de 0,163g. Dans 3 des 6 caisses 275ml de jus de culture de *G. candidum* sont ajoutés, les 3 autres boites constituent les témoins. Après 8 semaines, le poids des vers pour chaque traitement est mesuré et comparé. L'analyse des résultats montre que le poids des vers est significativement plus important lorsque du jus de culture est ajouté au terreau (Figure 6). Dans les 2 cas, une augmentation du poids est observée mais le gain de poids est un peu plus que doublé en présence de jus de culture.

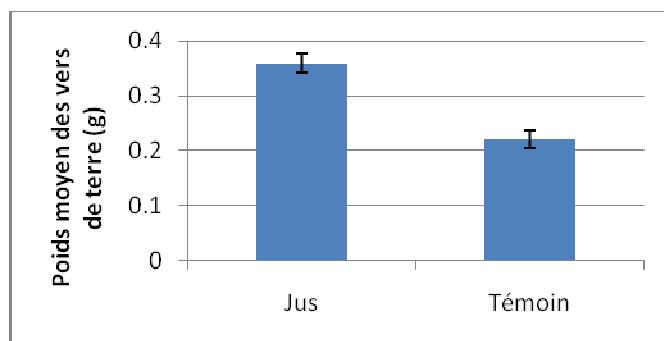


Figure 6: Résultat de la croissance d'*E. fetida* en présence et en absence de jus de culture dans le terreau

Ces résultats montrent que le jus de culture est à la fois utile dans l'extraction des vers de terre mais peut également être un stimulant de la croissance des vers de terre.

Un article intitulé “**Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil**” par Lara Zirbes, Mark Mescher, Véronique Vrancken, Jean-Paul Wathelet, François J. Verheggen, Philippe Thonart Eric Haubrige regroupant l'ensemble de ces résultats a été publié dans le journal Plos One en 2011.

6. Etude de l'agrégation des vers

Lors de la réalisation de mon travail de fin d'études, la formation de boule de vers de terre a été observée (Figure 7). De plus, dans les bacs d'élevage, il est fréquent de retrouver les vers les uns à proximité des autres. Sur base de ces observations, l'étude d'un éventuel comportement agrégatif des vers est entreprise en collaboration avec Monsieur le Professeur Deneubourg de l'ULB.



(a)

(b)

Figure 7: Observation d'un comportement éventuellement agrégatif des vers, (a) en milieu non naturel, (b) en milieu naturel

Le mécanisme de formation d'une boule de vers de terre est étudié. Pour ce faire, différentes densités de vers de terre (1, 2, 5 et 10 vers) sont placés au centre d'une boîte de Pétri de 19cm de diamètre. Par l'intermédiaire d'une caméra, le nombre de vers de terre qui quittent le centre de la boite ainsi que le temps mis pour le faire sont déterminés sur une période de 1h30. L'analyse des résultats montre que le temps pour que le 1^{er} ver quitte le centre de la boite de Pétri est significativement différent en fonction de la densité de départ (One way ANOVA, $p < 0,001$). En effet en moyenne, un ver tout seul quitte le centre de la boite après une durée de 6,39 min, pour un groupe de 2 vers, le 1^{er} quitte le centre après 18, 92 min. Pour un groupe de 5 vers, le 1 ver quitte le centre après 61, 82 min alors que cette durée est de 76,07 min pour un nombre de 10 vers de terre au départ. Cette expérience montre que la rétention physique entre individus joue un rôle important dans la formation d'un agrégat statique de vers de terre. Cette expérience met aussi en évidence que lorsque qu'un ver quitte un groupe il favorise le départ des autres vers de terre du groupe. Cependant, ce phénomène est fortement minimisé pour des groupes de 10 vers où le départ du premier n'influence que très rarement le départ des autres vers. En effet, sur 30 répétitions, seules 3 montrent le départ d'un 2^e ver et 3^e ver.

Une 2^e expérience est réalisée: différentes densités des vers sont déposées au centre d'une boîte de Pétri (0, 10 et 15 vers) et un ver seul placé à mi-distance entre le centre et le bord de la boîte de Pétri. Le ver isolé rencontre significativement plus souvent le centre de la boîte de Pétri lorsque 15 vers sont présents (Figure 8 ; Chi square test, $\chi^2_2 = 17,03$, $p < 0,001$).

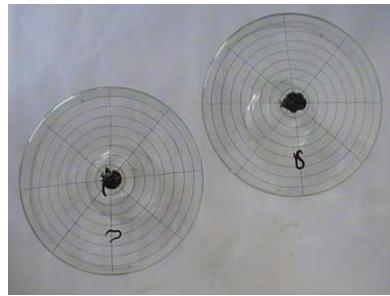


Figure 8 : 15 vers au centre d'une boîte de Pétri et un ver à mi-distance entre le groupe et le bord

Cette expérience met en évidence que l'attraction joue aussi un rôle dans la formation d'un agrégat de vers. Un modèle mathématique a été réalisé par M. Deneubourg (ULB) afin de montrer que la rétention et l'attraction sont deux conditions suffisantes pour entraîner la formation d'une boule de vers de terre.

Un article intitulé “**Cluster formation in *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae)**” par Lara Zirbes, Yves Brostaux, Maxime Jason, Jean-Louis Deneubourg et Eric Haubrige est soumis dans Proceedings of Royal Society B : Biological Science.

Ensuite, plusieurs expériences ont été réalisées afin de déterminer si les vers de terre *E. fetida* avaient bien un comportement collectif et quels mécanismes (piste ou contact) pouvaient être à l'origine de ce comportement. Pour répondre à ces deux questions, des expériences ont été menées dans deux olfactomètres à deux voies. 20 vers sont placés au centre d'un olfactomètre à 2 voies rempli de terreau DCM. Chaque voie contient à son extrémité la même source de nourriture, à savoir un mélange de 25ml de filtrat d'une culture de moisissures de 42h avec 50g de terreau. Après 24h, le nombre de vers dans chaque voie est évalué. L'analyse des résultats montre que le choix d'une direction de vers de terre influence le choix des autres vers de terre. Nous avons ensuite essayé de comprendre comment les vers de terre pouvaient s'influencer. Deux comportements ont été étudiés dans un olfactomètre à 2 voies : le suivi de piste et le contact entre individus. Pour vérifier si il y a présence d'une piste, un ver a été placé dans le dispositif et son choix est observé avant de le retirer du dispositif. Sans rien nettoyer, un 2^e ver est placé dans le dispositif et son choix est observé (45 répétitions). L'analyse des résultats montre que dans 50% des cas, les 2 vers choisissent la même branche et dans 50% des cas, ils font un choix différent. Dans les conditions envisagées, le suivi de piste ne semble pas être à l'origine de l'interaction entre les vers. Dans un 2^e temps, 2 vers sont placés simultanément dans l'olfactomètre à 2 voies et leur choix est observé (45 répétitions). 70% des expériences montrent que les 2 vers de terre choisissent la même

branche en restant en contact. Le contact entre individus est donc impliqué dans le déplacement collectif des vers. Une simulation nous a permis de confirmer ces résultats.

Les résultats ont fait l'objet d'une publication "**A new case of consensus decision: collective movement in soil**" Lara Zirbes, Jean-Louis Deneubourg, Yves Brostaux, Eric Haubrige (2010) publiée dans Ethology.