

2.3.5. Physiologie

2.3.5.1. Activité saisonnière:

Helix aspersa présente un cycle d'activité saisonnière caractérisé par deux stades dont la période et la durée sont pour un lieu géographique donné, relativement stable d'une année sur l'autre (Bailey, 1981). L'escargot est un poikilotherme, il peut régler sa température corporelle et adapter, en climat tempéré aux variations thermiques saisonnières selon trois rythmes d'activités annuels marqués par trois états physiologiques :

-l'un se caractérise par un ralentissement du métabolisme et intervient lors des basses températures hivernales: l'hibernation.

Hibernation:

L'hiver, lors des basses températures (inférieures à 5°C) et la diminution de la durée du jour; le petit gris entre en vie ralentie: il recroqueville au fond de sa coquille en sécrétant une bave qui se dessèche et obture ainsi l'ouverture de la coquille par des disques minces (épiphragme) et poreux-ce ci limite les pertes en eau qui atteignent cependant 30% du poids frais de l'animal (Bailey, 1981), donc c'est une période de repos, de jeûne prolongé (4 à 6 mois ne s'alimente pas) que l'escargot doit aborder le maximum de réserves . l'hibernation est constante en durée et en période dans une région donnée indépendamment des variations thermohydrométriques Bailey (1981). En effet, la photopériode a un impact spécifiquement sur la croissance et la reproduction (Aupinel et Bonnet, 1996), ce facteur est déjà considéré comme étant l'un des principaux éléments susceptibles d'induire ou d'inhiber l'activité saisonnière et journalière de l'escargot. L'effet positif sur la croissance des longues photophases (15h/jour) (Aupinel et Bonnet, 1996), a été constaté par un grand nombre d'auteurs.

-l'autre s'étend entre le printemps et l'automne, où les conditions climatiques seront favorables. Cette période se caractérise par une reprise des fonctions importantes de la vie de l'animal : l'activité locomotrice, l'alimentation, le déclenchement de la croissance des jeunes et la reproduction des adultes, donc les escargots redeviennent actifs après la rupture de l'épiphragme.

-En été, l'escargot présentera également une période de vie ralentie, appelée: estivation.

-Estivation :

Les conditions climatiques seront défavorables (climat chaud et sec), son activité peut par fois

réduite, il entre en estivation pour se réhydrater, un mucus solidifié est alors secrété devant l'ouverture de sa coquille; c'est un état de résistance ponctuel qui disparaît lorsque les conditions climatiques redeviennent favorables.

2.3.5.2. Activité journalière:

Il a été établi par un grand nombre d'auteurs (Thomas et Chevallier, 1994) un modèle théorique du rythme d'activité nycthéméral de l'escargot en conditions de photopériode "jour long" :

- La première phase d'activité débute la tombée de la nuit et une durée supérieure à 6 heures.
- La phase dite d'inactivité relative à une durée inférieure à 18 heures.
- Une autre phase d'activité, ne concernant pas tous les individus, se produit avant le lever du jour.

2.4. Dissection et prélèvement des organes :

2.4.1. Protocole expérimental

Dans une cuvette dissection, placer un escargot et découper la coquille avec les ciseaux en suivant le bord d'enroulement de la coquille (trait pointillé rose). (Fig. 3).



Figure 3. Coupure de la coquille d'escargot.

- Découper lentement la coquille par petits morceaux et les enlever délicatement avec une pince en évitant de crever le manteau et le poumon situé en dessous .
- Le poumon rose occupant un grand espace .
- La tête est apparaît en avant, prenant les tentacules.
- Le cœur de couleur jaunâtre entouré d'une fine peau: le péricarde.
- A l'arrière du cœur se trouve le rein allongé de couleur jaunâtre avec des veinules brunes.
- Et finalement l'hépatopancréas brun violacé.

- Avec les pinces extraire l'hépatopancréas et déposer le sur le verre de montre ainsi la tête.
- Découper délicatement un petit morceau de l'hépatopancréas et de la tête avec les ciseaux ;on les mit dans des tubes Epindorf contenant respectivement le TCA et la solution détergente, pour les conserver au dosage. (Fig. 4).

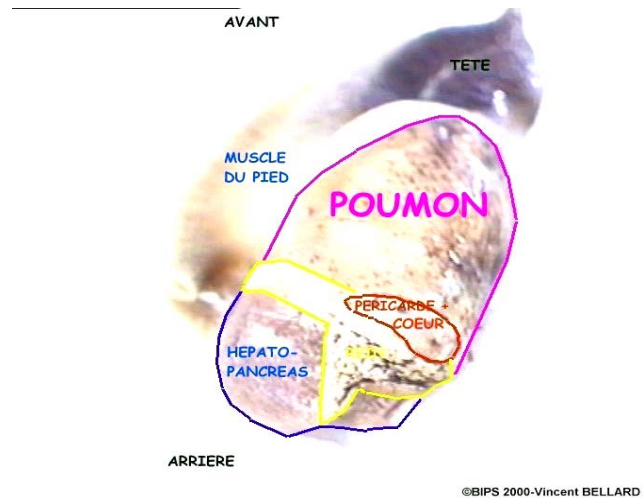


Figure 4. La dissection de l'escargot et prélèvement des organes (tête, hépatopancréas).

2.5. Biométrie des espèces:

Les escargots (*Helix aspersa*) adultes, récoltés au hasard des sites d'étude, une fois par mois. Des mesures biométriques du poids: Les escargots sont pesés à l'aide d'une balance de précision Sortorius H11 (précision 0,1 mg) ; du diamètre (D) et de l'hauteur (L) de coquilles en utilisant le pied à coulisse gradué au 1/10 mm. Ce paramètre constitue un indice révélateur de la croissance des individus, de plus on utilise les méthodes d'identification décrites par Bonnet *et al.* (1990) et Chevallier (1992) se basant sur le nombre de bandes spirales au niveau des coquilles ainsi que la couleur de ces dernières. (Fig. 5).

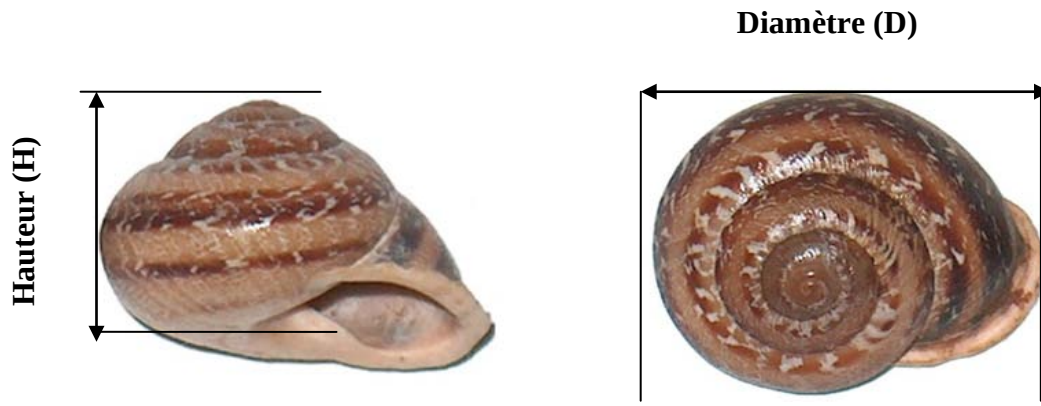


Figure 5. Les paramètres de biométrie mesurés chez l’escargot (hauteur: H; diamètre: D).

2.6. Indices écologiques :

Les indices écologiques qui retiennent notre attention pour l’exploitation de nos résultats sont : la qualité de l’échantillonnage, la richesse totale et moyenne, la fréquence, la constance, l’indice de Shannon-Waeber et l’indice d’équirépartition.

2.6.1. Indices de composition

2.6.1.1. Richesse spécifique (ou totale) et moyenne

La richesse totale d’un peuplement est le nombre d’espèces (**S**) rencontrées dans la région d’étude, tandis que la richesse moyenne (**S'**) est le quotient du nombre total d’individus (**Ki**) pour chacune des espèces sur le nombre total de relevés (**N**) effectués, C’est-à-dire :

$$S' = Ki / N.$$

2.6.1.2. Fréquence centésimale (F):

La fréquence (**F**) permet d’étudier la distribution d’une espèce dans une région donnée et de dire si elle est commune, rare ou très rare.

Elle est donnée par la formule suivante : $F = (ni \cdot 100) / N$

ni : le nombre d’individus de l’espèce prise en considération.

N : le nombre total d’individus.

-**Espèce commune** : présente dans plus de 50 % de relevés.

-**Espèce rare** : présente dans 25 à 50 % de relevés.

-**Espèce très rare** : présente dans moins de 25 % de relevés.

2.6.1.3. Constance (C):

La constance (**C**) est le rapport exprimé sous la forme de pourcentage du nombre de relevés contenant l'espèce **i** prise en considération, divisé par le nombre total de relevés (Dajoz, 1985) ; elle s'exprime de la manière suivante : $C = p / N \times 100$.

P : le nombre de relevés contenant l'espèce.

N : le nombre de relevés effectués.

Selon la valeur de **C**, on distingue les catégories suivantes :

-**Espèce omniprésente** si $C = 100 \%$.

-**Espèce constante** si $75 \% \leq C < 100 \%$.

-**Espèce régulière** si $50 \% \leq C < 75 \%$.

-**Espèce accessoire** si $25 \% \leq C < 50 \%$.

-**Espèce accidentelle** si $5 \% \leq C < 25 \%$.

-**Espèce rare** si $C \leq 4 \%$.

2.6.2. Indices de structures

2.6.2.1. Indice de diversité de Shanon – Weaver

L'indice de diversité de Shanon et Weaver (**H'**) est la quantité d'information apportée par un échantillon sur les structures du peuplement dont provient l'échantillon et sur la façon dont les individus y sont répartis entre diverses espèces (Daget, 1976). L'indice de diversité se calcule comme suit :

$$H' = - \sum_{i=1}^n [p_i \cdot \text{Log}_2 p_i] \quad \text{ou } p_i = n_i / N$$

H' : Diversité spécifique.

N : Effectif total du peuplement.

n_i : Effectif de l'espèce (**i**).

Une valeur élevée de cet indice correspond à un peuplement riche en espèce, dont la distribution d'abondance est équilibrée. A l'inverse, une valeur faible de cet indice correspond soit à un peuplement caractérisé par un nombre d'espèces faible pour un nombre d'individus élevé, soit à un peuplement dans lequel il y'a une espèce dominante.

2.6.2.2. Equitabilité (équirépartition)

L'équitabilité (**E**) constitue une seconde dimension fondamentale de la diversité (Ramade, 1984). Elle est le rapport entre la diversité spécifique (**H'**) et la diversité maximale (**Hmax**), elle s'exprime comme suit :

$$E = H' / H_{\max} \quad \text{avec } H_{\max} = \text{Log}_2(S)$$

S : étant le nombre d'espèces formant le peuplement.

L'équitabilité permet de comparer les structures des peuplements. La valeur de (**E**) varie de 0 à 1 ; elle tend vers 0 quand les différentes populations ne sont pas en équilibre entre elles et lorsque la quasi-totalité des effectifs est concentrés sur une espèce, elle tend vers 1 quand il existe un équilibre entre les populations et lorsque les espèces ont une même abondance.

2.7. Mesure des biomarqueurs :

Les échantillons utilisés pour le dosage des biomarqueurs sont des escargots bordés (*Helix aspersa*), prélevés au hasard des sites d'étude. Les dosages ont été effectués sur des individus vivants, après la dissection, on prélève les organes : tête et hépatopancréas (glande digestive).

Le dosage des deux biomarqueurs GSH et AChE est effectué au niveau des différents tissus des organes : l'hépatopancréas et la tête respectivement. L'activité spécifique des biomarqueurs est exprimée par rapport aux protéines dont le dosage est réalisé selon Bradford (1976).

2.7.1. Dosage du glutathion

Le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, cystéine et glucine. Le GSH est requis pour l'activité de plusieurs enzymes, il participe avec le glutathion réductase à l'établissement de ponts disulfures dans de nombreuses protéines et dans des hormones polypeptides et prend part au métabolisme des xénobiotiques présents dans la majorité des tissus. Le glutathion joue un rôle principal dans la réduction de tout peroxyde organique, en présence de glutathion peroxydase (GPX).

Le glutathion est dosé selon la méthode de Weckberker & Cory (1988) qui repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro 5-mercaptopurique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman) par les groupements thiol (-SH) du glutathion.

Le dosage s'effectue après homogénéisation pendant 30 secondes des échantillons (des fragments de l'hépatopancréas) dans 1 ml d'une solution EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0,02 M [7,4448 g EDTA et 1000 ml d'eau distillée] à l'aide d'un ultrason (Sonifer B-30). afin de protéger les groupements thiol du glutathion.

L'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) 0,25 % [0,25 g d'ASS ,100 ml d'eau distillée] ou' 0,2 ml du ASS sont additionnés à 0,8 ml d'homogénat. Le mélange est vortexé (agitation) et laisser pendant 15 mn dans un bain de glace ; puis centrifugé à 1000 tours/mn pendant 5 mn.

Une aliquote de 500 µl du surnageant récupérée est ajoutée à 1 ml du tampon Tris-EDTA (0,02 M ; pH 9,6) [63,04 g Tris ;7,4448 g EDTA et 1000 ml d'eau distillée] et 0,025 ml de DTNB (5-5' dithio-bis-2-nitrobenzoïque) (0,01 M) [3,96 g DTNB,1000 ml méthanol absolu]. Le mélange est laissé pendant 5 mn à température ambiante pour la stabilisation de la couleur, contre un blanc ou' les 500 µl du surnageant sont remplacés par 500µl eau distillée. La lecture des densités optiques s'effectue à 412 nm.

Le taux de glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$\text{Taux du GSH } (\mu\text{M/mg de protéines}) = \frac{DO \times 1 \times 1,525}{13,1 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg de protéines}}$$

DO : densité optique.

1 : le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation du (0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat).

1,525 : le volume total des solutions utilisées dans du GSH (0,025 ml DTNB +0,5 ml surnageant + 1 ml Tris-EDTA).

13,1 : coefficient d'absorbance (concernant le groupement –SH à 412 nm).

0,8 : le volume de l'homogénat utilisé en ml.

0,5 : le volume du surnageant utilisé en ml.

mg de protéines : les protéines en mg.

2.7.2. Dosage de l'acétylcholinestérase :

La méthode de dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) la plus courante (Ellman *et al.*, 1961) consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'AChE catalyse l'hydrolyse de

l'acétylcholine et libère de la thiocholine (SCh) et de l'acide . La quantité de thiocholine obtenue est proportionnelle à l'activité enzymatique, la thiocholine libérée agit avec l'acide 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoate (DTNB) pour former un complexe (produit) de couleur jaune que l'on dose à 421 nm.

La mise au point d'un réactif spécifique des groupements thiols, le DTNB a permis la réalisation d'un protocole qui utilise comme un substrat de la réaction un dérivé soufré de l'acétylcholine, dont l'hydrolyse libère des groupements sulfhydriques quantifiable par spectrophotométrie .

Le principe de la réaction est décrit ci-après :



Les échantillons (fragments de la tête) sont homogénéisés pendant quelques secondes dans 1 ml de la solution détergente [38,03 mg éthylène glycol tris-béta aminoéthyl-éther N N N'N' ou EGTA, 1 ml Triton X 100%, 5,845 g Na Cl, 80 ml tampon tris 10 mM, pH 7] à l'aide d'un homogénéiseur à Ultrason (Sonifer B-30), puis centrifugés à 5000 tours/mn pendant 5 minutes, le surnageant est alors utilisé immédiatement pour la mesure de l'activité de l'AChE ou peut être conservé pendant plusieurs mois (6 mois à 85°).

L'activité spécifique de l'acétylcholinestérase est déterminée comme suit :

100 µl du surnageant sont additionnés à 100 µl de DTNB (0,1 M; PH 8) [39,6 mg de DTNB, 15 mg CO₃ Na, dans 10 ml du Tris 0,1 M, PH 7] et 1000 µl du tampon Tris (0,1 M, pH 7) ; 3 à 5 minutes sont nécessaires pour épuiser la réaction spontanée .100 µl du substrat acétylthiocholine iodide (Sigma R) [118 mg d'Acétylthiocholine dans 5 ml d'eau distillée) sont ajoutés.

La lecture des densités optiques s'effectue à 412 nm toutes les 4 minutes pendant 20 mn contre un blanc où le surnageant a été remplacé par un volume équivalent de solution détergente (100 µl). Les résultats obtenus ont été exprimés en µ M/mn/mg de protéines.

L'activité spécifique de l'acétylcholine est déterminée d'après la formule suivante d'Ellman :

$$X = \frac{\Delta DO}{13,6 \times 10^4} \times \frac{1}{\frac{\text{Volume de l'homogénat}}{\text{Volume total de la cuve}}} \times CO$$

X : activité spécifique de l'AChE en μ Mole ou μ Mole de substrat hydrolysé par minute et par mg de tissu.

ΔDO : densité optique.

$1,36 \times 10^4$: Coefficient d'extinction molaire du DNTB.

CO : Concentration de l'homogénat en protéines (mg /g de tissu).

Volume de l'homogénat : 50 μ l.

Volume totale de cuve : 1000 μ l (50 μ l homogénat + 50 μ l DNTB + 850 Tampon Tris + 50 μ l du substrat d'acétylcholine).

2.7.3. Extraction et dosage des protéines :

Les protéines ont été dosées selon la méthode de Bradford (1976), le dosage s'est effectué sur une fraction aliquote de 0,1 ml de l'homogénat avec 4 ml de Bleu Brillant de Comassie (BBC) (C250, Merk) comme réactif [100 mg de BBC, 50 ml d'éthanol (95%) ,100 ml d'acide ortho phosphorique (85%) et complété à 1000 ml par l'eau distillée] et l'albumine sérum de bœuf (BSA, Sigma) comme standard.

La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm, dans un spectrophotomètre Janway 6300 et la gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère d'albumine de bœuf (1 mg/ml) selon les indications ci-dessous dans le tableau 6.

Tableau 6: La gamme d'étalonnage des protéines.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution d'albumine (μ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μ l)	100	80	60	40	20	0
Réactif (BBC) (ml)	4	4	4	4	4	4

2.8. Analyses physico-chimiques du sol

Préparation du sol

Les échantillons ramenés au laboratoire sont séchés à l'aire libre pendant quelques jours, puis la grande partie a été broyée et tamisée à 2 mm.

2.8.1. Texture :

Elle est réalisée selon la méthode de Gauchers (1968). Pour déterminer la texture du sol, on a utilisé la méthode par saturation qui consiste à mesurer le pourcentage d'humidité du sol (Y) et à le comparer à une échelle qui détermine la texture lui Correspondant (Tableau 7). Tout d'abord on a pris 50 g de sol et on a imbibé d'eau, goutte à goutte tout en mélangeant jusqu'au point où la pâte devienne luisante et glisse doucement lorsqu'on incline le récipient. Ensuite on a suivi les étapes suivantes :

- Peser une capsule vide (P1).
- Prendre une petite quantité de pâte (sol mouillé) et la mettre dans la capsule puis repeser (P2).
- Mettre à l'étuve à 105°C pendant 24 heures.
- Peser une troisième fois la capsule à la sortie de l'étuve (P3), le poids correspond donc au poids de la capsule vide + le poids du sol sec.

La texture est mesurée selon la formule suivante :

$$X1 = P2 - P3 \text{ (poids de l'humidité).}$$

$$X2 = P3 - P1 \text{ (poids du sol sec).}$$

P1 : poids de la capsule vide (g).

P2 : poids de la capsule + sol mouillé (g).

P3 : correspond au poids de la capsule vide + le poids du sol sec après la sortie de l'étuve (g).

Ensuite on applique la règle de trois pour calculer le pourcentage d'humidité :

$$X1 \longrightarrow X2 \text{ g de sol sec}$$

$$Y \longrightarrow 100 \text{ g de sol sec}$$

Enfin comparer (Y) au tableau 7 suivant pour déterminer la texture.

7: Echelle de la texture selon Gauchers (1968).

Pourcentage d'humidité (%)	Texture
<12	Sableuse
12-24	Sablo-limoneuse
24-37,5	Limono-sableuse
37,5-45	Limono-argileuse
45-75	Argilo-limoneuse
>75	Argileuse

2.8.2. Matière organique :

Elle est déterminée selon la méthode d'Anne (1945) selon les étapes suivantes :

On met 0,5 g de sol dans un erlenmeyer, on ajoute 10 ml de bichromate de potassium (8%) avec 15 ml d'acide sulfurique concentré. On laisse bouillir pendant 5 mn sur une plaque chauffante, puis refroidir, transvaser le contenu dans une fiole de 100 ml et ajouter de l'eau jusqu'à trait de jauge.

On prend 20 ml de la solution, on l'ajoute à 100 ml d'eau distillée puis on ajoute 2 à 3 gouttes de diphénylamine et une pincée de Naf. On titre la solution avec le sel de Mohr (0,2 N) jusqu'à virage de la solution qui passera de la couleur violette à la couleur verte, la quantité de sel de Mohr utilisée est **X**.

On fait un témoin dans les mêmes conditions que l'échantillon, mais sans sol, soit **Y** la quantité de sel de Mohr utilisée pour le titrage du témoin. (Tableau 8).

La matière organique est calculée à partir de la relation suivante :

$$C\% = (Y-X) \times 0,615 \text{ mg} \times (100/20) \times (100/P) \times (1/1000).$$

Y : la quantité de sel de Mohr utilisée pour titrer le témoin.

X : la quantité de sel de Mohr utilisée pour l'échantillon à doser.

0,615 : facteur d'équivalence entre le sel de Mohr et le carbone (en mg).

100/20 : on utilise 20 ml à partir de 100 ml.

P : poids du sol sec (1g).

1,72: coefficient de passage du carbone à la matière organique.

$$\% \text{ matière organique} = \% C \times 1,72$$

Tableau 8: Classification des sols d'après leur teneur en matière organique (Solter, 1981).

% de la matière organique	Appréciation
<1	Extrêmement faible
1-1,5	Très faible
1,5-2,5	Faible
2,5-3,5	Moyen
3,5-4,5	Moyennement élevé
4,5-5	Elevé
>5	Très élevé

2.8.3. pH eau :

C'est la mesure de l'acidité d'une suspension de terre dans de l'eau, avec un rapport terre / eau normalisé (1/5). Il indique aussi la concentration en ions « H⁺ » présente dans l'eau. (Morel, 1986). La lecture du pH se fait sur le pH mètre lorsque l'aiguille est stabilisée et après un repos au moins d'une heure. (Ben Amara, 2007). On compare les valeurs du pH selon Gaucher (Tableau 9).

Tableau 9: La gamme de pH des sols (Gauchers et Soltser, 1981).

pH	Désignation des sols
3 - 4,5	Extrêmement acides
4,5 – 5	Très fortement acides
5 - 5,5	Très acides
5,5 – 6	Acides
6 - 6,75	Faiblement acides
6,75 – 7,25	Neutres
7,25 – 8,5	Alcalins
8,5	Très alcalins

2.8.4. Conductivité électrique

La conductivité électrique (salinité) est la mesure du degré de la salinité du sol étudié. La détermination de la conductivité électrique se fait sur extrait de sol (rapport sol / eau=1/5) à l'aide d'un conductimètre (Delaunois, 1976). Les valeurs sont comparées à une étude de salinité, résumées dans le tableau 10.

Tableau 10: Echelle de salinité du sol (USSS, 1981).

Conductivité électrique (ms/cm)	Salure
0 – 0,6	Non salé
0,6 – 1,4	Peu salé
1,4 – 2,4	Salé
2,4 – 6	Très salés

2.8.5. Calcaire :

C'est la mesure du pourcentage du calcaire contenant le sol, selon la méthode de Duchaufour (1970). On a deux types du calcaire :

2.8.5.1. Calcaire total :

Peser 5 g du sol, le mettre dans un erlenmeyer puis ajouter : 10 ml d'acide sulfurique et 15 ml d'HCL (0,5 N). Ensuite mettre l'erlenmeyer sur la plaque chauffante jusqu'à voir la première goutte de la vapeur. Laisser refroidir et filtrer la solution. On prélève 20 ml de filtrat, le verser dans un bécher et on ajoute 2 gouttes de phénophtaléine, titré le mélange par NaOH jusqu'à que la solution aura une couleur rose. Le calcaire total est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{CaCo}_3 = \frac{50 \text{ ml (HCl)} \times 0,5 \text{ N} - X \text{ ml (NaOH)} \times 0,25}{\text{Poids du sol (g)}} \times 5$$

2.8.5.2. Calcaire actif :

Mettre 10 g du sol dans un flacon avec 250 ml d'oxalate d'ammonium (0,2). Ensuite agiter pendant 2 heures à l'aide d'un agitateur mécanique ; on filtre la solution et on prélève 9 ml du filtrat, on complétant par 1 ml d'acide sulfurique et on, puis on titre le mélange par le

permanganate de potassium jusqu'à la coloration rose, avec agitation, le tout sur une plaque chauffante de 60°C.

Le calcaire actif est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Teneur de calcaire actif} = (N - n) \times 12,5$$

N : quantité de permanganate de potassium nécessaire pour titrer le témoin.

n : quantité de permanganate de potassium nécessaire pour titrer l'échantillon, le tableau 11

Présente la Classification des sols selon leurs teneurs en calcaire.

Tableau 11: Classification des sols d'après leurs teneurs en calcaire, Duchaufour (1970).

Calcaire en %	Désignation des sols
0 – 5	Peu calcaire
5 -15	Moyennement calcaire
15 – 30	Calcaire
> 30	Très calcaire

2.8.6. Porosité :

La détermination de la porosité totale des petits agrégats de terre conduit à l'évaluation de la porosité texturale ou l'estimation de la porosité minimale d'assemblage. (Barrius, Andreux et Portal, 1990).

La partie de l'espace poral qui est à l'origine de la diminution de la porosité totale des blocs de terre est due aux fissures et aux canalicules est appelée la porosité structurale. Comprend deux paramètres, la densité apparente (D_a) et la densité réelle (D_r) (Delaunois, 1976).

2.8.6.1. Densité apparente:

Mettre un agrégat de sol (10 à 15 g), dans l'étuve pendant 24 heures à une température de 105°C, puis l'entourer d'un fil à coudre de poids négligeable puis peser l'agrégat (P_1). Puis, plonger l'agrégat dans une solution de paraffine dissoute, pendant 5 à 10 minutes, après peser l'échantillon avec la paraffine (P_2). Ensuite replonger l'agrégat dans une éprouvette de 100 ml contenant un volume (V_t) d'eau distillé 50 ml et noter le changement de volume V_2 (d'agrégat + paraffine).

La densité apparente «**Da**» est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Densité apparente (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{Masse de l'échantillon}}{\text{Volume de l'échantillon}}$$

2.8.6.2. Densité réelle :

Elle exprime la densité des éléments constituant la phase solide du sol, la «Dr» représente la masse du solide / le volume du solide, elle est généralement entre 2,5 g / cm³ et 2,6 g / cm³. (Morel, 1989). La densité réelle «Dr » calculée selon la formule suivante :

$$\text{Densité réelle (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{Masse du sol}}{\text{Volume du sol}}$$

Donc **la Porosité** est le rapport du volume des vides au volume totale, elle peut être exprimée par la formule suivante :

$$\text{Porosité (\%)} = 1 - \frac{\text{Densité apparente}}{\text{Densité réelle}} \times 100$$

La porosité doit être en relation avec la texture :

- Texture sableuse : porosité forte > 30 %.
- Texture sablo-limoneuse : porosité assez forte 20-30 %.
- Texture Limono-argileuse: porosité assez faible 10-20 %.
- Texture Argileuse : porosité faible < 10 %.

2.9. Traitement statistique des données :

Les données obtenues ont été analysées à l'aide d'un logiciel de statistique approprié MINITAB version 13.31 disponible au Laboratoire de Biologie Animale Appliquée. Les résultats sont exprimés sous forme moyenne et en écart type ($m \pm s$). Les différents tests réalisés sont: analyse de la variance à un critère de classification et le Modèle linéaire Généralisé (MLG), suivi du test de Tukey.