

50376
1980
116

N^o d'ordre : 838

50376
1980
116

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

MENTION GEOLOGIE APPLIQUEE



**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU
FRACTIONNEMENT DES ACIDES HUMIQUES**

PAR

Juvenal NTIRUBUZA

Commission d'examen

MM.	P. CELET	Président
	R. BLONDEAU	Rapporteur
	J.P. LAVEINE	Examineurs
	M. MONTUELLE	

Soutenue en juin 1980

"Il importe d'agrandir notre horizon et de ne pas craindre de s'attaquer aux problèmes les plus vastes, sans prétendre à les résoudre nous-même au cours de notre brève existence, mais avec l'ambition de laisser derrière nous un peu moins d'obscurité que nous n'en avons trouvé"

Lecomte du Noüy. (sic)

Au terme de ce travail qui s'est réalisé au Laboratoire de Biologie appliquée, il m'est particulièrement très agréable d'exprimer ma vive reconnaissance à tous ceux qui m'ont permis d'entreprendre ces recherches et de les mener à bien.

Monsieur P. CELET, Professeur de Géologie dynamique à l'Université de Lille I qui m'a très utilement ouvert les portes de son laboratoire après mon second cycle. Il a toujours suivi avec beaucoup d'intérêt la progression de mes recherches en me bénéficiant de ses conseils et de ses remarques pertinentes. Il me fait en outre, le grand honneur de présider mon jury de thèse. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma très profonde gratitude.

Monsieur R. BLONDEAU, Maître-Assistant à l'Université de Lille I ; il m'a confié le sujet de thèse que j'ai traité avec beaucoup de plaisir. Tout au long des trois années d'étude, il m'a constamment suivi, me faisant bénéficier de sa rigueur scientifique et de son souci de la perfection dans les domaines complexes les plus divers allant de la chimie à la géologie, en passant par la biologie. Il a contribué énormément à mon initiation aux techniques d'étude des composés humiques et aidé à prendre conscience de l'importance que jouent ceux-ci dans la structure du sol.

J'ai toujours trouvé auprès de lui, une très grande gentillesse et une très grande compréhension. Je me sens par ailleurs particulièrement honoré de sa présence dans mon Jury. Je lui exprime ma très profonde et très sincère reconnaissance.

Messieurs J.P. LAVEINE et M. MONTUELLE, Professeurs à l'Université de Lille I. Ils ont accepté dans de très brefs délais de juger mon travail malgré leurs nombreuses charges universitaires. Je suis très reconnaissant de l'honneur qu'ils me font et leur prie d'accepter mes respectueux remerciements.

Je n'aurai garde d'oublier le personnel technique dont la serviable amabilité aida à la réalisation de cette thèse, en particulier : Mademoiselle MULLIEZ et Madame TAILLY qui se sont chargées de la dactylographie, Madame BREBION pour le tirage, Monsieur CARPENTIER pour les diapositives. Qu'ils en soient ici vivement remerciés.

Enfin, tous mes remerciements cordiaux vont aux amis des laboratoires de biologie appliquée, cryptogamie et de géologie dynamique que je ne puis citer tous ici et qui, de loin ou de près, m'ont aidé efficacement dans l'accomplissement de ce travail.

SIC
cf
Jambu
1971
Hue
50.10.1971

TABLE DES MATIERES

*
* *

	Pages
BUT DU TRAVAIL	1
INTRODUCTION	3
CHAPITRE I - STRUCTURE MOLECULAIRE DES SUBSTANCES HUMIQUES	8
1. Produits donnés par l'hydrolyse	9
2. Produits donnés par les dégradations	10
3. Structure des lignines	12
4. Modèles structuraux proposés pour l'humus	13
4.1. L'hypothèse du nucleus central	13
4.2. L'hypothèse de FLAIG (1960-1964)	15
4.3. L'hypothèse de FELBECK (1965)	16
4.4. Hypothèse de SCHNITZER (1972)	17
4.5. Hypothèse de WERSHAW (1977)	18
CHAPITRE II - TERRES ANALYSEES ET TECHNIQUES D'EXTRATION DE L'HUMUS	19
A. CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS DE TERRES ETUDIEES	22
- échantillon de PHALEMPIN	22
- échantillon de LILLE	22
- échantillon de FLEURBAIX	23
- échantillon de LEZENNES	23
- échantillon de NEUVILLE-EN-FERRAIN	23
B. EXTRACTION	23
1. Elimination des matières organiques fraîches	25
2. Extraction des substances humiques	25
3. Séparation acides humiques - acides fulviques	26
CHAPITRE III - FRACTIONNEMENT MOLECULAIRE DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR GELS DE DEXTRANE	32
I. MATERIEL ET TECHNIQUES EMPLOYES	33
1. Préparation des gels de dextrane	33
2. Appareillage de chromatographie	33
3. Principe de la séparation moléculaire sur gels	34

II. RESULTATS OBTENUS SUR SEPHADEX	36
1. Résultats obtenus avec les acides humiques élués avec l'eau distillée.	38
2. Résultats obtenus avec les acides fulviques élués avec l'eau.	43
3. Discussion de ces résultats obtenus.	44
4. Résultats obtenus avec un tampon comme éluant.	46
III. RESULTATS OBTENUS SUR SEPHAROSE	48
IV. RESULTATS OBTENUS SUR SEPHACRYL	51
CHAPITRE IV - ETUDE PARTICULIÈRE DU FRACTIONNEMENT DES ACIDES HUMIQUES ACIDIFIÉS	57
1. Résultats expérimentaux.	58
2. Discussion.	60
CHAPITRE V - ANALYSE DES FRACTIONS SEPARÉES A PH ACIDE	63
1. Purification des acides humiques (AH ₁) correspondant aux pics I et I'.	64
2. Détermination de leur poids moléculaire approximatif.	66
3. Analyse de leurs spectres u.v. et visible.	68
4. Analyse en spectroscopie infra-rouge.	73
5. Discussion des résultats.	79
CONCLUSION GÉNÉRALE	80
BIBLIOGRAPHIE	84

LISTE DES FIGURES

*
* *
*

- Fig. 1.* Représentation schématique de la synthèse des acides humiques. (selon MARTIN et HAIDER 1971).
- Fig. 2.* Modèle structural de la lignine suivant FREUDENBERG.
- Fig. 3.* Schéma structural du nucleus selon ANDREUX (1978)
- { A : macromolécule à Poids moléculaire > 50.000
 B : macromolécule à Poids moléculaire < 50.000
- Fig. 3.* Structure de la molécule d'acide humique (d'après DRAGUNOV 1961).
- Fig. 4.* Schéma hypothétique de la synthèse de la mélanine avec participation de radicaux supposés libres de semi-quinone (BLOIS, 1965).
- Fig. 5.* Hypothèse de FELBECK (1965) concernant des substances humiques.
- Fig. 6.* Structure des acides fulviques proposée par SCHNITZER (1972).
- Fig. 7.* Situation générale montrant la région du Nord de la France avec ses départements limitrophes.
- Fig. 8.* Equisse géologique de la région envisagée (d'après G. WATERLOT, 1969).
- Fig. 9.* Coupe géologique NW-SE montrant la discordance des terrains (d'après G. WATERLOT, 1969).
- Fig. 10.* Elimination des matières organiques.
- Fig. 11.* Extraction des substances humiques - différents stades.
- Fig. 12.* Filtration sur gel *Sephadex G25* de la fraction humique AH₁ (terre de Neuville-en-Ferrain) ; éluant : eau distillée ph 8 ; colonne 2,5 × 40 cm.
Les pointillés indiquent le profil d'éluion obtenus séparément avec le *dextrane bleu 2000* ; T % veut dire ici comme dans les autres figures : *pourcentage de transmission*.

- Fig. 13. Profil d'élution des acides humiques de la fraction AH_1 (terre de Phalempin) sur colonne de Sephadex G25 ($2,5 \times 40$ cm) élué avec l'eau ph8.
- Fig. 14. Fractionnement des acides humiques AH_1 (terre de Phalempin) sur colonne de Sephadex G25 ($2,5 \times 75$ cm)¹; éluant : eau ph8.
- Fig. 15. Fractionnement des acides humiques AH_1 (terre de Lille) sur colonne de Sephadex G25 ($2,5 \times 75$ cm) ; éluant : eau ph 8.
- Fig. 16. Profil d'élution des acides humiques extraits par le pyrophosphate seul (AH_2) obtenu sur colonne de Sephadex G25 ($2,5 \times 40$ cm) - terre de Phalempin - éluant : eau ph8.
- Fig. 17. Profil d'élution des acides humiques extraits par la soude - colonne de Sephadex G25 ($2,5 \times 40$ cm) - terre de Phalempin - éluant : eau ph8.
- Fig. 18. Fractionnement des acides fulviques extraits par le pyrophosphate neutre sur colonne de Sephadex G25 ($2,5 \times 40$ cm) - terre de Phalempin éluant : eau ph8.
- Fig. 19. Profil d'élution des acides humiques de la fraction AH_1 (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephadex G25 ($2,5 \times 40$ cm) ; éluant : tampon tris-Hcl à ph9.
- Fig. 20. Profil d'élution obtenu avec la fraction AH_1 (terre de Phalempin) sur colonne de Sepharose ($2,5 \times 40$ cm) ; éluant : eau ph8.
- Fig. 21. Profil d'élution obtenu avec la fraction AH_2 (terre de Phalempin) sur colonne de Sepharose ($2,5 \times 40$ cm) ; éluant : eau ph8.
- Fig. 22. Profil d'élution obtenu avec les acides humiques extraits par le pyrophosphate neutre (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephacryl S300 ($2,5 \times 40$ cm) ; éluant : eau ph 8 ; concentration "élevée".
- Fig. 23. Profil d'élution obtenu avec les acides humiques extraits par le pyrophosphate neutre (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephacryl S300 ($2,5 \times 40$ cm) ; éluant : eau ph 8 ; concentration "élevé".
- Fig. 24. Profil d'élution obtenu avec les acides fulviques extraits par le pyrophosphate neutre (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephacryl S300 ; éluant : eau ph8 ; concentration "élevée".
- Fig. 25. Fractionnement des acides humiques extraits par le pyrophosphate neutre (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephacryl S300 ($2,5 \times 40$ cm) éluant : eau ph8, concentration "faible".

- Fig. 26.* Profil d'élution obtenu avec les acides humiques extraits par le pyrophosphate neutre (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephacryl S300 (2,5 40 cm) ; éluant : tampon tris-Hcl pH9. Les pointillés indiquent le profil obtenu séparément avec le dextrane bleu 2000.
- Fig. 27.* Profil d'élution obtenu avec les acides humiques extraits par le pyrophosphate neutre (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephacryl S200 (2,5 40 cm) éluant : tampon tris-Hcl pH9.
- Fig. 28.* Fractionnement des acides humiques sur colonnes de Sephadex G25 éluee avec de l'eau à pH8. Avant la chromatographie, le pH des échantillons est ajusté à 3,0 (a) ; 1,7 (b) ou 1,4 (c) ; fraction AH₁ - terre tN.
- Fig. 29.* Fractionnement de AH₁ pH 1,4 tN sur Sephadex G25 grande colonne.
- Fig. 30.* Acides humiques de type I sur Sephacryl 200 Tp Tris-Hcl.
- Fig. 31.* Acides humiques de type I' sur Sephacryl 300 Tp Tris-Hcl.
- Fig. 32.* Spectres en U.V. des fractions humiques I en haut, et I' en bas (AH₁ tN).
- Fig. 33.* Spectre en U.V. des acides humiques de la fraction I (tN).
- Fig. 34.* Spectre en infra-rouge des Acides humiques I.
- Fig. 35.* Spectre en infra-rouge des Acides humiques I'.

TABLEAUX

Tableaux I.

Poids sec des différentes fractions obtenues, à partir des échantillons de terres employées (Résultats exprimés en pourcentage).

Tableaux II.

Richesse relative en carbone organique des différentes fractions. (Résultats exprimés en pourcentage de la teneur totale indiquée pour chaque échantillon dans la 1ère colonne).

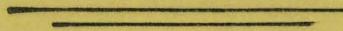
R E S U M E

Des acides humiques et acides fulviques extraits séquentiellement par les procédés de solubilisation au pyrophosphate (neutre et alcalin) et à la soude, à partir des échantillons de sols d'origine diverse, ont été étudiés.

L'acidification préalable des extraits permet en outre de caractériser une fraction moléculaire qui ne présente cette adsorption sur la matrice de gels qu'à des ph très bas. Cette particularité est mise en évidence de façon très nette avec les acides humiques extraits du sol à ph neutre et certaines caractéristiques physico-chimiques de ces molécules ont été analysées.

Ces résultats sont discutés en fonction des hypothèses actuelles relatives à la structure moléculaire des substances humiques.

BUT DU TRAVAIL



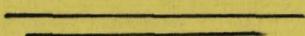
Les constituants humiques sont des éléments fondamentaux du sol : ils ont favorisé le développement de la vie sur le globe et ils assurent aujourd'hui la fertilité des terres. Ils sont absolument nécessaires au fonctionnement régulier du cycle du carbone au sein duquel, ils représentent la forme de stockage du carbone organique issu de la réduction du CO_2 atmosphérique par le biais de la photosynthèse.

Leur présence contribue à améliorer la structure du sol, à régulariser sa teneur en eau, à préserver son aération, à l'enrichir en substances minérales ou organiques, à créer par conséquent un environnement favorable pour la croissance des plantes.

Pourtant à l'heure actuelle, il existe mystérieusement très peu d'indications sur la forme que peuvent avoir ces macromolécules organiques, sur leur architecture, et même sur leurs dimensions. De nombreuses hypothèses ont été proposées, mais elles sont souvent imprécises, voire contradictoires. Ce fait tient à la complexité de ces molécules, à leur diversité, à leur association avec la fraction minérale du sol, mais aussi aux altérations chimiques qui apparaissent lors de leur extraction et à la très grande hétérogénéité des extraits analysés qui donnent des résultats peu reproductibles et difficilement exploitables.

L'isolement de fractions aussi homogènes que possible au point de vue moléculaire, semble par conséquent constituer l'une des conditions primordiales pour la progression de nos connaissances dans ce domaine de la structure des molécules humiques. C'est dans ce but qu'a été entrepris ce travail. Nous avons étudié divers systèmes de fractionnement à partir de ces substances extraites du sol, de façon à les séparer en familles moléculaires distinctes.

INTRODUCTION



Généralement, le sol comprend des éléments organiques et des éléments minéraux. Rappelons brièvement que ces derniers constituent la majeure partie de sa masse et comportent : d'une part, les minéraux non altérés ; partie grossière du sol (sables et limons), non utilisable par les plantes de façon immédiate, d'autre part, un complexe d'altération ; fraction fine du sol jouissant des propriétés colloïdales et conférant au sol ses propriétés physico-chimiques.

Les éléments organiques quant à eux minoritaires, forment un mélange très complexe de débris animaux et végétaux, habituellement divisé en deux groupes : les substances humiques et les substances non humiques.

- Les substances non humiques comprennent des composés de poids moléculaires relativement faibles, facilement attaquables par les microorganismes du sol. Les produits de leur dégradation sont adsorbables par l'argile : ce sont les protéines, les peptides, résines, cires, graisses, pigments végétaux et animaux.

- Les substances humiques par contre ont un poids moléculaire très élevé. De couleur brune ou noirâtre, elles présentent une très grande stabilité à la biodégradation. Elles sont riches en C (45 à 65 %), en O (30 à 40 %) et contiennent un peu d'Azote et des petites quantités de P et de S.

Les groupements fonctionnels les plus importants sont représentés par COOH(carboxyl), OH (phenolique et alcoolique), CO (carbonyl), OCH₃ (methoxyl).

On les classe souvent en acides humiques, solubles dans les alcalins et insolubles dans les acides ; les acides fulviques solubles dans les alcalis et les acides. Une autre fraction ; l'humine est insoluble dans les alcalis et les acides. Cette insolubilité s'explique principalement par ses liaisons avec la fraction minérale du sol.

Des recherches récentes (HAWORTH, 1971 ; SKLODOWSKI, 1973 ; GONZALEZ, VILA et coll., 1976) ont montré que ces trois fractions humiques sont semblables chimiquement mais diffèrent par leur poids moléculaire et leurs groupements fonctionnels. Les AF possèdent des masses moléculaires inférieures à celles des AH (SCHNITZER et SKINNER, 1968 ; FLAIG, 1970). Elles dépendent de la nature de l'échantillon (BAILLY et MARGULIS, 1968)

et des modalités d'extraction (JACQUIN et al., 1971).

En ce qui concerne la formation de l'humus, plusieurs hypothèses ont été avancées mais il semble que l'essentiel de la matière organique la plus stable ait pour origine la lignine. Celle-ci subirait des transformations microbiennes et réagirait chimiquement avec des composés de nature protéique (fig. 1).

Cependant, la participation des produits de la biosynthèse microbienne à la fraction stabilisée de la matière organique du sol a été envisagée. Le rôle des polysaccharides et des mélanines microbiennes étant prépondérant à cet égard.

Par ailleurs, l'influence de l'azote et celle des polyphénols les plus oxydables est déterminante (ANDREUX et METCHE, 1975 ; MUSSO et FIGGE, 1961). Dans les sols continentaux, une grande partie de cet azote est sous forme aminophénolique. Selon FLAIG (1970), il s'agit d'apports spécifiques de la microflore ou de composés hérités des chlorophylles. Dans les sédiments marins, les précurseurs glucidiques et protéiques sont plus essentiels que les précurseurs phénoliques (HUC, 1973).

Ces substances humiques sont des produits naturels largement répandus à la surface de la terre, au fond des lacs, des rivières et des mers. WALLE-RIUS (1761) les considérait simplement comme un aliment pour les plantes. DE SAUSSURE (1804), dans sa théorie sur la nutrition humique, montra ensuite que les substances humiques renferment plus de carbone, moins d'hydrogène et d'oxygène que les résidus végétaux et BERZELIUS (1830) tenta de classer ces substances en trois fractions :

- les acides humiques, solubles dans les alcalis ;
- l'humine, inerte ;
- les acides créniques et apocréniques ayant une capacité de former des sels et des complexes avec des ions métalliques.

C'est seulement en 1872 avec GRANDEAU que des caractéristiques importantes des acides humiques ont été mises en évidence : d'une part, leur précipitation à pH acide, et d'autre part, leur participation aux phénomènes d'adsorption et d'échange dans les sols.

Avec le développement de la microbiologie et de la pédologie à la fin du siècle dernier, les études sur l'humus se multiplièrent (SCHLOESING, 1876 ; DARWIN, 1881 ; DEHERAIN, 1888 ; RAMANN, 1888 ; KOSTYCHEV, 1890).

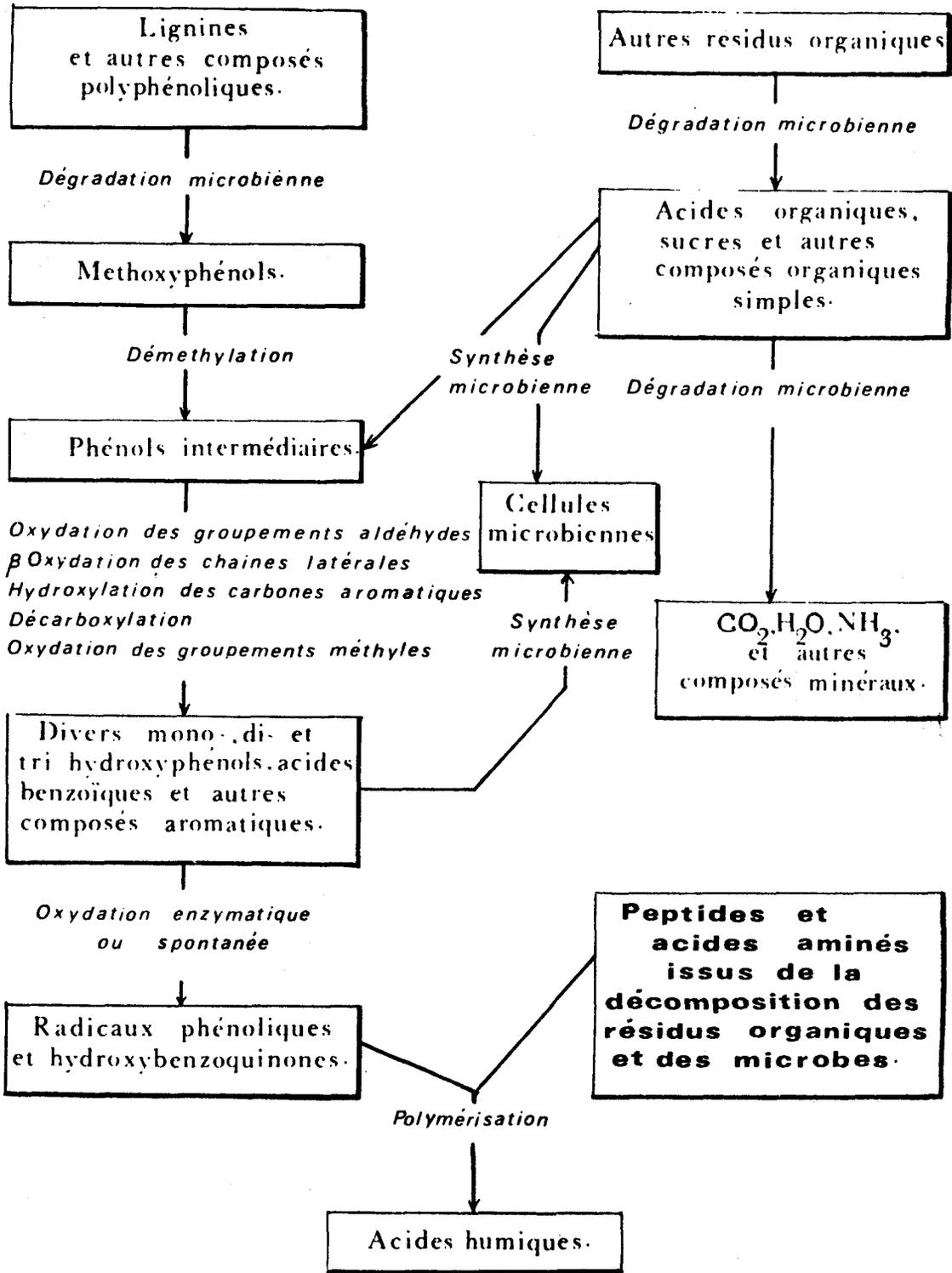


Fig. 1 : Représentation schématique de la synthèse des acides humiques (selon MARTIN et HAIDER (1971)).

ODEN (1912) considérait le premier les acides créniques et apocréniques comme les acides fulviques et subdivisa les substances humiques en :

- charbon humique ;
- acide humique ;
- acide hymatomélanique ;
- acide fulvique.

Mais c'est MAILLARD (1912) qui eut l'idée de la participation des produits formés au cours de la décomposition des résidus végétaux. Il a réalisé leur synthèse en faisant réagir des amino-acides sur les hydrates de carbone et obtint avec un léger chauffage, des substances fortement colorées semblables à l'humus.

Depuis 1920, d'autres contributions ont été apportées et ont conduit notamment à la mise en évidence des groupements carboxyles, phénoliques et hydroxyles. En outre, l'humus est désormais étudié en fonction de ses relations avec les propriétés physico-chimiques du sol, des échanges d'ions, de la mobilisation des phosphates (DEMOLON, 1952 ; KONONOVA, 1961 ; PAULI, 1961).

Avec le développement des connaissances sur la constitution des protéines, des acides nucléiques, des polysaccharides, de la lignine etc..., des hypothèses structurales relatives à l'humus ont été avancées. Et depuis une quinzaine d'années environ, de nombreux chercheurs s'efforcent de percer le mystère de la conformation moléculaire des substances humiques et celui de leur synthèse.

CHAPITRE I

STRUCTURE MOLECULAIRE DES SUBSTANCES HUMIQUES

Les différents modèles structuraux qui ont été proposés sont souvent issus de l'étude des produits donnés par l'hydrolyse sur la dégradation des acides humiques ou fulviques. Dans certains cas, les auteurs font aussi intervenir la structure chimique des molécules qui sont utilisées comme pré-curseurs lors de la synthèse de ces substances.

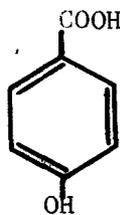
Avant de passer en revue les principaux modèles structuraux, nous allons donc rappeler brièvement les informations que peuvent fournir ces études.

1) Les produits donnés par l'hydrolyse

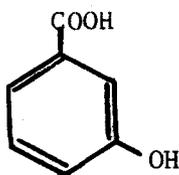
En traitant les substances chimiques avec de l'eau bouillante, on peut déjà en solubiliser une petite fraction (de l'ordre de 10 à 20 %). L'analyse de ces produits révèle la présence de polysaccharides contenant des pentoses, des acides glucuroniques et des hexosamines (glucosamine et galactosamine le plus souvent).

Ces sucres à l'état libre sont également présents dans les produits d'hydrolyse, ainsi que des petites quantités d'acides aminés, de polypeptides, et de molécules aromatiques. Ces dernières sont cependant plus faciles à extraire en effectuant des hydrolyses à chaud pendant quelques heures en milieu acide ou en milieu alcalin. Il s'agit :

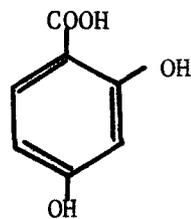
- d'acides hydroxybenzoïque (mono ou dihydroxybenzoïque) :



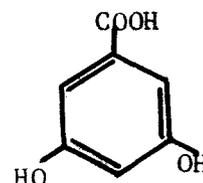
acide p. hydroxybenzoïque



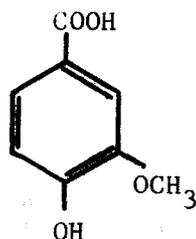
ac. m. hydroxybenzoïque



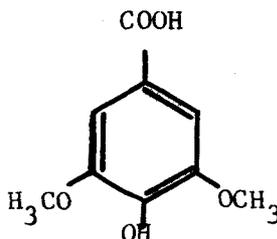
ac. dihydroxybenzoïque
(en 2,4 et 3,5)



- d'acides vanillique et syringique



ac. vanillique



ac. syringique

- ainsi que des produits plus secondaires tels que le catechol, le resorcinol, etc...

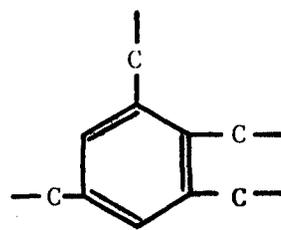
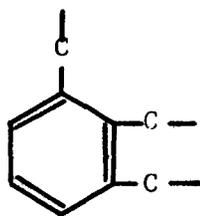
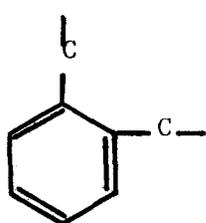
2) Les produits donnés par les dégradations

Les techniques de dégradation employées sont de 2 types : oxydatives ou réductrices.

- L'oxydation peut s'effectuer avec le permanganate alcalin, l'acide nitrique ou le nitrobenzène en milieu alcalin.

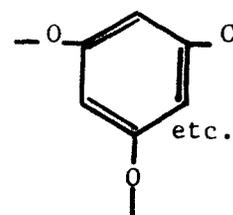
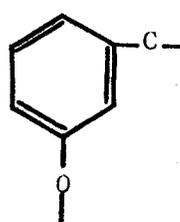
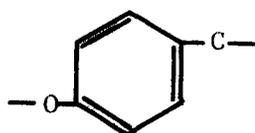
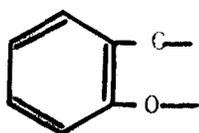
- La réduction, avec l'amalgame du sodium en milieu exempt d'oxygène à 100-110°C ou par distillation sur poudre de zinc à 400-500°C.

Les produits obtenus par ces scissions oxydantes ou réductrices sont des composés phénoliques, des acides benzène-carboxyliques, des acides phénol à noyaux condensés, etc... qui suggèrent la présence des structures suivantes dans les molécules humiques :



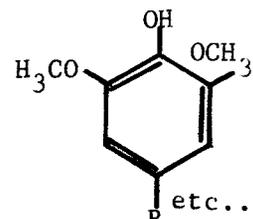
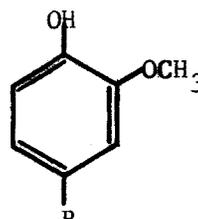
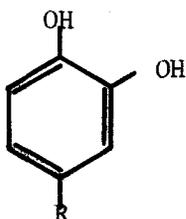
etc...

cycles benzéniques substitués par des C



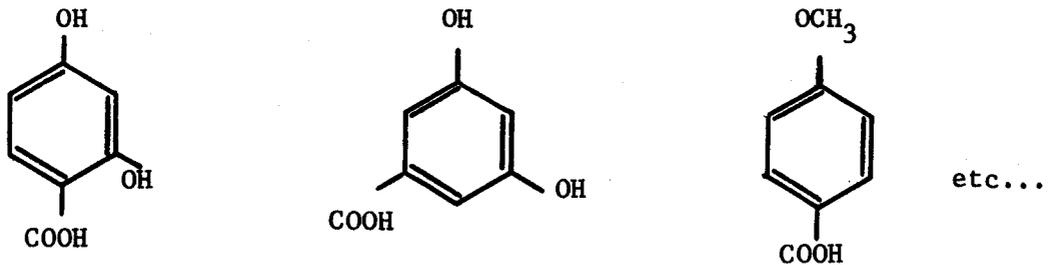
etc...

cycles benzéniques substitués par des C et O



etc...

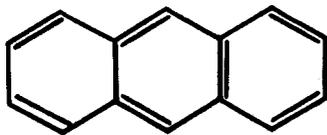
dérivés phénoliques avec R =
 - CH = CH - COOH
 - COOH
 - CHO



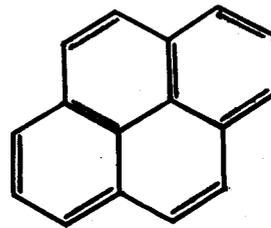
dérivés flavonoïdes

Les distillations sur zinc fournissent de nombreuses structures aromatiques polycycliques comprenant jusqu'à 5 à 6 cycles mais il est probable que ces structures proviennent de la condensation de produits instables fournis pendant la réduction.

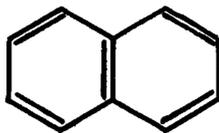
Les structures polycycliques les plus classiques que l'on peut déceler lors de ces études sont les suivantes :



anthracène



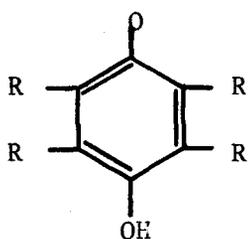
pyrène



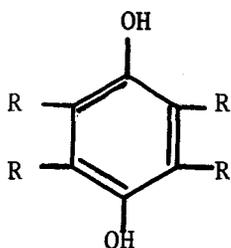
naphtalène

En plus de ces diverses structures, il faut ainsi mentionner la présence des molécules portant des fonctions quinoniques que la spectrométrie paramagnétique électronique permet de mettre en évidence.

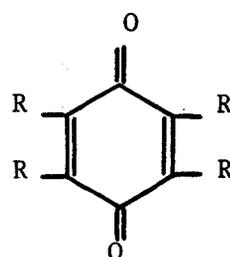
La nature exacte de ces molécules est difficile d'élucider. Elle serait de type :



semiquinone



hydroquinone

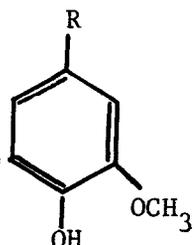


quinone

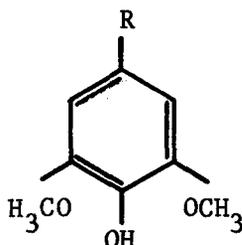
3) La structure des lignines

Les lignines étaient considérées comme les précurseurs primordiaux de la synthèse des substances humiques. La connaissance de leur configuration moléculaire peut être exploitée pour orienter les recherches relatives à l'étude de la structure de l'humus, ou pour suggérer des hypothèses.

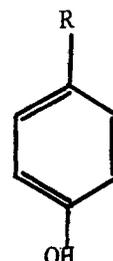
Ces lignines sont des polymères aromatiques de poids moléculaire élevé (de l'ordre de 10 à 15 000) et d'une remarquable stabilité aux attaques chimiques et biologiques. Elles sont constituées d'unités phenyl propanes assez homogènes chez les résineux (principalement des gaiacyl-propane) mais au contraire assez hétérogènes chez les monocotylédones (en plus des unités gaiacyl-propane : syringyl propane et p. hydroxyphenylpropane).



unités : gaiacyl-propane



syringyl propane



p hydroxyphenylpropane

Ces monomères seraient liés les uns aux autres par des liaisons ether ou des liaisons carbone-carbone de différents types et FREUDENBERG (1965) a réussi la synthèse d'un polymère semblable à la lignine à partir de ces monomères en les faisant réagir en mélange à des proportions définies en présence de phénolases fongiques.

La structure proposée pour cette lignine est représentée dans la figure 2.

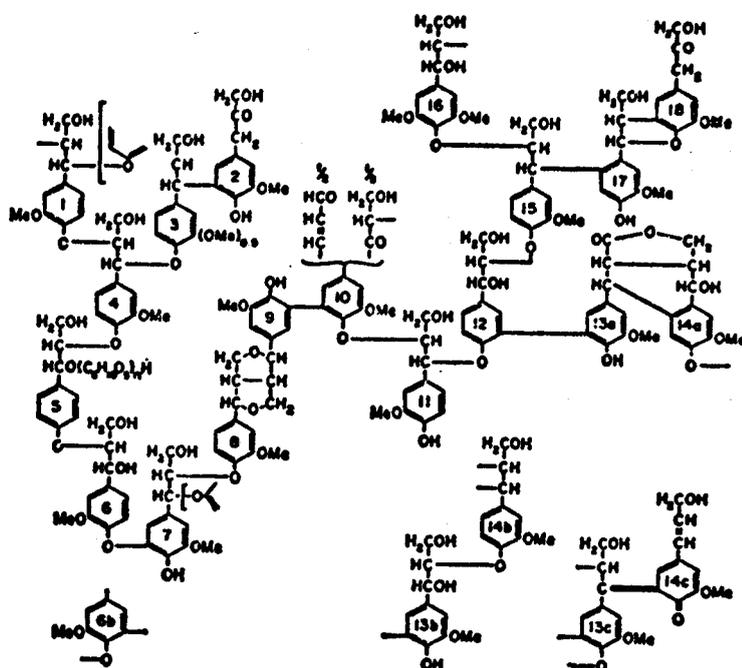


Fig. 2. - Modèle structural de la lignine suivant FREUDENBERG.

4) Les modèles structuraux proposés pour l'humus

4.1) L'hypothèse du nucleus central

C'est une hypothèse assez ancienne suivant laquelle les molécules humiques sont constituées par un noyau central ou "nucleus". Il est riche en structures aromatiques sur lequel sont insérés des chaînes latérales plus ou moins longues et des groupes fonctionnels variés.

Suivant THIELE et KETTNER (1953), ce nucleus comprendrait de nombreuses unités de type benzène, naphthalène, anthracène, furane, pyrrole, indole, pyridine, tiophène et quinoline, associées à des groupements fonctionnels tout aussi nombreux : - OH, - COOH, > C = O, - NH₂, - CH₃, - SO₃ H, - PO₃ H₂, - OCH₃.

Ce modèle structural est très commode car il permet d'expliquer de nombreuses propriétés physico-chimiques de l'humus, ainsi que la distinction entre les acides humiques et fulviques : les premiers posséderaient un nucleus relativement important et peu de chaînes latérales contrairement aux seconds.

ANDREUX (1978) a proposé récemment une représentation schématique s'appliquant à ce concept du nucleus, qui est reproduite ci-dessous (fig. 3).

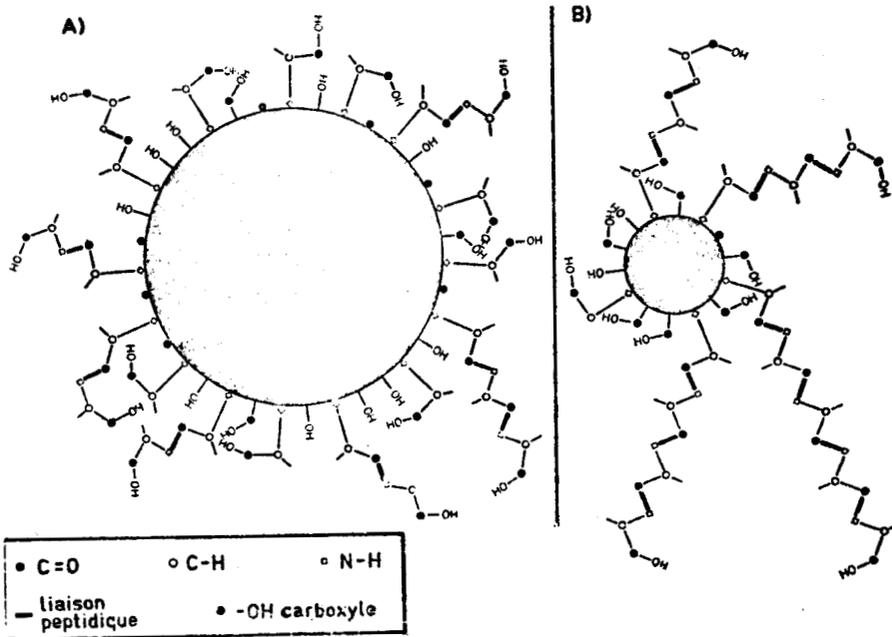


Fig. 3. - Schéma structural du nucleus selon ANDREUX (1978)
A : macromolécule à poids moléculaire > 50 000
B : macromolécule à poids moléculaire < 5 000

Les liaisons qui conduisent à la condensation des unités aromatiques peuvent être très variées. DRAGUNOV (1961) pour qui l'humus est essentiellement un produit de condensation de quinones et de polyhydroxybenzène, a proposé par exemple le modèle suivant (fig. 4).

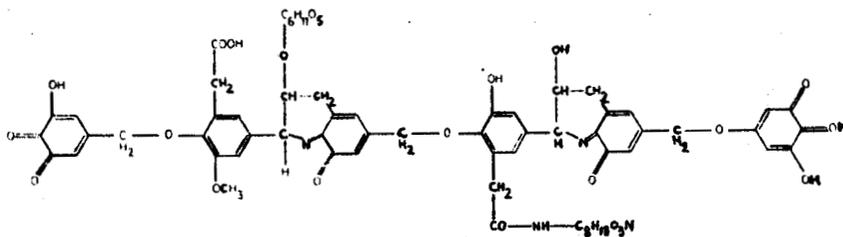
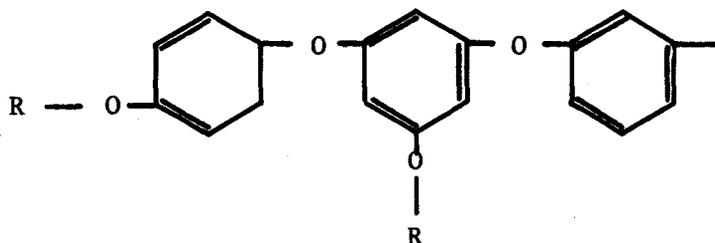


Fig. 4. - Structure de la molécule humique (d'après DRAGUNOV, 1961).



Un autre exemple peut être donné : celui qu'a proposé BAILLY (1976) qui, en étudiant des acides humiques en spectroscopie I. R., a mis en évidence une proportion importante de groupements C-O-C.

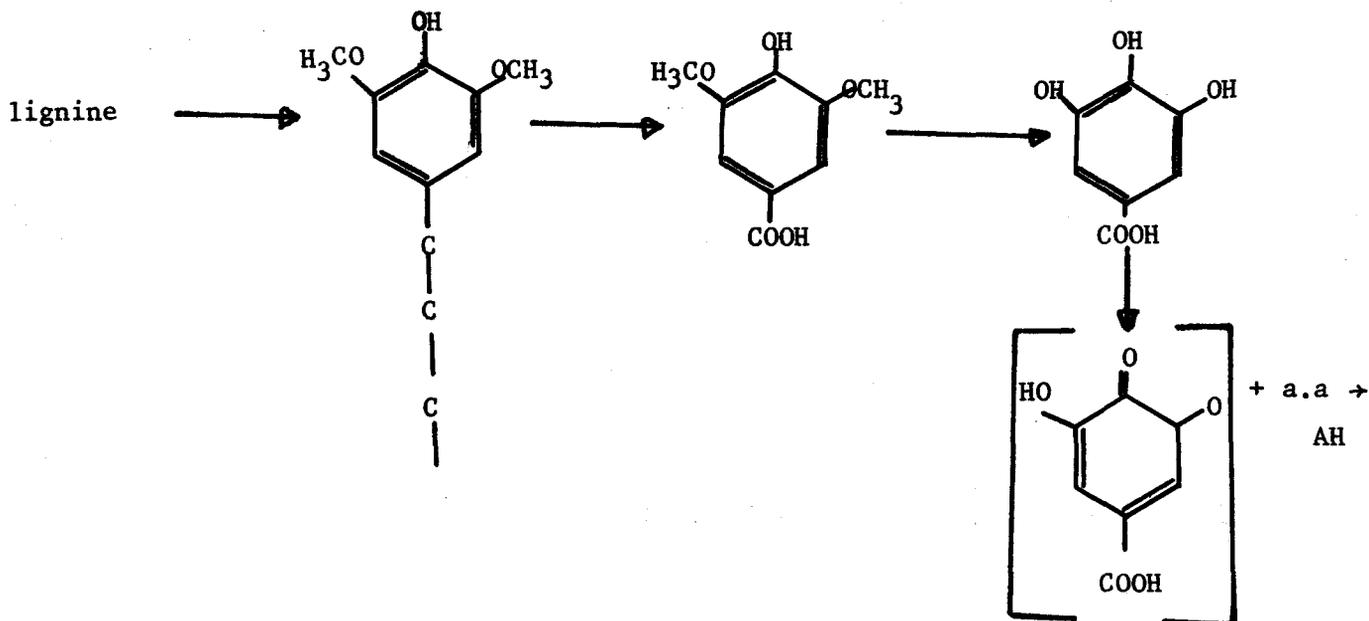
Il suggère un modèle comprenant une polymérisation de structures benzéniques sur lesquelles sont fixés des groupes - CH₂ -, - CH₃ -, - OH, - COOH, etc...



4.2) L'hypothèse de FLAIG (1960-1964)

Les structures proposées par cet auteur reposent avant tout sur la composition des matières premières qui sont utilisées lors de la formation de l'humus et sur les modifications qu'elles subissent au cours de l'humification.

En partant de la structure des lignines, il propose toute une série de modifications des unités phenyl-propanes provenant de la dégradation de la macromolécule, conduisant à des quinones qui, en se polymérisant et en s'associant avec des acides aminés ou des peptides, donneraient les acides humiques :



Lors de la polymérisation et de la polycondensation de ces monomères, des mécanismes mettant en jeu des radicaux libres semi-quinoniques interviendraient et ces monomères pourraient participer à la synthèse de la macromolécule humique en passant par différents stades intermédiaires.

Pour préciser cette conception, FLAIG cite le schéma hypothétique de la formation des mélanines indiqué par BLOIS (1965) suivant lequel le monomère de départ, la tyrosine, passe par des radicaux libres semi-quinoniques et donne, en milieu oxydant des produits intermédiaires qui participent à une polymérisation de type désordonné, les liaisons se formant au hasard en donnant une sorte de sphérocolloïde (fig. 5).

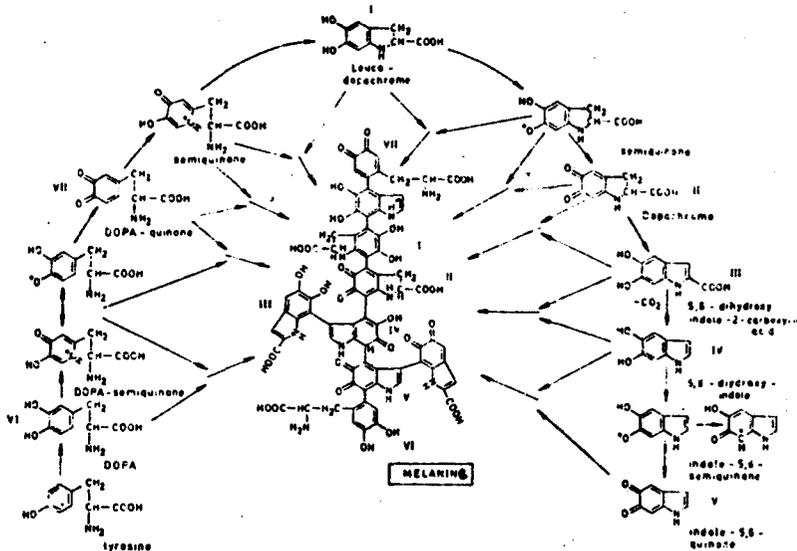


Fig. 5. - Schéma hypothétique de la synthèse de la mélanine avec participation de radicaux supposés libres de semi-quinone (BLOIS, 1965).

4.3) L'hypothèse de FELBECK (1965)

FELBECK considère principalement la présence d'unités 4-pyrone dans les substances humiques, dont l'origine serait cette fois microbienne et non plus végétale comme précédemment. Ces unités 4-pyrone seraient reliées ensemble par des liaisons méthylène, et à cette structure centrale seraient rattachés des acides phenoliques, des acides aminés ou des peptides.

La présence de chaînes comportant des unités méthylène, décelées par cet auteur, a été vérifiée récemment à la suite d'études en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire par GRANT (1977) et WILSON et coll. (1978). Il a pu identifier du polyméthylène CH_3 (CH_2) et des substituants CH_2 (CO), CH_2 -NH, etc... (fig. 6).

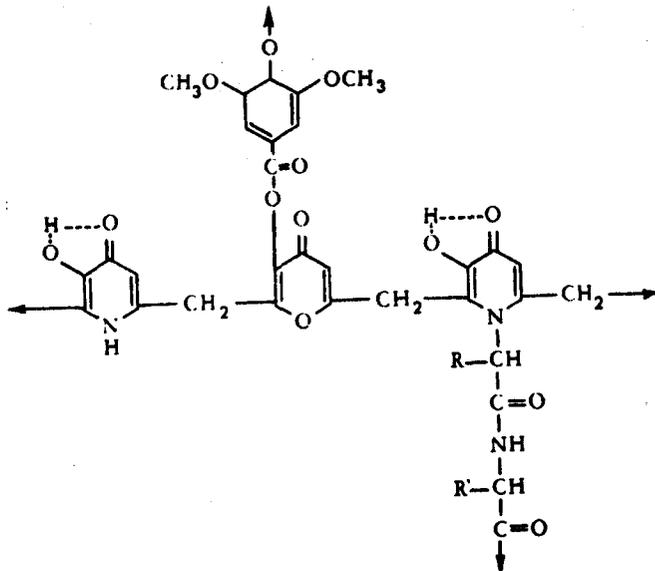


Fig. 6. - Hypothèse de FELBECK (1965) concernant la nature des substances humiques.

4.4) Hypothèse de SCHNITZER (1972)

Le modèle proposé par SCHNITZER qui, avec son équipe, a publié de nombreux travaux relatifs à l'analyse des substances humiques, concerne plus particulièrement les acides fulviques. Leur macromolécule serait constituée par un ensemble d'acides phénoliques et d'acides benzène-carboxyliques reliés par des ponts hydrogène pour donner une structure polymérique relativement stable (fig. 7).

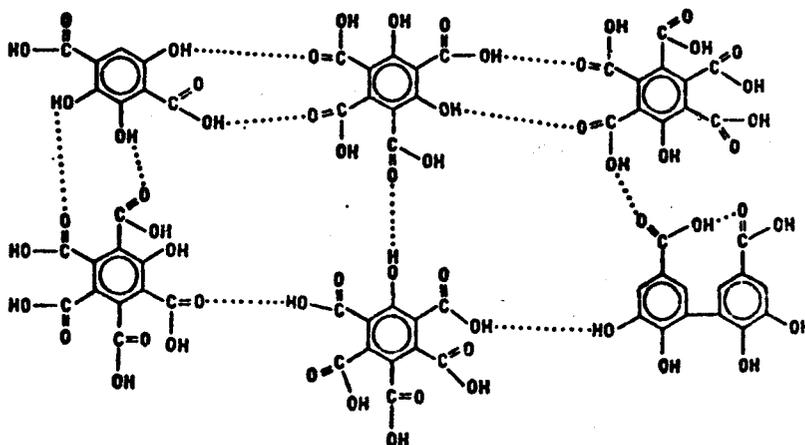


Fig. 7. - Structure des acides fulviques proposée par SCHNITZER (1972).



L'originalité de cette structure est représentée par l'importance des cavités de différentes dimensions qui donnent un aspect spongieux à la macromolécule, identique à celui que donnent les microphotographies obtenues en microscopie électronique.

Ces cavités jouant le rôle de pièges, elles permettent les fixations de molécules organiques telles les alcanes, les acides gras, les acides aminés, les peptides, etc...

Des éléments minéraux peuvent également s'insérer dans ces vides mais pour eux, il faut aussi faire intervenir les interactions avec des groupes fonctionnels périphériques.

4.5) L'hypothèse de WERSHAW (1977)

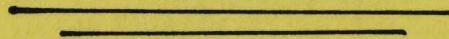
Il s'agit d'un modèle reposant sur une notion de hiérarchisation des éléments structuraux. En effet les plus petites particules que l'on puisse trouver dans les acides humiques seraient composées d'acides phénoliques, quinoïques et benzène-carboxyliques, reliés entre eux par des liaisons de covalence en donnant des édifices dont le poids moléculaire n'excéderait pas 1 000 à 1 500.

Ces particules élémentaires s'associeraient ensuite en formant peut-être quelques liaisons covalentes mais surtout des liaisons faibles de type ponts hydrogène pour donner des agrégats : soit des agrégats "homogènes" lorsque les particules en jeu sont identiques, soit des agrégats "mixtes" lorsque celles-ci sont de composition différente. En outre, ces agrégats homogènes ou mixtes pourraient se lier à des particules minérales du sol et donner des édifices encore plus complexes.

Cette théorie de WERSHAW présente l'avantage d'expliquer toute la gamme des poids moléculaires relevés pour les acides humiques, et leur comportement variable suivant la concentration (dissociation des particules à faible concentration, aggrégation à faible ph).

CHAPITRE II

TERRES ANALYSEES ET TECHNIQUES
D'EXTRACTION DE L'HUMUS



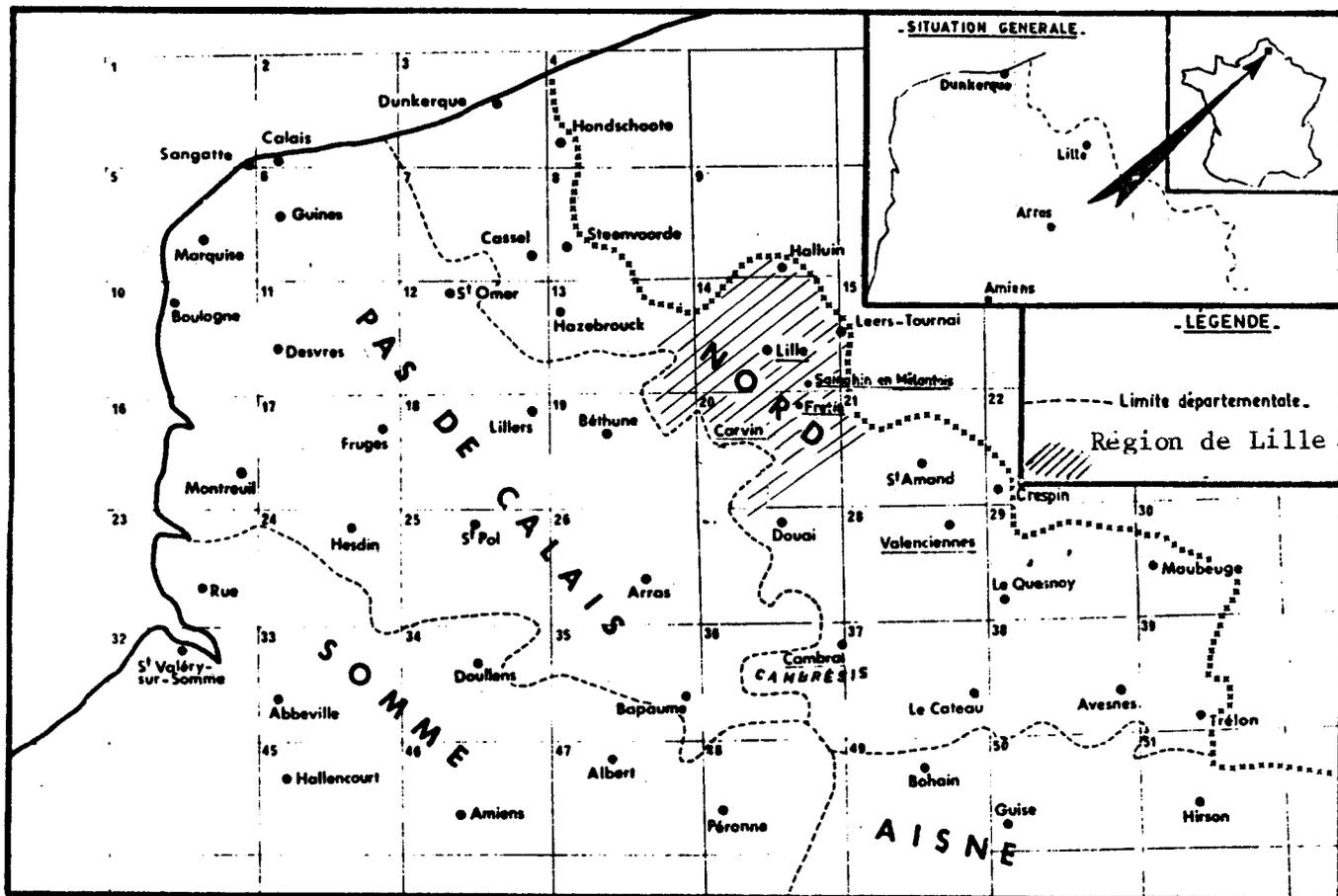


Fig. 8-1. - Situation générale montrant la région du Nord de la France avec ses départements limitrophes.



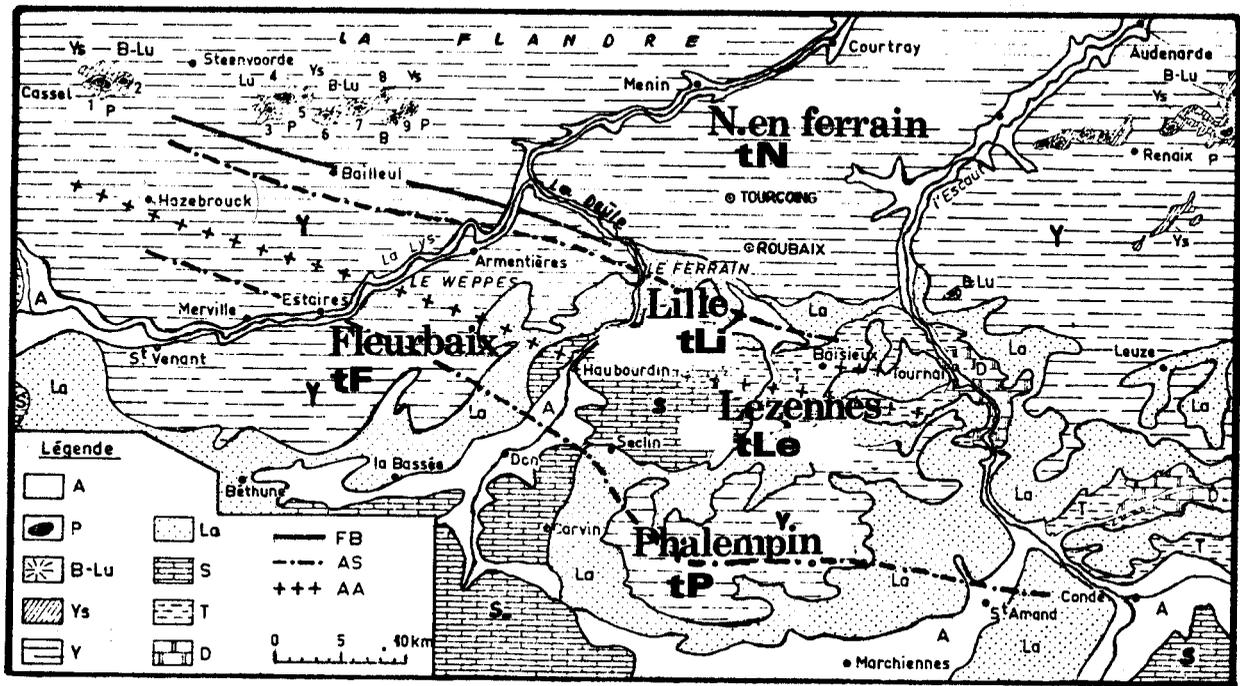


Fig. 8-2. - Esquisse géologique de la région envisagée (d'après G. WATERLOT, 1969).

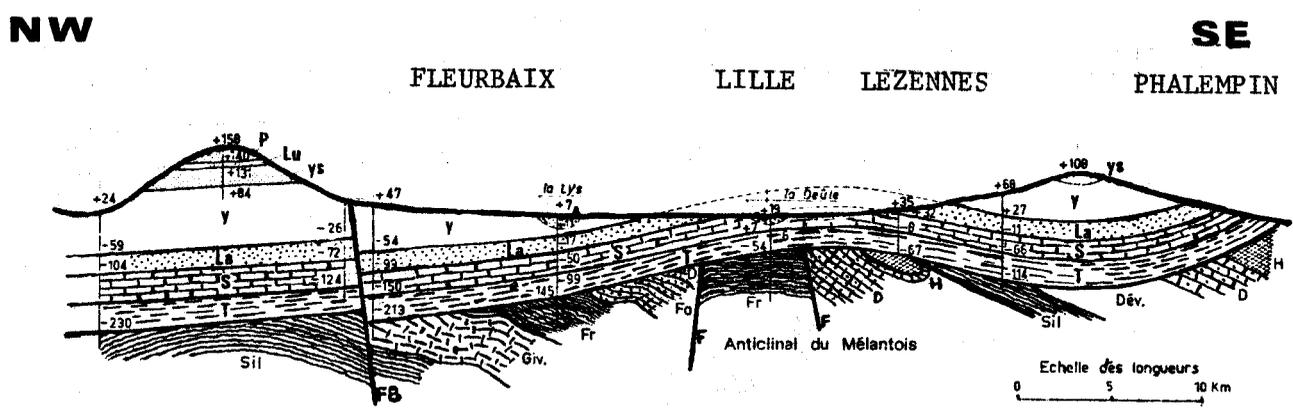


Fig. 9. - Coupe géologique NW-SE montrant la discordance des terrains (d'après G. WATERLOT, 1969).

Légendes pour les deux figures :

A : alluvions fluviatiles ; P : Pliocène supérieur ; B-Lu : Bartonien et Lutétien (sables bruxelliens) ; Ys : Yprésien supérieur ; Y : Yprésien (argile des Flandres) ; La : Landénien ; S : Sénonien et Turonien supérieur (craie) ; T : Turonien moyen et inférieur (marnes bleues argileuses) ; H : Terrain Houiller ; D : Dinantien (calcaire carbonifère) ; Dév : Dévonien ; Fa : Famennien (schistes et grès) ; Fr : Frasnien (schistes et calcaires) ; Giv : Givétien (calcaire) ; Sil : Silurien (schistes) ; FB : Faille de Bailleuil ; AS : axe anticlinal ; AA : axe synclinal ; F : failles.

Différents échantillons :

t P : terre de Phalempin ; t Le : terre de Lezennes ; t Li : terre de Lille ; t F : terre de Fleurbaix ; t N : terre de Neuville-en-Ferrain.



A. CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS DE TERRES ETUDIEES

Il n'entre pas dans le cadre de cette étude de donner une description détaillée des terrains qui constituent le sous-sol de la région à partir de laquelle nous avons effectué nos prélèvements.

Nous nous limiterons tout simplement à la partie superficielle (jusque environ 10 cm de profondeur).

Nous avons étudié les substances humiques de différentes terres prélevées dans un rayon de 20 km autour de Lille (fig. 8-1). Des terrains appartenant à diverses époques géologiques y sont représentés (fig. 8-2). Des limons dus essentiellement à l'altération des terrains sous-jacents, recouvrent les couches plus anciennes (WATERLOT, 1969) : l'Eocène (sables et argiles), puis le Crétacé supérieur marin (craie et marne), et enfin le Carbonifère (calcaire). Signalons que les terrains tertiaires et secondaires reposent en stratification discordante sur les terrains primaires qui ont été relévés et plissés par l'orogénèse hercynienne (fig. 9).

Géomorphologiquement, c'est un ensemble varié, tant par son relief que par son recouvrement végétal. La juxtaposition de plaines et collines couvertes continuellement par une importante couche de limons est remarquable (SOMME, 1969).

Cinq échantillons ont été choisis de façon à disposer de terres de nature et de richesse en matière organique différentes : deux terres de forêt (Phalempin et Lille), deux cultivées (Fleurbaix, Lezennes) et une de prairie (Neuville-en-Ferrain) (voir fig. 8-2).

- Echantillon de Phalempin :

- notation : t P ;
- situation : 10 km au Sud de Lille à proximité de l'autoroute Lille-Paris ;
- caractéristiques géologiques : argiles yprésiennes : argile plastique, compacte, contenant la plupart des fois des nodules non fossilifères ;
- végétation : Forêt de chênes et de bouleaux sans futaies notables.

- Echantillon de Lille :

- notation : t Li ;
- situation : Esplanade de Lille, près de la Deûle ;
- caractéristiques géologiques : alluvions fluviatiles formées de sables argileux, parfois glauconieux avec planorbes et limnées ;

- végétation : Forêt de chênes et de bouleaux.
- Echantillon de Fleurbaix :
 - notation : t F ;
 - situation : 20 km au Nord-Ouest de Lille ;
 - caractéristiques géologiques : argiles yprésiennes ;
 - végétation : culture de colza.
- Echantillon de Lezennes :
 - notation : t Le ;
 - situation : proximité du bureau de recherche géologique et minière ;
 - caractéristiques géologiques : sédiments du Sénonien inférieur :
craie blanche caractérisée par l'abondance des débris d'*Inoceramus involutus*,
de *Micraster decipiens* et de *Terebratula semi-globosa* ;
 - végétation : culture de betteraves.
- Echantillon de Neuville-en-Ferrain :
 - notation : t N ;
 - situation : 20 km au Nord de Lille ;
 - caractéristiques géologiques : argiles des Flandres ;
 - végétation : prairie.

B. EXTRACTION

Compte tenu de leurs propriétés colloïdales et de leurs combinaisons avec les cations du sol, l'extraction des composés humiques est souvent difficile, bien que les techniques utilisables à l'heure actuelle soient très nombreuses et très variées.

La recherche du réactif d'extraction permettant d'entraîner la plus grande quantité possible d'humus est donc essentielle (POSNER, 1966 ; KONONOVA, 1966 ; THENG et coll., 1967 ; ORTIZ DE SERRA et coll., 1972 ; VILA et coll., 1973 ; DORMAAR, 1974).

Un grand nombre de réactifs a été testé à cette fin : l'oxalate d'ammonium, le fluorure de sodium, les sels alcalins, l'EDTA, la soude plus ou moins diluée, les résines complexantes, etc...

L'extraction par les résines donne des résultats relativement faibles (JACQUIN et coll., 1970).

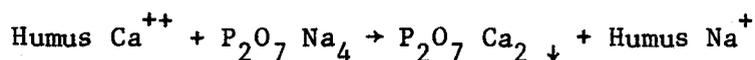
La soude a longtemps été considérée comme le plus efficace. Elle présente cependant un grand inconvénient car elle conduit à une oxydation de

la matière organique fraîche et parfois à une néoformation d'acides fulviques et humiques (PLEVEN et coll., 1967). L'utilisation du chlorure stannique, qui élimine l'oxygène contenu dans les extraits, a été suggérée pour corriger ces réactions d'oxydation (SCHNITZER et KHAN, 1972). Malheureusement ce procédé n'a pas eu de suite favorable car le chlorure préconisé réduit lui-même les groupes quinones des acides fulviques et des acides humiques. Certains auteurs (SCHNITZER et SKINNER, 1968) ont néanmoins montré que les acides humiques extraits avec la soude ne présentaient pas de différences importantes par rapport aux extraits obtenus avec le fluorure de sodium (en particulier en ce qui concerne les caractéristiques d'absorption). Ils n'ont pas noté non plus de différence dans la composition élémentaire d'une part, et dans les groupes carboxyles d'autre part. L'analyse des spectres IR et le résultat donné par la filtration sur gel, révèlent de même que les acides fulviques extraits d'un horizon podzolique avec la soude et les acides fulviques extraits avec (l'acide chlorhydrique) sont identiques. Ils conclurent que les effets dénaturants de la soude cités dans la bibliographie sont peut-être un peu exagérés.

Plusieurs solvants organiques tels que l'acétylacétone, l'acide formique et des sels comme le pyrophosphate de sodium sont aussi utilisés classiquement.

Depuis quelques temps, l'intérêt des chercheurs porte particulièrement sur l'utilisation du pyrophosphate de sodium qui semble supérieur à tous les autres réactifs. Il extrait en effet une grande quantité de composés humiques et provoque une dispersion parfaite du complexe argilo-humique en formant avec le calcium et le fer, des sels insolubles. Ce qui libère les molécules humiques liées.

Le principe de cette solubilisation peut se résumer par la réaction suivante :



Pour nos différents échantillons de terre, nous avons par conséquent employé cette technique du pyrophosphate de sodium, en prenant soin au préalable d'éliminer la matière organique fraîche afin qu'elle ne puisse pas interférer dans les résultats de nos fractionnements.

1) Élimination de la matière organique fraîche

Les débris végétaux de toute nature se retrouvant dans le sol constituent la source essentielle de sa matière organique. Celle-ci existe sous deux formes distinctes. La première forme plus ou moins grossière est caractérisée par des débris végétaux en cours d'évolution et non encore fixés à la fraction minérale du sol. La deuxième forme, diffuse, est intimement liée à la masse des constituants minéraux. En outre, le rapport $\frac{C}{N}$ différencie les deux formes : la première présente un rapport voisin ou inférieur à 10, alors que pour la seconde, le $\frac{C}{N}$ est beaucoup plus élevé et sa stabilité est plus marquée.

Par ailleurs, la première fraction comprend des matières organiques d'apports récents qui ne sont pas engagées dans les processus humidificateurs, alors que la deuxième forme a subi cette transformation en donnant différentes substances humiques plus ou moins complexes chimiquement, formées par synthèse microbienne ou d'origine résiduelle.

La méthode que nous avons employée pour éliminer ces matières organiques : celle de MONNIER et coll. (1962) fait intervenir les densités propres des substances.

Pour effectuer cette séparation densimétrique (fig. 10), nous partons d'échantillons de 10 g de terre, broyée puis tamisée à 500 μ (afin de libérer les matières organiques libres emprisonnées mécaniquement dans les agglomérats). Cette terre est agitée pendant cinq minutes avec 100 ml du mélange alcool éthylique-bromoforme donnant une densité 1,5, et on centrifuge à 1 000 g toujours pendant cinq minutes (c'est-à-dire à 3 000 rpm avec la centrifugeuse JOUAN E 82^S).

Après centrifugation (au cours de laquelle il faut mettre en circuit le dispositif de freinage, afin d'éviter toutes remises en suspensions partielles du culot), le surnageant est éliminé.

Cette opération est effectuée une seconde fois : le culot est remis en suspension avec le même liquide densimétrique de densité 1,5 et la centrifugation donne un culot qui servira aux fractionnements ultérieurs.

2) Extraction des substances humiques

Après différents essais, nous avons choisi la technique de DUCHAUFOR et JACQUIN (1963) qui comporte plusieurs stades d'extraction (fig. 11) mais

qui permet une appréciation plus rigoureuse de la nature des fractions humiques, un rendement efficace et une dénaturation relativement minime des molécules extraites.

1er stade d'extraction : Il s'opère sur le culot de centrifugation obtenu après élimination des matières organiques fraîches, qui est préalablement séché dans une étuve afin de faire disparaître toute trace de bromoforme. C'est une solution de pyrophosphate ph 7 0,1 N qui est employée. L'alcalinité de ce pyrophosphate est abaissée par l'acidité d'échange d'un sel de sodium : le sulfate de sodium concentré à 7,5 % (l'ion sodium a en effet la propriété particulière de flocculer des argiles qui emprisonnent les acides humiques les plus condensés) et le ph de la solution est uniformisé à 7 avec de l'acide sulfurique.

2e stade d'extraction : On emploie une solution de pyrophosphate 0,1 N seul dont le ph est de 9,8.

3e stade d'extraction : Il s'effectue avec une solution de soude 0,1 N.

4e stade d'extraction : A nouveau avec la soude 0,1 N. (Cette dernière extraction n'a pas été employée par DUCHAUFOR et JACQUIN, mais nous nous sommes rendu compte qu'elle permettait encore de séparer des substances organiques à partir du culot de centrifugation).

Pour chacune de ces extractions, la terre obtenue après traitement densimétrique est agitée mécaniquement pendant une heure avec 100 ml de solutions. Et on centrifuge toujours à 1 000 g pendant 15 minutes, sauf pour l'extraction effectuée avec le pyrophosphate seul. Pour cette dernière, on centrifuge pendant 15 minutes mais à 1 500 g. Le surnageant est récupéré après chaque opération, et le culot est traité avec la solution d'extraction suivante.

Les deux surnageants obtenus par le traitement à la soude sont éventuellement réunis.

3) Séparation acides humiques - acides fulviques

Nous avons utilisé la technique classique de précipitation des acides humiques par acidification. Chacune des trois solutions d'extraction est acidifiée à ph 1 avec H_2SO_4 pur, et après un séjour de 24 h à température ambiante, les solutions sont centrifugées pendant 15 minutes à 1 500 g.

Les surnageants obtenus de cette façon renferment les acides fulviques, et les culots, les acides humiques. Compte tenu des trois types d'extractions opérées, nous les appellerons respectivement AH₁, AH₂, AH₃ pour les fractions humiques et AF₁, AF₂, AF₃ pour les fractions fulviques.

Les surnageants sont concentrés par évaporation rotative sous-vide, puis éventuellement dialysés. Les culots sont repris avec de l'eau distillée ou de la soude diluée suivant leur utilisation.

Au cours des différentes étapes de séparation de la matière organique, nous avons effectué des mesures de poids secs et des dosages de carbone organique suivant la méthode classique de ANNE à chaud. (Elle consiste en une oxydation du carbone par le bichromate de potassium en milieu sulfurique, et le titrage se fait avec un sel de Mohr (sulfate de fer ferreux et d'ammonium) en présence d'un indicateur coloré : la diphenylamine).

Les résultats obtenus sont indiqués dans les tableaux I et II, dans lesquels les différentes colonnes se rapportent à la matière organique fraîche (M. O. F.), aux trois fractions d'acides humiques et d'acides fulviques, et au culot de centrifugation issu du dernier traitement par la soude (ce culot contient en particulier l'humine).

De ces résultats, il ressort que les terres prélevées à Lille et à PHALEMPIN sont très riches en matière organique. Ce qui est en accord avec leur nature, étant donné qu'elles correspondent à des sols forestiers. Ces deux échantillons présentent également la plus forte proportion de carbone organique contenu dans la matière organique fraîche (respectivement 19,8 % et 18,3 % du carbone organique total). Par contre, c'est la terre de prairie (Neuville-en-Ferrain) qui contient le moins de carbone organique dans sa fraction légère.

En ce qui concerne le carbone organique non extractible (culot de centrifugation), ce sont assez curieusement les échantillons de sols cultivés (Fleurbaix et Lezennes) qui en contiennent le plus.

Enfin, ces résultats nous indiquent les quantités d'humus extraites à chaque stade de fractionnement. En général, le pyrophosphate neutre extrait une proportion d'acides humiques moins importante que le pyrophosphate alcalin ou la soude, mais une quantité d'acides fulviques plus élevée.

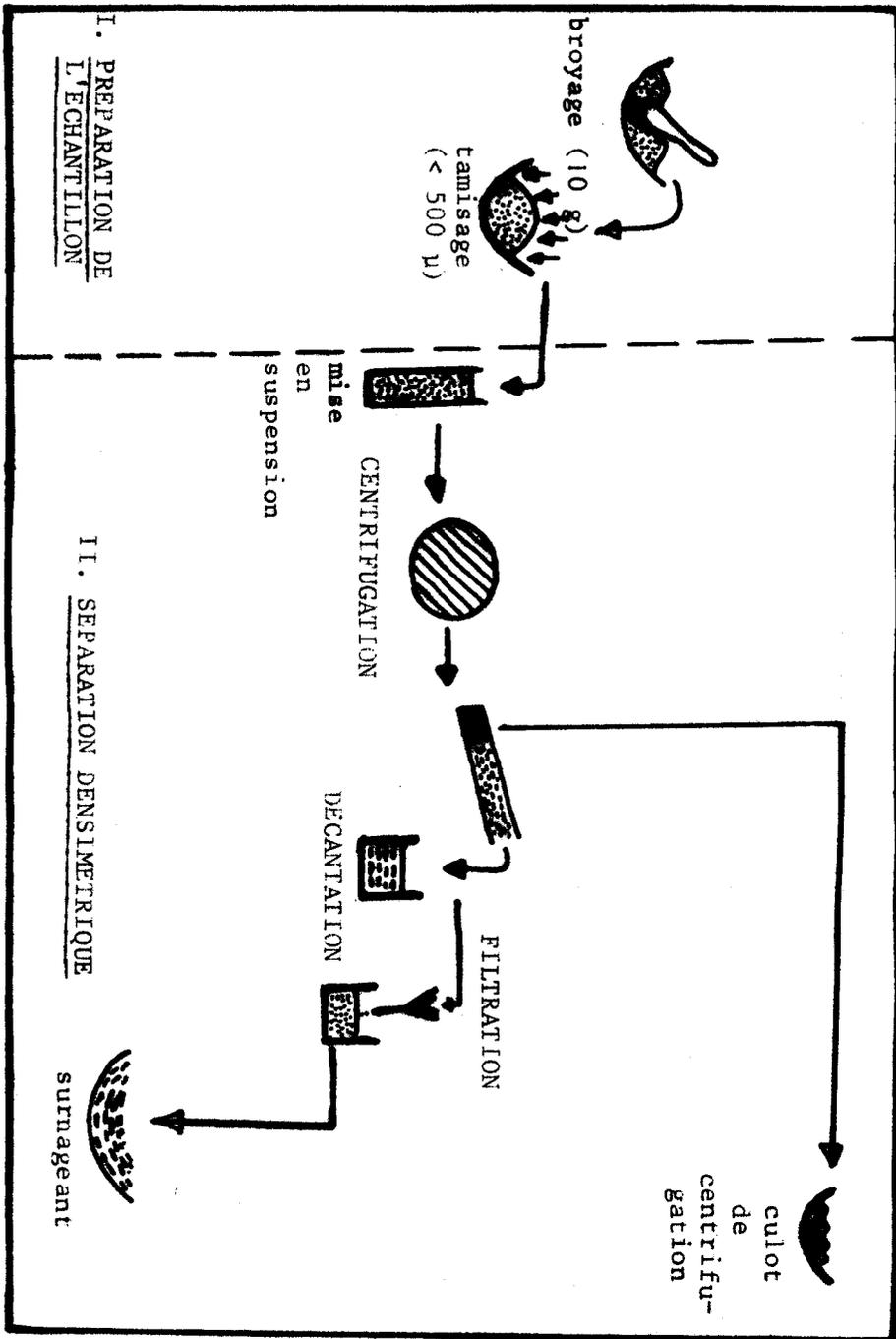


Fig. 10. - Elimination des matières organiques.



TABIEAU I

Echantillons	MOF %	AH ₁	AH ₂	AH ₃	AF ₁	AF ₂	AF ₃	Culots
t Li	4,4	3,4	1,9	4,8	2,06	1,6	1,14	80,70
t P	3,6	3,1	5,7	11,9	0,9	0,6	0,7	73,50
t N	1,10	2,9	5,1	5,8	0,3	0,7	0,9	80,20
t F	1,10	3	3,20	2,70	1	1,08	0,7	87,30
t Le	1,10	1,49	1,10	2,02	1,09	0,9	1	91,20

Poids secs des différentes fractions obtenues à partir des échantillons de terres employées (les résultats sont exprimés en pourcentage).



TABLEAU II

Echantillons Teneur totale en carbone (mg/g)	M. O. F.	AH ₁	AH ₂	AH ₃	AF ₁	AF ₂	AF ₃	Culots
t Li 115,62	19,8	4,3	3,10	11,10	3,20	1,5	1,7	55,3
t P 67,05	20,1	3,30	6,20	17,80	2,80	1,50	1,60	46,7
t N 39,10	6,8	6,4	16,8	22,30	1,00	0,9	1,6	44,20
t E 19,38	11,42	4,16	4,3	8,49	3,85	2,04	1,72	64,02
t Le 23,38	14,14	2,16	2,8	3,9	2,92	1,26	1,52	71,3

Richesse relative en carbone organique des différentes fractions
 (les résultats sont toujours exprimés en pourcentage de la teneur totale indiquée
 pour chaque échantillon dans la 1^{re} colonne).

CHAPITRE III

FRACTIONNEMENT MOLECULAIRE DES SUBSTANCES HUMIQUES
SUR GELS DE DEXTRANE

En peu de temps, la technique de "filtration sur gel" dite encore "chromatographie sur gel" a pris une extension très importante, grâce à sa simplicité et à son expérimentation aisée. Elle a conquis de nombreux laboratoires travaillant essentiellement sur les hauts polymères, que ce soit en chimie, en biochimie médicale, ou en biologie.

De nos jours, la chromatographie sur gel est une technique qui trouve en fait son application dans tous les cas où il s'agit non seulement d'analyser, séparer et purifier les différentes substances d'un mélange, mais aussi de les fractionner selon leur volume moléculaire. Elle a permis une accumulation de résultats intéressants depuis les virus jusqu'aux macromolécules synthétiques, en passant par les protéines, les hydrates de carbone, les acides nucléiques, les hormones, les antibiotiques et les lipides.

I. MATERIEL ET TECHNIQUE EMPLOYES

1) Préparation des gels de dextrane

Les gels de dextrane sont des hydrates de carbone polymérisés qui se forment notamment lorsque l'on cultive une certaine bactérie : Leuconostoc mesentéroïdes sur des sucres. Ce polysaccharide se compose exclusivement de glucose et contient plus de 90 % de liaisons α - 1,6 - glucosidique, ainsi qu'un petit nombre de liaisons 1,3.

Les gels de dextrane SEPHADEX, SEPHAROSE, SEPHACRYL ; les principaux que l'on trouve actuellement dans le commerce et que nous avons utilisés, sont préparés sous forme de perles de grosseur bien définie. La qualité "superfine" donne sur colonnes des séparations particulièrement nettes. Ces gels vendus à l'état sec, doivent être préparés en présence d'eau de façon à donner une bouillie épaisse qui sera introduite dans des colonnes. Dans celles-ci, on la stabilise en faisant passer une certaine quantité d'eau distillée.

2) Appareillage de chromatographie

Le dispositif expérimental ne diffère pas beaucoup de celui qui est employé pour les autres méthodes de chromatographie liquide.

Le fractionnement des molécules s'effectue dans des colonnes (2,5 x 40 cm ou 2,5 x 75 cm) comportant à leur base un tamis en nylon retenant le gel.

L'éluant utilisé, eau distillée à ph 8 ou un tampon à ph et molarité donnés, traverse ces colonnes à un débit régulier grâce à l'utilisation d'une pompe péristaltique et passe ensuite dans une cellule en quartz. Celui-ci est placé sur le trajet d'un faisceau de lumière U.V. (2 540 Å) qui permet la lecture du pourcentage d'absorption des différentes molécules entraînées et son enregistrement par l'intermédiaire d'un dispositif particulier.

A la sortie de cette cellule, l'éluant est recueilli dans un collecteur de fractions possédant un programme qui permet le choix du nombre de fractions à récupérer et le volume de chacune d'elles. En ce qui nous concerne, nous avons constamment collecté des fractions de 5 ml chacune (175 gouttes).

L'élution est maintenue à une vitesse régulière :

- Sephadex : 30 ml/h
- Sepharose et Sephacryl : 15 ml/h

Afin de prévenir toute contamination microbienne, lorsque les colonnes ne sont pas utilisées pendant un certain temps, on utilise une substance antiseptique : l'azide de sodium (NaN_3). Celui-ci, incorporé à l'éluant, est à une concentration (0,2 g/l) qui ne modifie pas les propriétés du gel.

Remarquons que la longueur d'onde utilisée ici pour détecter le fractionnement des substances humiques, n'est pas spécifique, puisqu'elle a été établie pour des séparations d'acides nucléiques ou de ses dérivés. Cependant, d'autres que nous l'ont déjà employée également, par exemple : BAILLY et coll. (1968) ou KOSINKIEWICZ (1977). SWIFT et POSNER (1971) et LABROUE (1976) utilisent une longueur d'onde de 400 nm, DUBACH et coll. (1964) 450 nm, WERSHAW et coll. (1973) 600 nm, mais nous avons pu vérifier que ces longueurs d'onde supérieures à 25 nm n'amélioreraient en rien la précision graphique des séparations obtenues à partir des fractions humiques ou fulviques.

En particulier, nous n'avons jamais remarqué les possibilités d'artefacts relevés par LABROUE à propos de l'étude de sols alpins.

3) Principe de la séparation moléculaire sur les Gels

Les substances déposées à la partie supérieure de la colonne quittent le gel dans l'ordre généralement décroissant de leur poids moléculaire.

La vitesse d'écoulement dépend en outre des dimensions et de la forme des particules de gel ainsi que de leur compressibilité.

Il est néanmoins utile de tenir compte de certains paramètres qui permettent d'exprimer numériquement les résultats d'une chromatographie sur gel. Lorsqu'on introduit dans un tube de verre vertical un gel granulé en suspension dans un solvant, on obtient en effet deux phases : l'une inférieure aux grains, l'autre extérieure ou intersticielle. Le volume total (V_t) de la colonne de gel se compose donc de trois parties :

- le volume intersticiel V_o
- le volume intérieur des grains V_i
- le volume de la matrice de gel V_m

$$\underline{V_t = V_o + V_i + V_m}$$

. V_o se détermine en chromatographiant tout simplement une substance à poids moléculaire élevé qui ne risque pas de pénétrer dans les grains. Le volume de solvant qui sort de la colonne entre le départ et l'apparition de cette substance dans l'éluant correspond exactement à la quantité de liquide qui se trouve entre les grains. On emploie pour cela un polysaccharide coloré à haut poids moléculaire : le dextrane bleu 2 000 (poids moléculaire : 2 000 000) ;

. V_i dépend de la porosité du gel et peut être calculé si on connaît la capacité d'absorption pour l'eau (W_R) et le poids sec (a) du gel utilisé

$$\underline{V_i = a \cdot W_R}$$

. pour le calcul exact du volume V_m de la matrice, on a besoin du volume spécifique partiel du polymère qui constitue le gel.

Pour définir la caractéristique d'une molécule chromatographique, on utilise généralement le paramètre V_e (volume d'élution) et la constante K_d .

. le volume d'élution V_e , c'est le volume qui correspond à l'éluant sorti de la colonne depuis l'application de l'échantillon jusqu'à l'apparition de la molécule considérée (ou plus exactement lorsque sa concentration atteint le maximum d'absorption sur l'enregistrement ;

. lorsqu'une substance est plus ou moins retenue dans le gel ou qu'elle ne peut pas diffuser librement, il faut faire intervenir la valeur K_d et son volume d'élution est donné par la formule :

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i$$

d'où
$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

Pour un gel donné, cette constante K_d définie par WHEATON et BAUMANN (1953), est indépendante de la géométrie de la colonne et du tassement du gel. Seul l'encombrement moléculaire de la substance étudiée fixe sa vraie valeur.

Remarque :

D'autres facteurs peuvent intervenir au niveau des gels et modifier le cheminement normal des molécules. Ce sont principalement les forces de COULOMB qui agissent entre les ions et les zones chargées électriquement du gel :

- les forces de VANDERWAALS, entre les molécules dissoutes et le gel ;
- l'adsorption, au niveau de la charpente macromoléculaire constituant le gel.

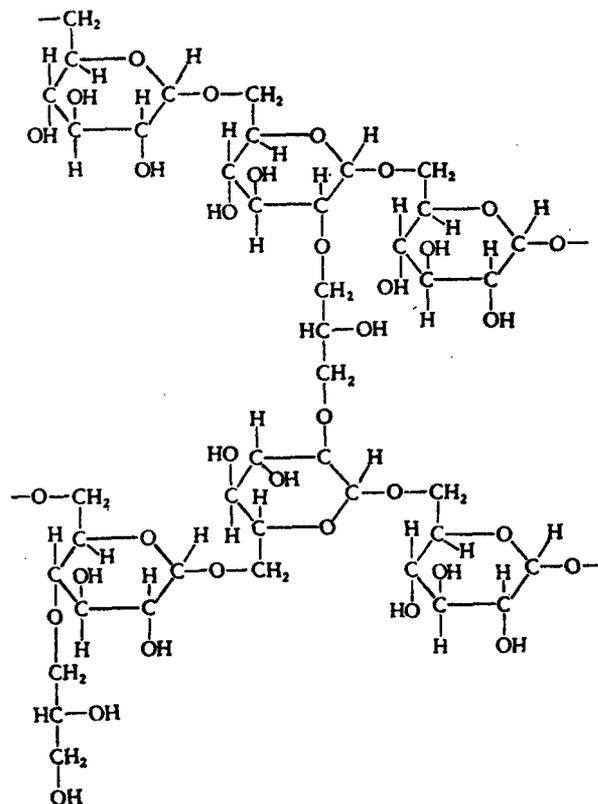
Ces facteurs conduisent à une rétention supplémentaire des molécules sur le gel.

II. RESULTATS OBTENUS SUR SEPHADEX

Au cours d'essais préliminaires, nous avons testé plusieurs types de gels Sephadex :

- le Sephadex G 25, qui est normalement destiné à séparer les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 5 000 ;
- le G 50, qui permet de séparer les poids moléculaires compris entre 500 et 10 000 ;
- le G 100, qui sépare les poids moléculaires compris entre 1 000 et 100 000.

Tous ces gels ont une structure identique : un réseau polysaccharidique qui peut être représenté de la façon suivante :



Ces résultats nous ont montré que le Sephadex G 25 donnait les meilleurs fractionnements, ou tout au moins que les autres gels n'amélioreraient jamais le résultat donné par ce type de dextrane. Compte tenu de la grande facilité d'utilisation qu'offre ce Sephadex G 25 (en particulier en ce qui concerne les éluions de colonne), c'est uniquement celui qui a été utilisé par la suite. Soulignons que ces résultats sont à priori surprenants, car les poids moléculaires attribués aux molécules humiques sont généralement très élevés.

Nous avons aussi tenté de séparer les substances humiques non plus seulement en fonction de la grosseur de leurs molécules, mais aussi en fonction des charges ioniques qu'elles peuvent contenir. Pour cela, nous avons employé le CM SEPHADEX, un échangeur d'ions cationiques portant des groupes carboxyméthyles et le DEAE SEPHADEX, échangeur d'ions anioniques portant des groupes diethy-aminoethyles. Cependant, quelle que soit la molarité du tampon utilisé ou son ph, nous n'avons jamais pu réussir à l'aide de ces supports un fractionnement des substances humiques (soit que toutes les molécules se trouvent retenues irréversiblement par le gel, soit qu'elles ne présentent aucune affinité avec le gel).

Nous avons expérimenté toutes nos fractions d'acides humiques (AH_1 , AH_2 , AH_3) et d'acides fulviques (AF_1 , AF_2 , AF_3) en utilisant généralement des colonnes de gels Sephadex G25 Medium de $2,5 \times 40$ cm. Le volume d'extrait posé sur ces colonnes est la plupart du temps voisin de 1 ml et correspond à une teneur de 4 mg de carbone organique.

Rappelons que l'eau distillée amenée à pH8 est, sauf indication contraire, utilisée comme éluant.

1. RESULTATS OBTENUS AVEC LES ACIDES HUMIQUES ELUES AVEC DE L'EAU DISTILLEE.

Le fractionnement de ces acides humiques qui, après précipitation à pH1, ont été centrifugés et repris avec de la soude diluée N/10, conduit à la formation de deux catégories principales de molécules représentées par deux pics d'absorption sur l'enregistrement graphique de l'éluion. Nous appellerons *molécules I* celles qui sont éluées en premier et qui sont en principe les plus grosses (*Pic I* sur les figures qui vont suivre) et *molécules II*, celles qui apparaissent ensuite (*Pic II*).

En ce qui concerne les acides humiques de la fraction AH_1 (extrait avec le pyrophosphate neutre), toutes les terres ont donné un profil d'éluion à peu près identique, c'est-à-dire la séparation en ces deux catégories principales de molécules avec en plus une troisième fraction beaucoup moins importante. Celle-ci est éluée de la colonne à la suite du pic II, mais sans qu'il y ait de séparations nettes entre les deux types de molécules, de sorte que les molécules du *pic III* présentent plutôt sur les graphiques un épaulement sur le pic II. Les figures 12 et 13 représentent à titre d'exemples les profils d'éluion obtenus avec les AH_1 de la terre tN et de la terre tP.

Si une petite quantité de dextrane bleu est déposée sur la colonne de Sephadex G 25 utilisée pour ces fractionnements, on obtient un pic d'absorption sur les enregistrements qui correspond à la fraction 13. Nous savons que cet indicateur à poids moléculaire très élevé permet de déterminer le V_0 et indique les fonctions dans lesquelles on trouvera les molécules exclues du gel. Or, nous constatons que les molécules du pic I apparaissent toujours à partir de cette fraction 13. Elles correspondent donc à des substances qui n'ont pas pénétré dans le gel.

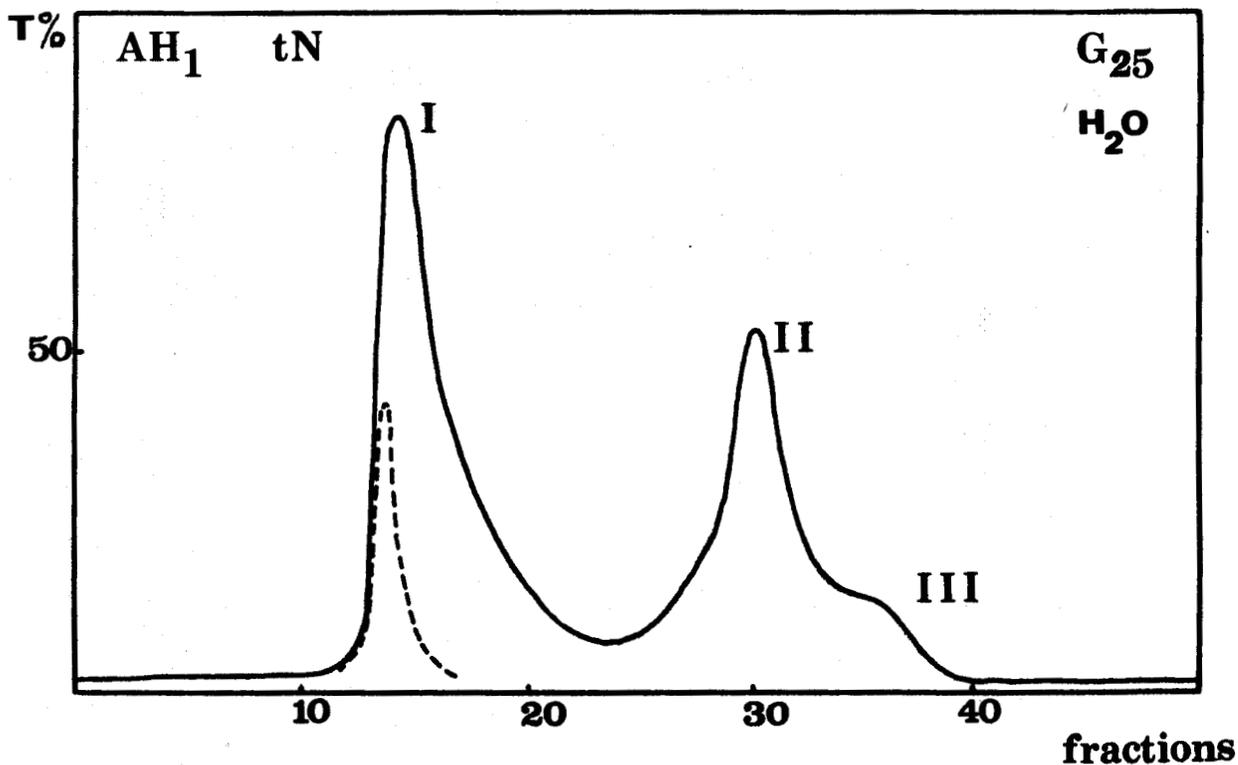


Fig. 12. Filtration sur gel *Sephadex G25* de la fraction humique AH₁ (terre de Neuville-en-Ferrain) ; éluant : eau distillée pH 8 ; colonne 2,5¹ × 40 cm. Les pointillés indiquent le profil d'élution obtenu séparément avec le *dextrane bleu 2000* ; T % veut dire ici comme dans les autres figures : pourcentage de transmission.

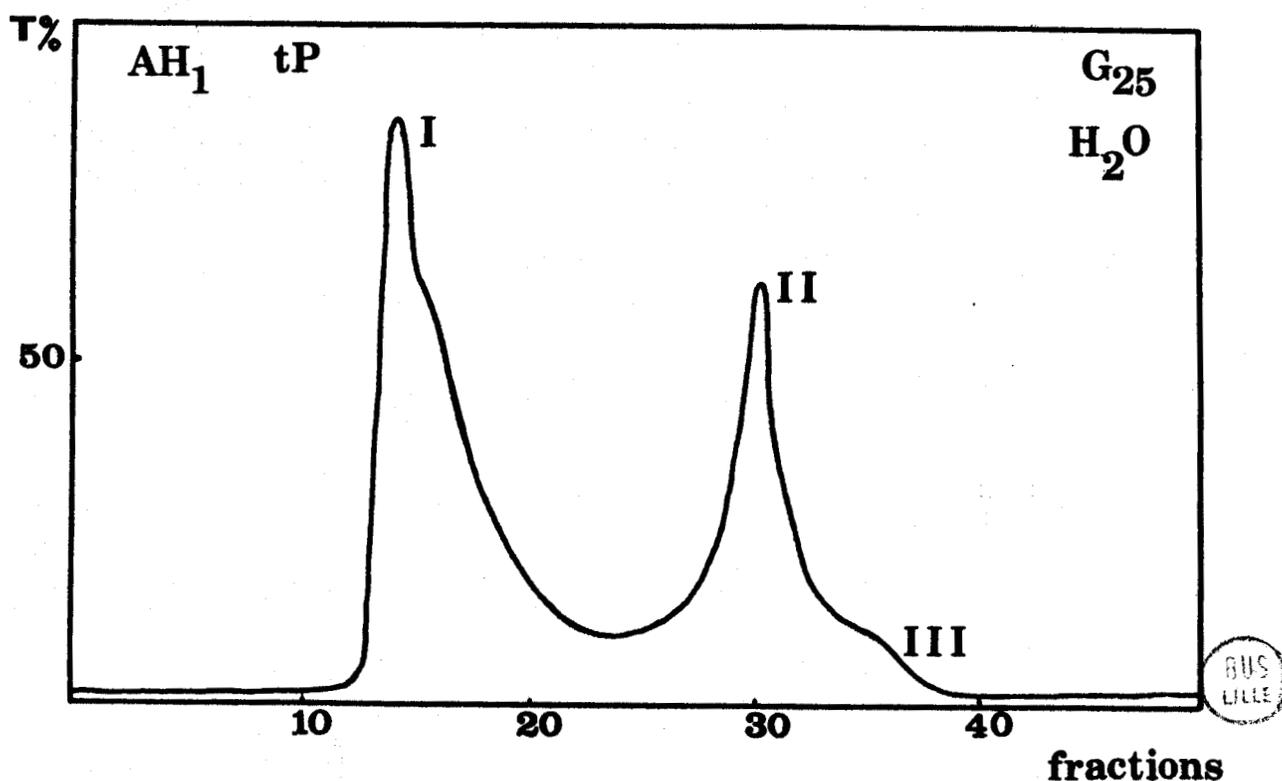


Fig. 13. Profil d'élution des acides humiques de la fraction AH₁ (terre de Phalempin) sur colonne de *Sephadex G25* (2,5 × 40 cm) élue avec l'eau pH 8.

En ce qui concerne le pic II, son maximum d'absorption est obtenu avec la fraction 30. Les molécules qui le représentent sont visiblement très nettement distinctes de celles qui sont exclues. Nous pouvons calculer son K_d :

- son volume d'élution $V_e = 30 \times 5 = 150$ ml

- le volume interstitiel $V_0 = 13 \times 5 = 65$ ml

ce qui nous donne $K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i} = \frac{150 - 65}{85} = \frac{85}{85}$, V_i étant constant pour un même type de gel puisqu'il caractérise le volume intérieur des grains).

Pour les molécules du pic III, le volume d'élution est plus difficile à déterminer. Il est approximativement égal à 165 ml. D'où un K_d de $\frac{100}{V_i}$. Nous avons essayé de séparer plus nettement les molécules de type II et III en utilisant une colonne plus haute ($2,5 \times 75$ cm). Ce procédé nous a effectivement permis d'identifier plus nettement les molécules de type III, puisqu'elles donnent alors un véritable pic sur les enregistrements. Les figures 14 et 15 relatives au fractionnement de AH_1 provenant de tP et de tLi, illustrent bien ce résultat. Notons par ailleurs que l'utilisation de ces grandes colonnes aide parfois à déceler l'hétérogénéité des molécules constituant le pic I, ce que l'on peut vérifier dans la figure 15 puisque le pic I n'est plus symétrique, mais présente un épaulement indiquant la présence de deux types de molécules.

Les Acides humiques extraits par le pyrophosphate non neutralisé ne se séparent généralement qu'en deux fractions moléculaires I et II, les molécules de type III ne représentant jamais de profil d'élution bien net (fig. 16) sur les petites colonnes ni même sur les grandes colonnes. Les molécules I sont toujours exclues du gel et les molécules II ont un K_d identique au cas précédent c-à-d $\frac{85}{V_i}$.

Les profils d'élution donnés par les acides humiques extraits par la soude sont beaucoup moins intéressants et présentent constamment un pic très important de molécules exclues. Celui-ci est suivi d'un second pic moins prononcé que celui des fractions AH_1 et AH_2 (fig. 17) et d'un K_d légèrement inférieur (voisin de $\frac{80}{V_i}$).

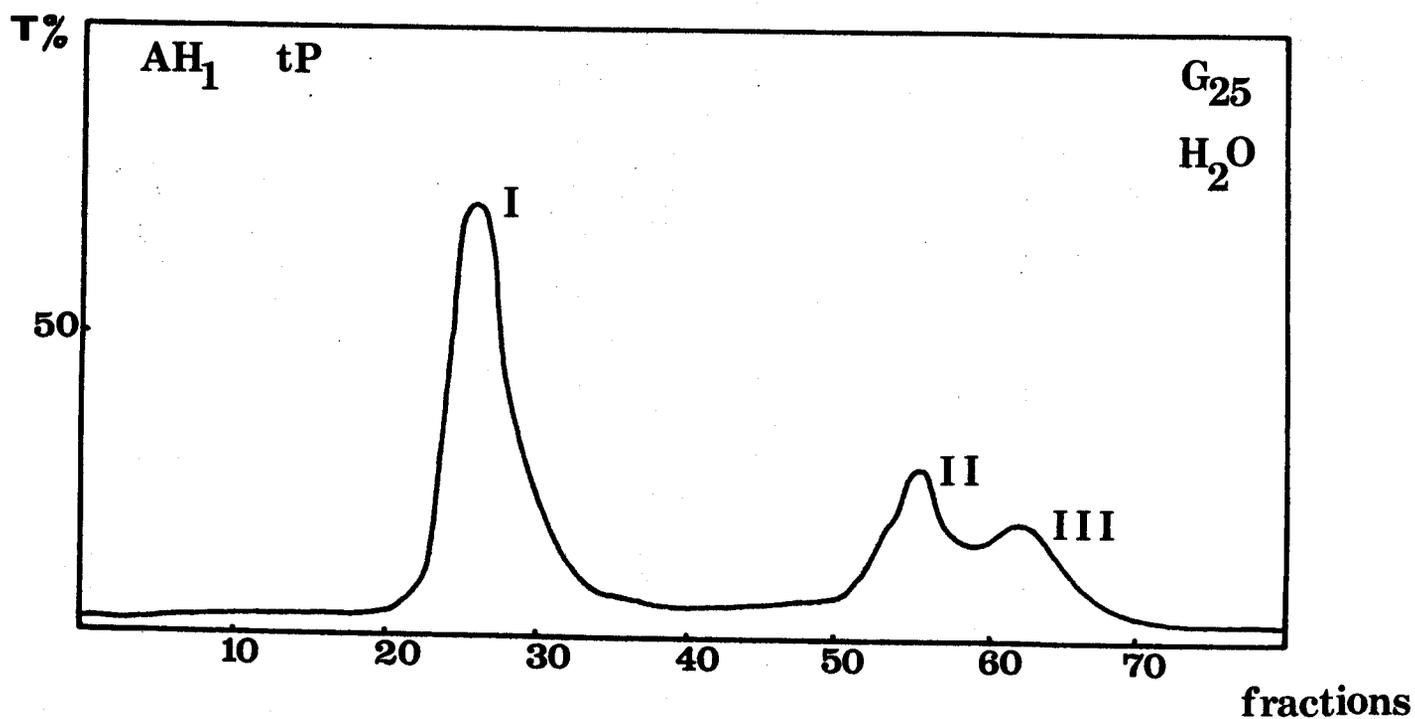


Fig. 14. Fractionnement des acides humiques AH_1 (terre de Phalempin) sur colonne de Sephadex G25 ($2,5 \times 75$ cm) ; éluant : eau pH 8.

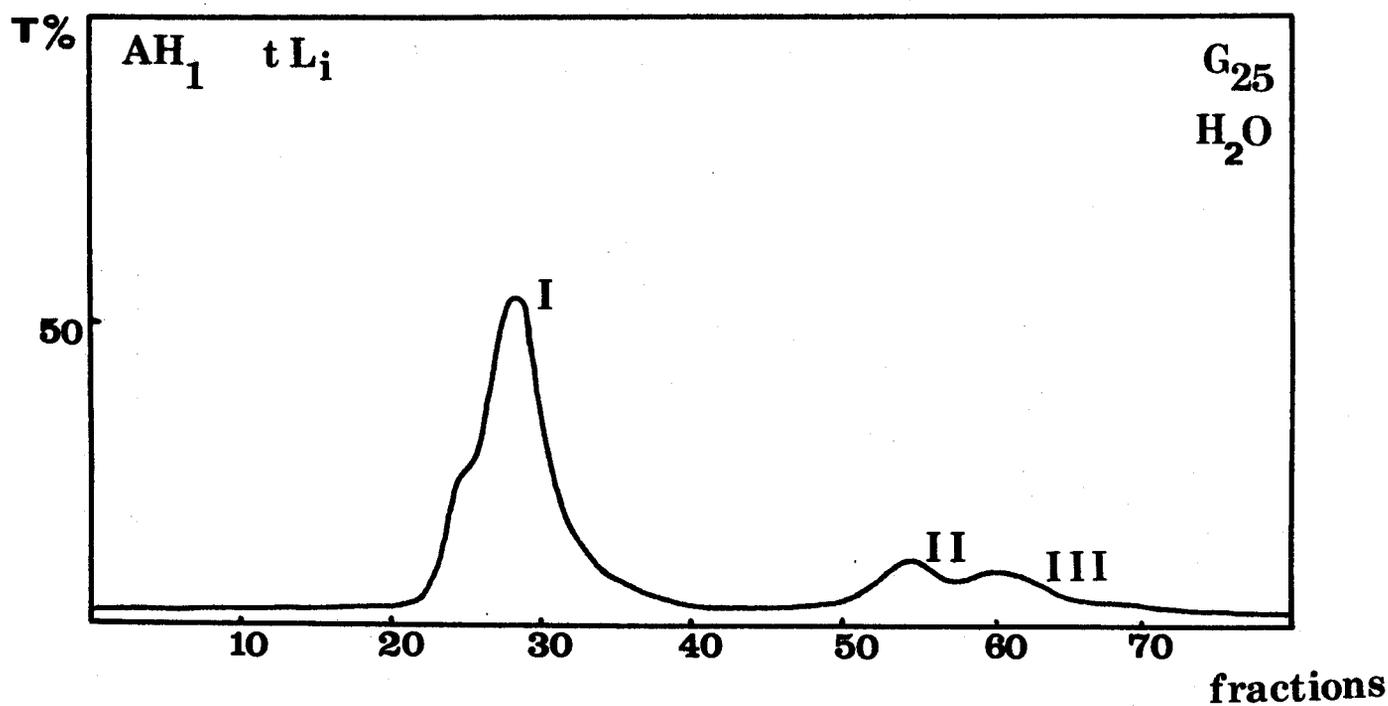


Fig. 15. Fractionnement des acides humiques AH_1 (terre de Lille) sur colonne de Sephadex G25 ($2,5 \times 75$ cm) ; éluant : eau pH 8.

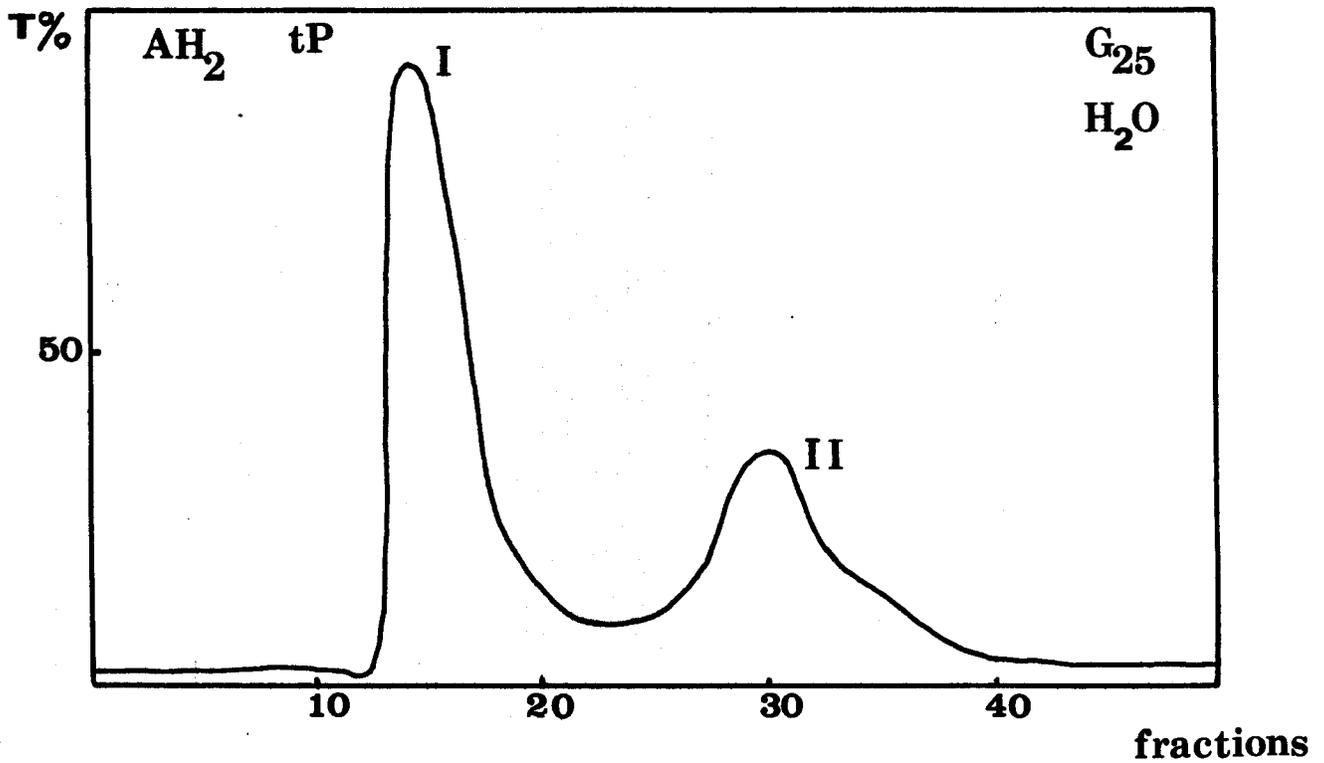


Fig. 16. Profil d'éluion des acides humiques extrait par le pyrophosphate seul (AH₂) ; obtenu sur colonne de Sephadex G₂₅ (2,5 × 40 cm) - terre de Phalempin - éluant : eau pH8.

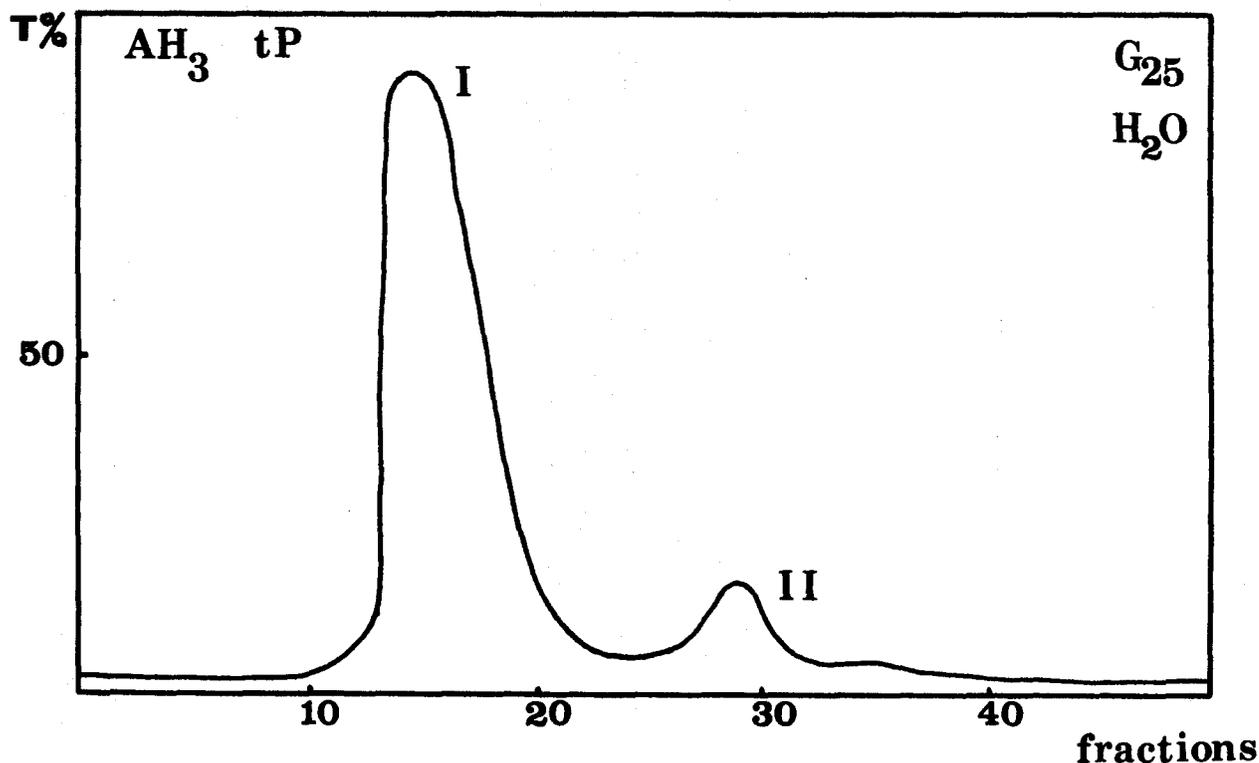


Fig. 17. Profil d'élution des acides humiques extraits par la soude - colonne de Sephadex G25 (2,5 × 40 cm) - terre de Phalempin - éluant : eau pH8.

2. RESULTATS OBTENUS AVEC LES ACIDES FULVIQUES ELUES AVEC L'EAU.

Rappelons que ces acides fulviques sont toujours dialysés avant les analyses sur Sephadex afin d'éliminer les sels ou la soude qui ont permis leur extraction.

Les fractions fulviques se séparent en donnant deux types de substances I et II dont les volumes d'élution sont identiques aux substances 1 et 2 des acides humiques.

L'importance relative du Pic II décroît cependant en fonction du type d'extraction. Il est assez important lorsque l'extraction a été effectuée au pyrophosphate neutre (fig. 18), moins prononcé lorsque l'extrait provient du pyrophosphate seul, et à peine apparent dans les extraits sodiques.

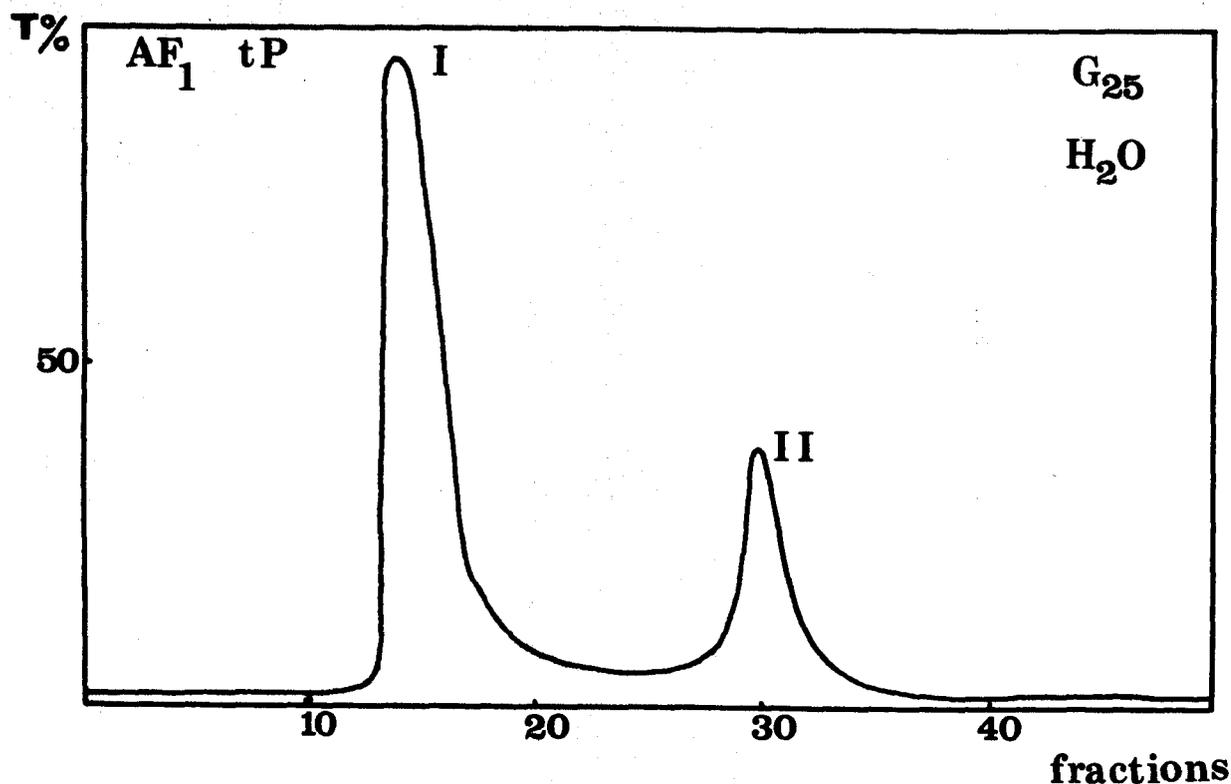


Fig. 18. Fractionnement des acides fulviques extraits par le pyrophosphate neutre sur colonne de Sephadex G25 (2,5 × 40 cm) - terre de Phalempin - éluant : eau pH8.

3. DISCUSSION DE CES RESULTATS OBTENUS.

Ce fractionnement des substances humiques en deux catégories principales de molécules sur colonnes de gels éluées avec de l'eau, a été signalé plusieurs fois à propos de l'utilisation du Sephadex G25 ou du Sephadex G50.

LADD en 1969 a notamment mis en évidence, à partir de six échantillons d'acides humiques dont il ne donne pas l'origine exacte, la séparation sur Sephadex G25, G50 ou G100 de deux fractions majeures colorées en brun et une troisième fraction, mineure, jaunâtre. Il est cependant difficile de comparer nos résultats avec ceux-ci, étant donné qu'aucun profil d'élution n'a été présenté.

JACQUIN et coll. (1971) obtiennent deux pics quand les échantillons sont passés sur colonne de Sephadex G25 ou G50. Mais ces deux pics ne sont bien individualisés qu'avec le type G50. Les échantillons employés sont des acides humiques extraits, soit d'un horizon B d'un podzol humo-ferrugineux prélevé dans les Vosges, soit d'un chernozem prélevé en URSS.

Ils ont noté en outre, que l'extraction avec le pyrophosphate conduit à l'obtention d'un deuxième pic plus important que lorsque l'extraction est effectuée par la soude, résultat que nos expériences confirment. Ces auteurs interprètent ce fait en suggérant que les extraits sodiques contiennent des composés à poids moléculaires variés, où les produits intermédiaires occupent une place importante contrairement aux extraits obtenus avec le pyrophosphate. Ceux-ci seraient caractérisés par des composés à poids moléculaires soit élevés, soit faibles (absence de produits intermédiaires).

TAN et GIDDENS (1972) ont étudié les fractionnements d'extraits humiques et fulviques obtenus avec la soude à partir de divers échantillons de sols et de composés organiques. Ils obtiennent sur Sephadex G50, avec les acides humiques une séparation très nette en deux catégories de molécules d'importance parfois à peu près équivalente.

WERSHAW et coll. (1973) ont analysé également des extraits sodiques d'acides humiques principalement de sols sableux d'AMERIQUE du NORD (Floride, WASHINGTON). Suivant la nature du sol, ils obtiennent sur Sephadex G25 des profils d'élution qui mettent en évidence la présence de deux familles moléculaires dominantes éluées toujours dans les mêmes fractions.

SERVE (1975) a étudié les acides humiques de quelques sols siliceux de haute montagne (Pyrénées orientales). Ils ont été extraits avec la soude. Sur le Sephadex G25, il n'obtient généralement pas de fractions moléculaires, mais avec le Sephadex G50, il y a séparation nette des molécules en deux catégories principales et une catégorie mineure présente seulement pour certains échantillons.

D'après les fractionnements obtenus par cet auteur sur d'autres types de gels ainsi que sur l'importance relative des pics séparés sur Sephadex G25, il conclue que les acides humiques sont assez différents du point de vue de leurs molécules suivant leur origine en particulier en ce qui concerne leur propre degré de polymérisation.

C'est un résultat qui diffère assez des nôtres étant donné que nous n'obtenons pas de fractionnements distincts suivant le sol utilisé. Mais il faut préciser que nous n'avons employé que le Sephadex G25 et que nous avons surtout porté notre attention sur les composés extraits par le pyrophosphate. Cette reproductibilité des résultats donnés par les extraits chromatographiés sur gel indépendamment de

l'origine des échantillons expérimentés que nous avons obtenu, a été souligné également, nous venons de le voir, par WERSHAW. Elle a aussi été remarquée par BAILLY (1967) qui a utilisé des acides humiques extraits des horizons supérieurs de trois sols de nature différente de la région du RHARB (MAROC). Mais contrairement à WERSHAW et à nous, BAILLY obtient toujours cinq pics après fractionnement sur colonnes de Sephadex G25.

Pour la plupart des fractionnements que nous venons de signaler, fractionnements qui sont obtenus avec un entraînement des molécules en phase aqueuse en employant de l'eau distillée comme éluant, les auteurs considèrent la séparation des molécules humiques en faisant intervenir leurs poids moléculaires, ou tout au moins leurs encombrements moléculaires. C'est d'ailleurs sur cette base que sont utilisés les différents Sephadex pour séparer les molécules organiques telles que les protéines, les acides nucléiques et les polyssacharides.

JACQUIN et coll. (1971) ont utilisé d'ailleurs ce type de fractionnement pour estimer le poids moléculaire des acides humiques étudiés : 17.000 à 20.000 pour ceux d'un podzol, de l'ordre de 100.000 pour ceux d'un chernozem. BAILLY (1967) de la même façon, propose des poids moléculaires pour trois des cinq fractions d'acides humiques analysés : respectivement 5 à 10.000, 15 à 20.000, 150 à 200.000.

Cependant, lorsque des poids moléculaires sont déterminés pour des protéines par exemple, l'éluant employé est généralement une solution tampon telle que l'acétate de NaCl à pH 6. Nous avons donc essayé d'analyser le fractionnement de nos extraits sur la même colonne de Sephadex G25, mais en utilisant comme éluant non plus l'eau distillée à pH 8 mais une solution tampon.

4. RESULTATS OBTENUS AVEC UN TAMPON COMME ELUANT.

De nombreuses solutions tampon peuvent être employées pour les Sephadex, mais pour notre part, nous devons utiliser une solution donnant un pH alcalin de façon à assurer *une dispersion totale des substances humiques*. Rappelons que l'emploi de ces éluants permet d'éliminer les éventuelles interactions électrostatiques qui pourraient s'établir entre les molécules chromatographiées et les gels de dextrane. LINDQUIST (1967), SWIFT et POSNER (1971), CAMERON et coll (1972), ISHIWATARI (1973) ont mentionné ou utilisé des diverses solutions tampon pour séparer les substances humiques :

- le tampon Borate pH 9,1
- le tampon tris pH 9
- le tampon tris-carbonate-bicarbonate à pH 9,2 ou carbonate-bicarbonate pH 9,8 seul

- le tampon $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH 9

En ce qui nous concerne, nous avons employé le tampon tris-HCl pH 9 (414 ml M tris = 2-amino-2-(hydroxyméthyl)-propane 1,3-diol) + 50 ml M HCl par litre).

Les résultats donnés par les acides humiques AH_1 sont représentés sur la fig. 19 et se rapportent à la terre de Neuville-en-Ferrain (tN).

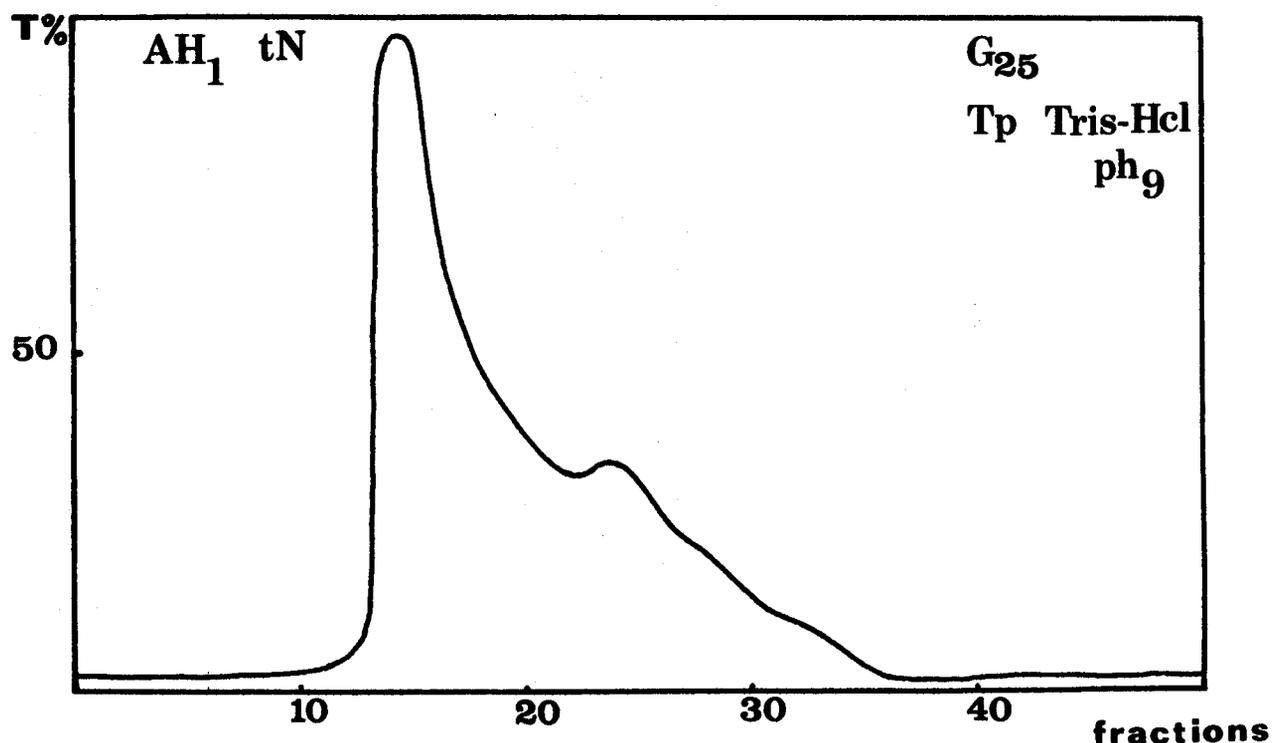


Fig. 19. Profil d'élution des acides humiques de la fraction AH_1 (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephadex G25 (2,5 x 40 cm) ; éluant : tampon tris-HCl à pH9.

Nous constatons donc que le profil d'élution est tout à fait différent de celui qui était donné avec l'eau comme éluant (fig. 12), c-à-d pratiquement qu'un seul pic d'élution qui correspond à des molécules exclues avec un léger épaulement au niveau de la fraction 23.

Compte tenu du poids moléculaire élevé des acides humiques, ce résultat est conforme puisque le type de Sephadex est un G25. Les molécules éluées dans la fraction 23 pourraient représenter une famille d'acides humiques possédant un poids moléculaire voisin de quelques milliers (mais inférieur à 5000).

SWIFT et POSNER (1971) ont également remarqué une telle disparité pour les acides humiques extraits au pyrophosphate ou à la soude et passer sur colonne de Sephadex G50 ou G100. Ils notent d'ailleurs peu de différences lorsque l'éluant utilisé est un tampon borate (0,025 M de tetraborate de sodium pH 9,5) ou un tampon

tris-HCl pH 9. Par contre, ils notent que les molécules exclues du Sephadex G100 sont plus importantes lorsque les acides humiques élués sont extraits au pyrophosphate que s'ils proviennent d'une extraction à la soude. L'éluant employé est une solution de chlorure de sodium 0,05 M, sous ces conditions, les acides humiques sont largement ionisés mais le sel devrait supprimer les interactions de charge. Cependant, les auteurs interprètent leurs résultats en faisant intervenir des phénomènes d'absorption qui n'auraient pu être éliminés par la suppression des seuls effets de charges électrostatiques. Cette distinction entre acides humiques extraits au pyrophosphate et acides humiques provenant de la soude n'étant donc pas uniquement basée sur leurs poids moléculaires, ils ne contredisent pas les résultats signalés précédemment par JACQUIN et coll. (1971).

Ce fractionnement différent des acides humiques sur gel de dextrane suivant que l'élution est effectuée avec de l'eau distillée ou avec une solution tampon, soulève le problème des forces qui ont conduit à une rétention de certaines molécules humiques sur la trame du gel en présence d'eau. Nous analyserons plus loin ce problème en même temps que celui qui est posé lorsque les échantillons déposés sur colonne sont acidifiés (chapitre IV).

Nous devons cependant souligner dès maintenant que *le poids moléculaire des substances humiques ne peut jamais lui seul intervenir pour expliquer l'obtention des différentes familles moléculaires* en fractionnant des extraits humiques sur Sephadex élué avec l'eau. Par conséquent, il ne faudra pas attacher une trop grande importance à la valeur des poids moléculaires indiqués par les auteurs qui ont utilisé ce mode de chromatographie (sauf lorsque ces valeurs sont relatives à des molécules exclues des gels, mais dans ce cas, elles ne peuvent être qu'approximatives).

III. RÉSULTATS OBTENUS SUR SEPHAROSE

Nous avons employé ce gel car il est destiné surtout à la séparation de molécules à très haut poids moléculaire. C'est un complexe préparé à partir de l'agarose c'est-à-dire un polysaccharide composé d'unités alternées de D-galactase et de 3,6 anhydre-L-galactase qui se présente sous forme de microperles de 50 à 200 μm de diamètre. La formation de cet état étant attribué à l'apparition de liaisons hydrogène entre les molécules.

Le type de Sepharose que nous avons choisi est plus exactement un produit qui présente en plus, des liaisons covalentes entre les chaînes d'agarose : *le Sepharose*

CL, 2B. Cette modification chimique du gel permet de meilleures performances techniques, car il est plus résistant en présence de ph acide, de température élevée, de solvants organiques etc... . De plus, il est souvent conseillé lorsque les substances à analyser risquent de former des agrégats en solution.

Les colonnes utilisées pour chromatographier sur ce genre de gel sont identiques aux précédentes (2,5 × 40 et 2,5 × 75 cm) et l'élution a été effectuée uniquement avec l'eau distillée à ph 8.

Les résultats obtenus ne sont cependant pas très intéressants car les fractions humiques ou fulviques ne donnent jamais de fractionnements très nets. Dans les fig. 20 et 21 sont représentés les profils d'élution obtenus avec les fractions AH₁ et AH₂, qui donnent les meilleurs résultats, puisqu'il y a quand même une séparation en deux familles moléculaires.

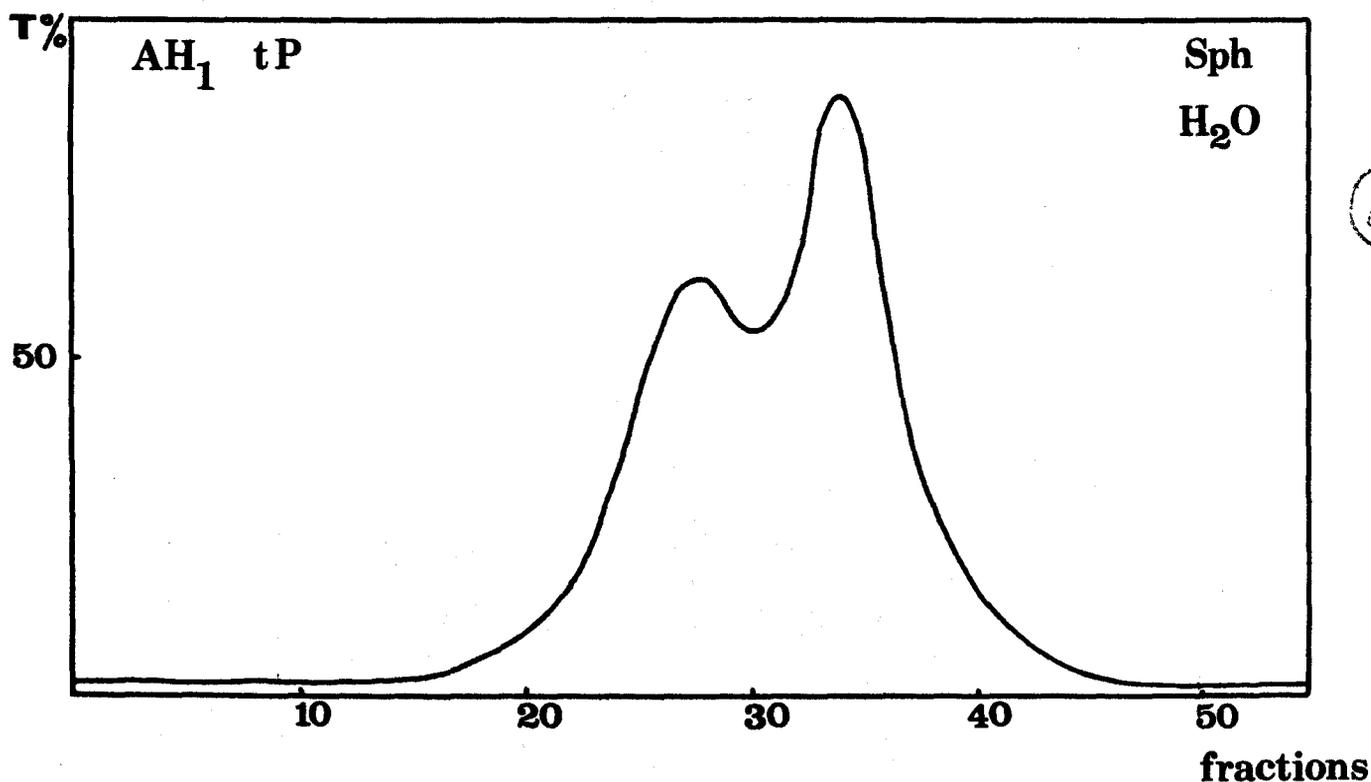


Fig. 20. Profil d'élution obtenu avec la fraction AH₁ (terre de Phalempin) sur colonne de Sepharose (2,5 × 40 cm) : éluant : eau ph8.

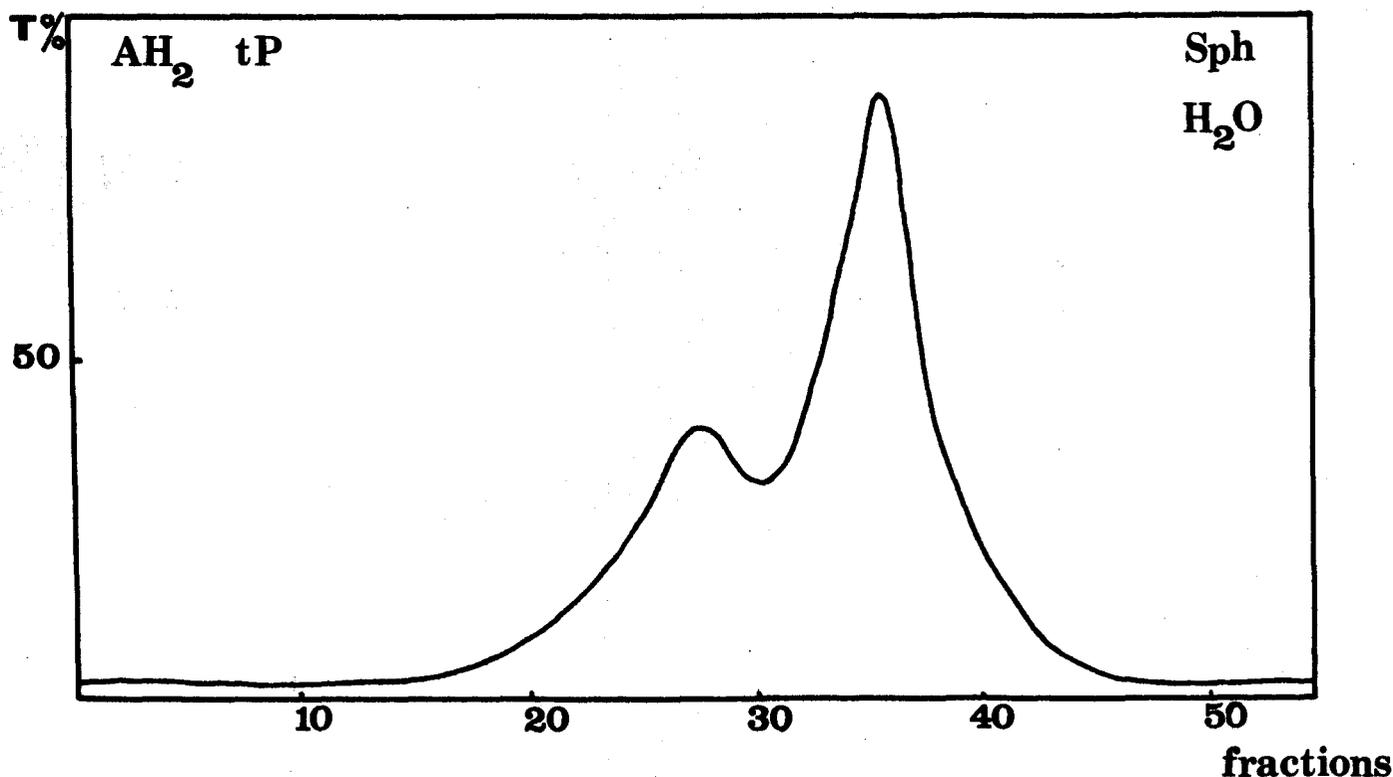


Fig. 21. Profil d'élution obtenu avec la fraction AH_2 (terre de Phalempin) sur colonne de Sepharose ($2,5 \times 40$ cm) ; éluant : eau $ph8$.

Ces résultats étant donné par des petites colonnes, nous avons essayé de fractionner les mêmes acides humiques sur la grande colonne mais nous n'avons jamais obtenu de séparation meilleure c-à-d deux pics distincts.

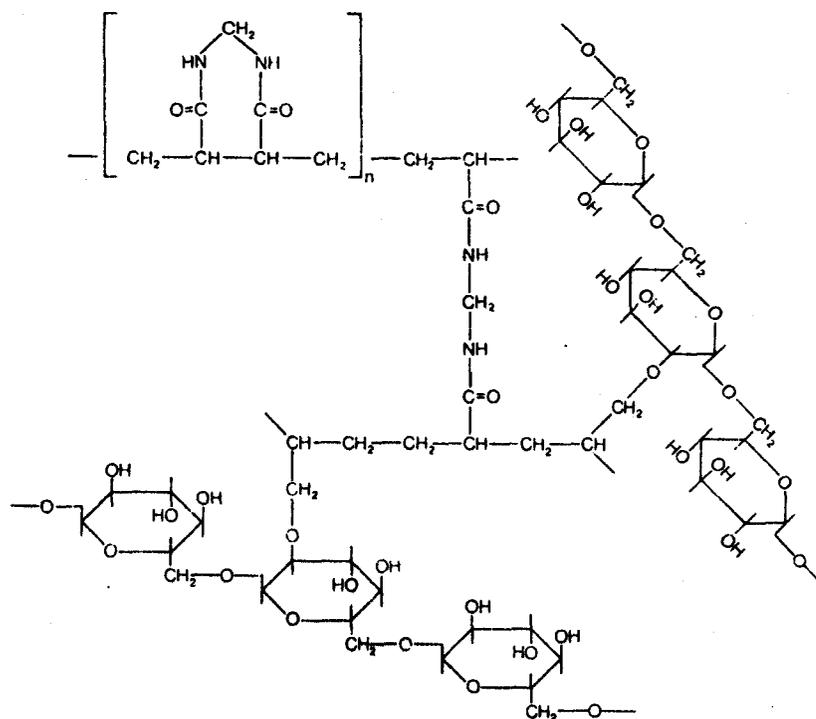
Compte tenu de la gamme de poids moléculaire que permet de séparer ce type de gel nous n'obtenons pas de molécules humiques exclues comme dans le cas du Sephadex G25. Ce qui est conforme à ce que nous pouvions attendre.

Ces résultats que nous a donné le Sepharose s'avèrent peu exploitables dans le cadre de notre travail, nous l'avons assez rapidement abandonné. D'ailleurs, la bibliographie mentionne très peu l'utilisation de ce gel : SWIFT et POSNER (1971) l'ont employé, mais n'ont présenté aucun profil d'élution. CAMERON et coll. (article du Journal of Soil Science) quant à eux, ont présenté un profil d'élution qui met en évidence aussi deux familles moléculaires à partir d'un échantillon d'acides humiques. Mais comme le gel qu'ils ont employé est un peu différent des

nôtres. (Sephacryse 6B destiné à des poids moléculaires un peu plus faibles), la première catégorie de molécules est exclue.

IV. RÉSULTATS OBTENUS SUR SEPHACRYL

Ce gel est encore un polymère modifié : il est préparé en créant des liaisons covalentes entre les radicaux allyles et le N,N'-méthylène bisocrylamide. Sa structure hypothétique peut être représentée de la façon suivante :



Il permet la séparation des molécules globulaires inférieures à 250.000 pour le Sephacryl S200 et inférieures à 1.500.000 pour le Sephacryl S300 et présente l'avantage de ne pas provoquer de tassement dans les colonnes grâce à sa structure rigide.

La plupart de nos essais ont été réalisés avec le Sephacryl S300. En utilisant l'eau distillée à pH 8 comme éluant et des colonnes de 2,5 × 40 cm, nous obtenons

des résultats qui se rapprochent de ceux donnés par le Sephadex G25 c-à-d une séparation assez nette en deux familles moléculaires. Cependant les pics d'enregistrement présentent assez souvent des épaulements, ce qui prouve un fractionnement peut-être plus poussé.

Dans les figures 22, 23 et 24 sont représentés les profils d'élution correspondant à AH_1 , AH_2 et AF_1 .

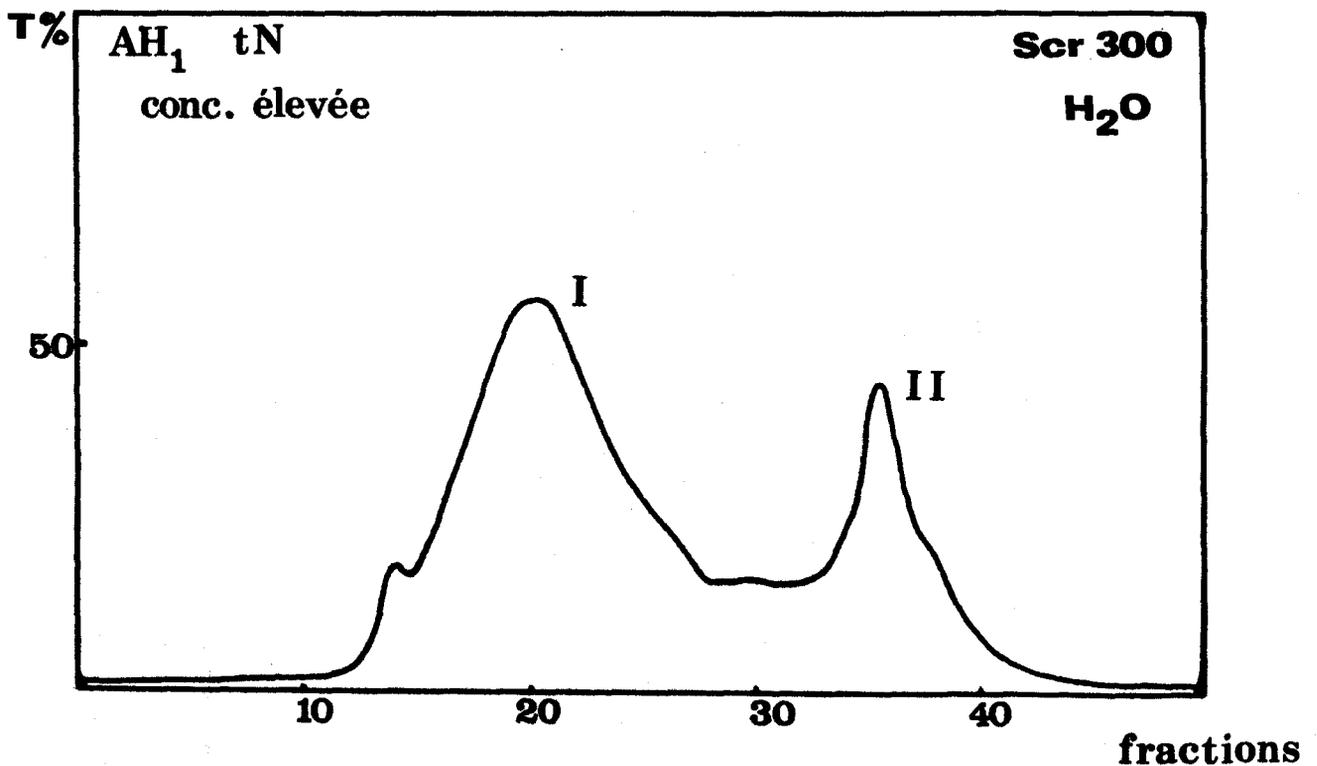
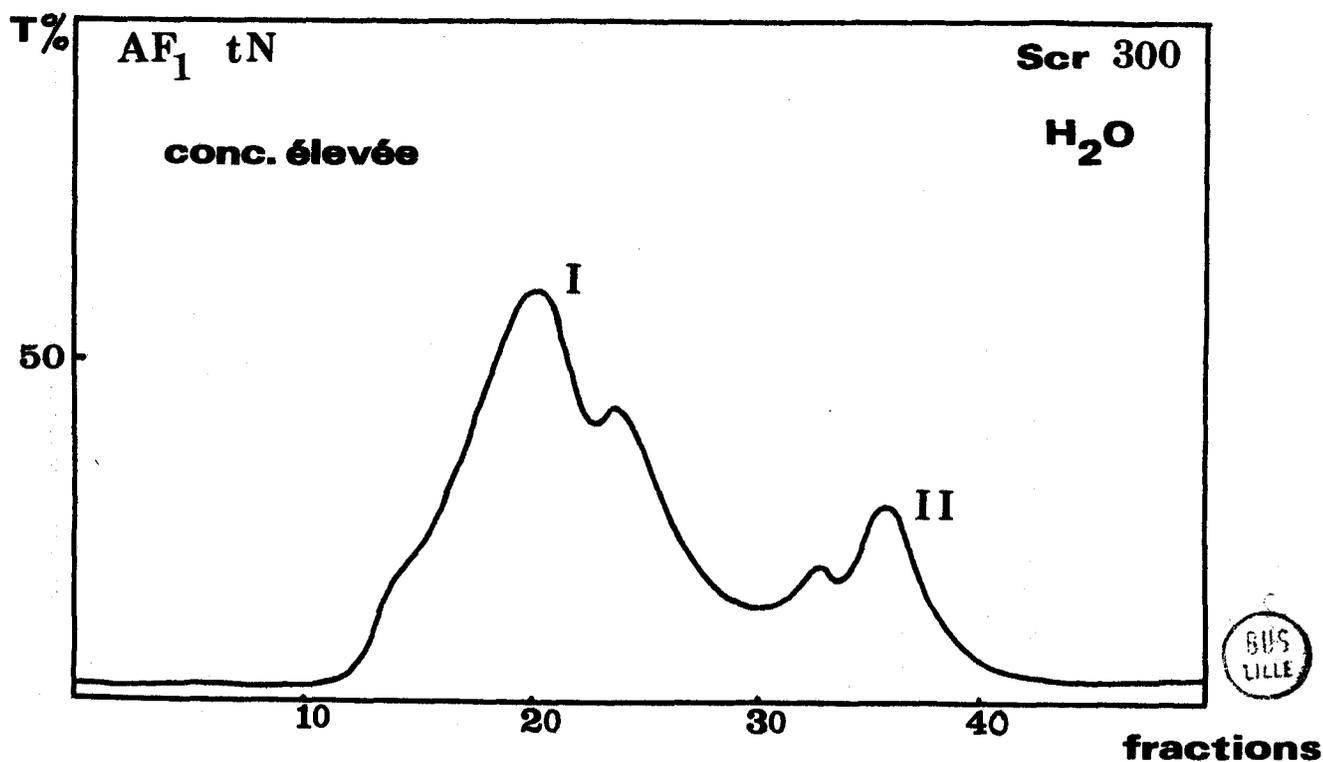
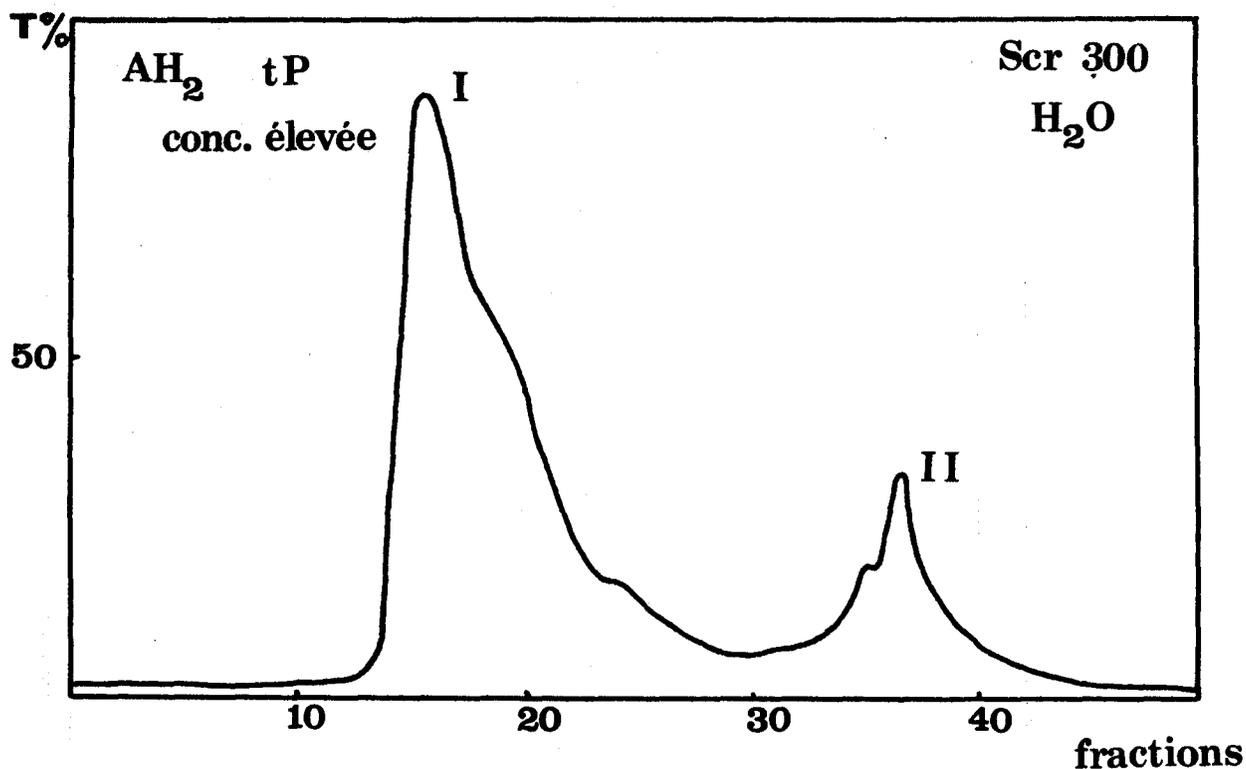


Fig. 22. Profil d'élution obtenu avec les acides humiques extraits par le pyrophosphate neutre (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephadex S300 (2,5 x 40 cm) ; éluant : eau pH 8 ; concentration "élevée".



Nous pouvons maintenant noter une distinction qui apparaît avec ce Sephacryl entre les pics I des fractions AH_1 et AH_2 . En effet, le pic I de AH_2 se rapporte à des molécules qui sont pratiquement toutes exclues, alors que ce n'est pas le cas pour AH_1 . Ce résultat confirme par conséquent que les molécules humiques extraites par le pyrophosphate neutre ont une conformation moléculaire différente que celles qui proviennent de l'extraction à pH alcalin.

Ces profils d'élution présentés dans les figures correspondent aux valeurs habituelles notées précédemment à propos du Sephadex (1ml-teneur approximativement égale à 4 mg de carbone organique). Cependant, lorsque la quantité d'extrait chromatographié est beaucoup plus faible, on note un retard très important dans l'apparition des premières molécules éluées de la colonne. Ce phénomène est illustré par le diagramme de la figure 25.

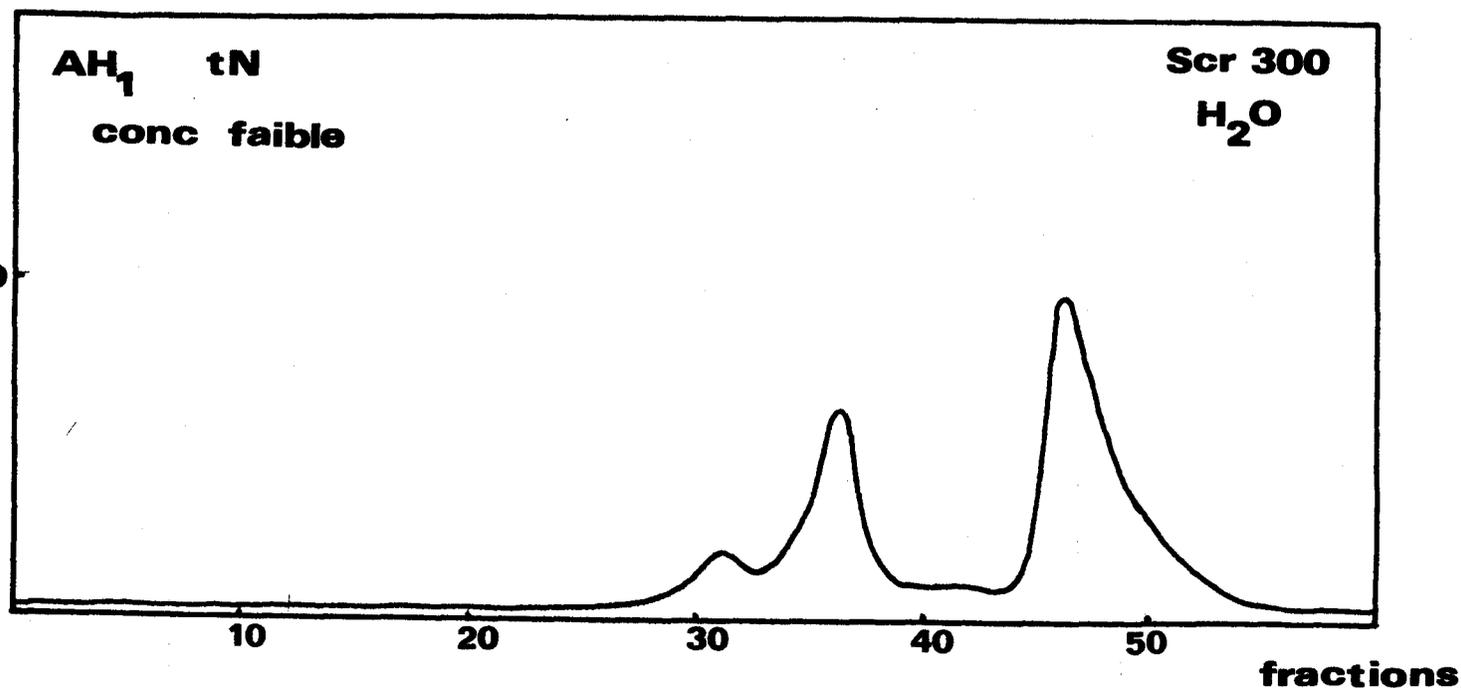


Fig. 25. Fractionnement des acides humiques extraits par le pyrophosphate neutre (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephacryl S300 (2,5 × 40 cm) éluant : eau pH 8 ; concentration "faible".

Celle-ci représente le profil d'élution du même échantillon AH_1 de la figure 22 mais à une concentration plus faible équivalente approximativement à la moitié de la concentration habituelle (dans les figures nous avons mentionné ces concentrations en prenant la concentration "élevée" pour la concentration habituelle et concentration "faible", lorsque la quantité analysée est réduite de moitié). Dans ce cas, les premières molécules d'acides humiques n'apparaissent que vers la 30ième fraction, mais le profil d'élution fait toujours apparaître deux familles moléculaires majeures.

Ces résultats signifiant l'intervention de phénomènes très importants d'absorption de molécules sur la trame du Sephacryl, nous avons comparé, particulièrement avec la fraction d'acides humiques AH_1 , le profil d'élution donné par le tampon tris-Hcl à ph 9 au lieu de l'eau distillée. Ce profil est indiqué dans la figure 26 qu'il faut comparer avec la figure 22 qui correspond au même échantillon et à la même concentration. Nous constatons que lorsque les forces d'absorption sont éliminées et que le fractionnement ne met plus en jeu que le poids moléculaire des substances, nous n'aboutissons plus qu'à un seul pic important. (Ce dernier présente le maximum de concentration moléculaire dans la fraction 28) Un pic secondaire peut être noté ; il correspond à des molécules exclues du gel ; fraction 12 et 13. Celles-ci auraient donc un poids moléculaire voisin de 1.500.000. Ce qui est assez surprenant.

Nous nous sommes servis du second type de Sephacryl 200 en employant les mêmes colonnes et le même tampon tris pour étudier le comportement de cette fraction AH_1 de la terre de NEUVILLE. Le profil d'élution obtenu qui est représenté dans la figure 27 est assez semblable aux précédents : il présente un pic avec une absorption maximum dans les fractions 27, 28 et des molécules exclues dans la fraction 13, mais celles-ci sont moins nettement séparées que sur la colonne de Sephacryl S300. Ce schéma peut être interprété en faisant intervenir la présence de grosses molécules dans les fractions 14, 15, 16 dont l'élution a été avancée par rapport au Sephacryl 300. Ce qui est normal étant donné la gamme de séparation moléculaire caractéristique de ce type de gel. Pourtant, la quantité de molécules exclues avec ce Sephacryl 200 n'est pas plus important qu'avec le Sephacryl 300. Ceci ne nous permet toujours pas de particulariser les molécules apparemment exclues du Sephacryl 300.

Comme ces Sephacryl sont commercialisés depuis relativement peu de temps, nous ne pouvons pas comparer nos résultats avec ceux donnés par la bibliographie dans laquelle nous n'avons trouvé à l'heure actuelle aucun enregistrement.

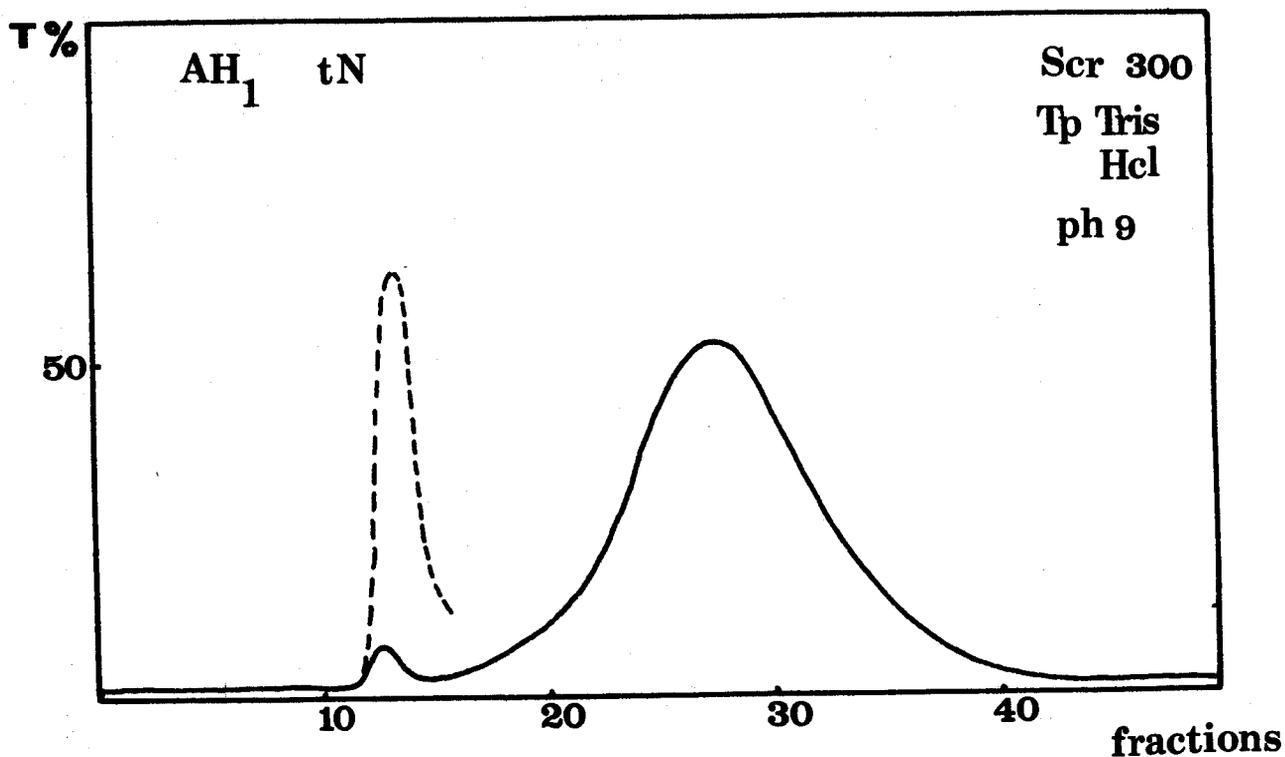


Fig. 26. Profil d'élution obtenu avec les acides humiques extraits par le pyrophosphate neutre (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephacryl S300 (2,5 × 40 cm) : éluant : tampon tris-Hcl ph9. Les pointillés indiquent le profil obtenu séparément avec le dextrane bleu 200.

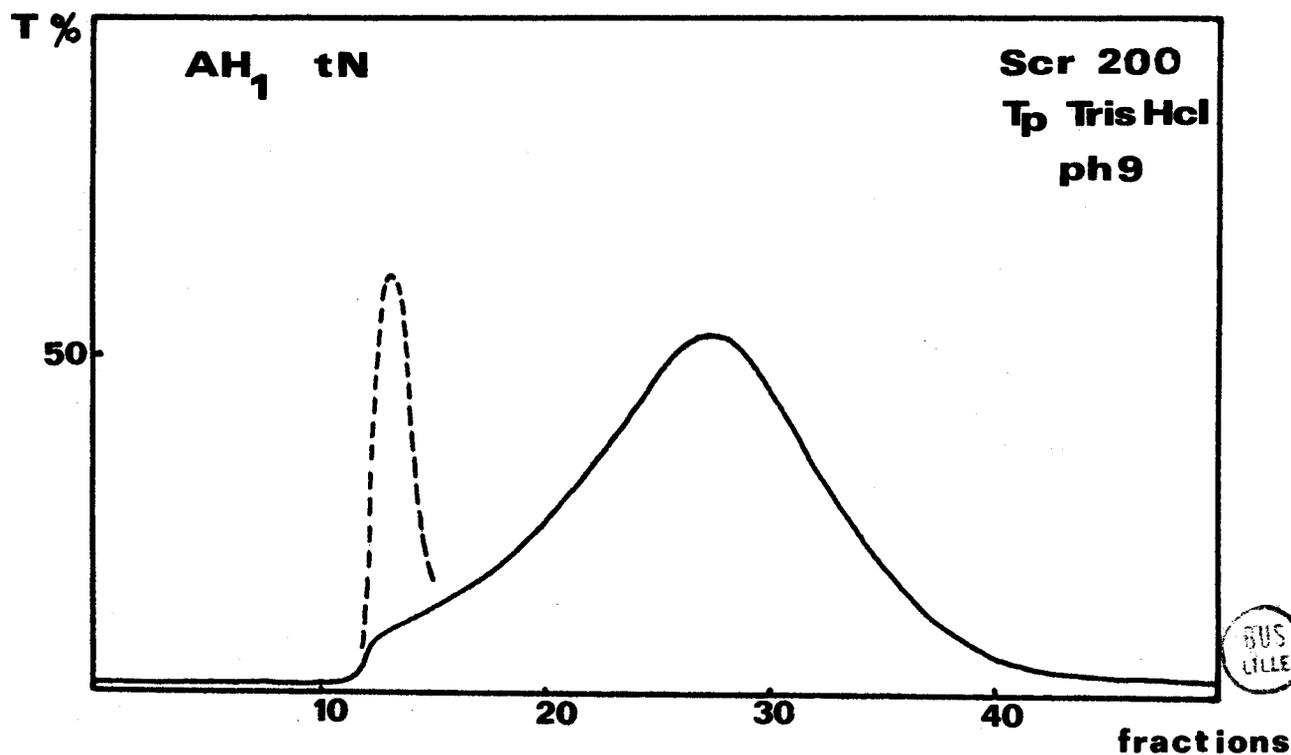


Fig. 27. Profil d'élution obtenu avec les acides humiques extraits par le pyrophosphate neutre (terre de Neuville-en-Ferrain) sur colonne de Sephacryl S200 (2,5 × 40 cm) éluant : tampon tris-Hcl ph9).

CHAPITRE IV

ETUDE PARTICULIERE
DU
FRACTIONNEMENT DES ACIDES HUMIQUES ACIDIFIES

Tous les fractionnements que nous venons de décrire ont été obtenus avec des échantillons d'acides humiques ou d'acides solubilisés à pH alcalin. Nous avons cependant remarqué, que lorsque les acides humiques étaient simplement repris avec de l'eau après leur séparation en centrifugation, les profils d'éluion obtenus sur Sephadex G25 n'étaient plus identiques ni parfaitement reproductibles.

En essayant de déterminer les anomalies causant ce phénomène, nous nous sommes rendus compte que *le pH des échantillons* déposés sur les colonnes pouvait, lorsqu'il était trop acide, *modifier très largement l'allure du fractionnement des substances humiques.*

A la suite de cette observation, nous avons procédé à une étude systématique de l'influence du pH des extraits sur leur fractionnement moléculaire.

1° RESULTATS EXPERIMENTAUX

Ces expériences ont été effectuées essentiellement à partir des substances humiques du sol de Neuville-en-Ferrain (tN) et de Phalempin (tP). Les conditions d'extraction d'acides humiques et fulviques sont toujours les mêmes ainsi que les conditions chromatographiques. Mais cette fois, avant de passer les extraits sur la colonne de Sephadex G25 (2,5 x 40), *nous les avons amené à un pH donné compris entre 1,1 et la neutralité.*

Tant que le pH de ces extraits est *supérieur à 2*, leur séparation sur Sephadex G25 élué avec l'eau distillée à pH 8, conduit toujours à la séparation classique en deux catégories principales de molécules dont les unes sont exclues du gel (Pic I), alors que l'éluion des secondes est retardée (Pic II).

Dès que *le pH est inférieur à 2*, nous constatons qu'une fraction de molécules précédemment exclues (Pic I) manifeste une certaine rétention se traduisant par l'apparition du nouveau pic sur les enregistrements. L'éluion de ces substances *Pic I'* est d'autant plus retardé que le pH est bas, mais le pH qui permet de les caractériser le mieux est compris dans nos conditions expérimentales entre 1,4 et 1,5.

La figure 28 illustre l'influence du pH dans l'allure du fractionnement des acides humiques provenant de AH₁ de la terre de Neuville. C'est en effet avec ces acides humiques extraits au pyrophosphate neutre que le résultat est le plus net, c-à-d que la séparation des molécules formant le pic I' est la plus marquée car elles représentent une catégorie relativement plus importante.

Ce fractionnement particulier des molécules constitutives à l'acidification a cependant été noté avec les autres extraits AH₁ et AH₂ et non seulement avec la terre de Neuville, mais aussi avec les autres échantillons de terre. Par contre les fractions fulviques n'ont pas manifesté cette particularité ou tout au moins elles

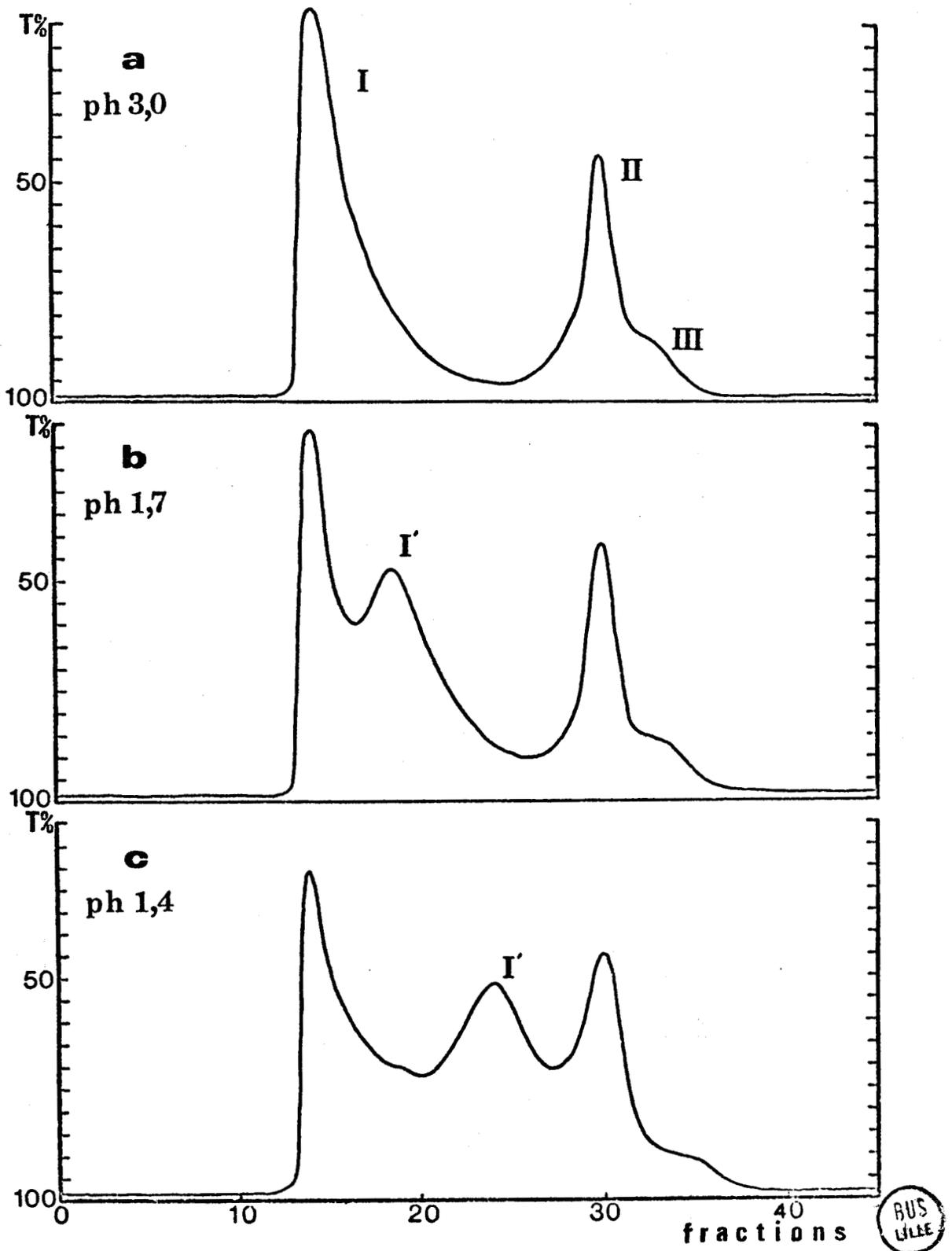


Fig. 28. Fractionnement des acides humiques sur colonnes de Sephadex G25 éluée avec de l'eau à pH 8. Avant la chromatographie, le pH des échantillons est ajusté à 3,0 (a) ; 1,7 (b) ou 1,4 (c) ; fraction AH₁ - terre de Neuville-en-Ferrain tN

donnaient un résultat peu significatif.

Nous avons essayé d'utiliser le Sephacryl pour fractionner AH_1 , mais à pH acide, les phénomènes de rétention avec ce gel sont tels qu'il affectent toutes les molécules de sorte qu'avec l'eau distillée à pH 8 l'élution devient pratiquement impossible. En effet, les molécules après un certain temps, ne migrent pratiquement plus sur la colonne, et nous sommes obligés de les "décrocher" en employant comme éluant de la soude N/10.

2° DISCUSSION

Un profil d'élution différent obtenu avec les acides humiques dont le pH s'écarte beaucoup de la neutralité a déjà été noté en 1972 par TAN et GIDDENS et par SÖCHTIG, mais contrairement à nous lorsque le pH des extraits était très basique.

TAN et GIDDENS qui aboutissaient avec des acides humiques extraits avec la soude, à une séparation sur Sephadex G50 élué avec l'eau distillée en deux fractions lorsqu'ils sont ajustés à un pH de 7, constatent pour un pH de 11 l'apparition d'une 3e fraction dont l'ordre d'élution est intermédiaire entre les deux précédentes.

SÖCHTIG, qui a présenté ses résultats au cours du congrès international sur l'étude des substances humiques qui s'est déroulé à NIEWERSLUIS, a observé ce phénomène à partir d'un pH de 10 en utilisant du Sephadex G25 élué avec l'eau et un extrait de substances humiques brutes obtenu avec le traitement par la soude à partir d'un sol de podzol. Dans ce cas, l'alcalinisation permet même le fractionnement de *trois catégories moléculaires*, alors que les extraits neutres n'en donnaient qu'une seule.

Nous avons nous même essayé de voir si avec nos extraits AH_1 amenés à pH 11 nous obtenions un phénomène analogue, mais cette expérience effectuée à deux reprises n'a apporté *aucun changement dans les profils d'élution* par rapport à ce que donnait un pH neutre.

Indépendamment des pH des échantillons, *la concentration des extraits appliqués* sur la colonne peut également faire apparaître de nouveaux pics lors des éluations. SÖCHTIG le signale en utilisant toujours le Sephadex G25 : avec une très faible concentration d'extraits humiques il n'obtient que deux pics, alors qu'une concentration élevée met en évidence l'individualisation d'une 3e fraction moléculaire qui est issue des molécules précédemment exclues du gel.

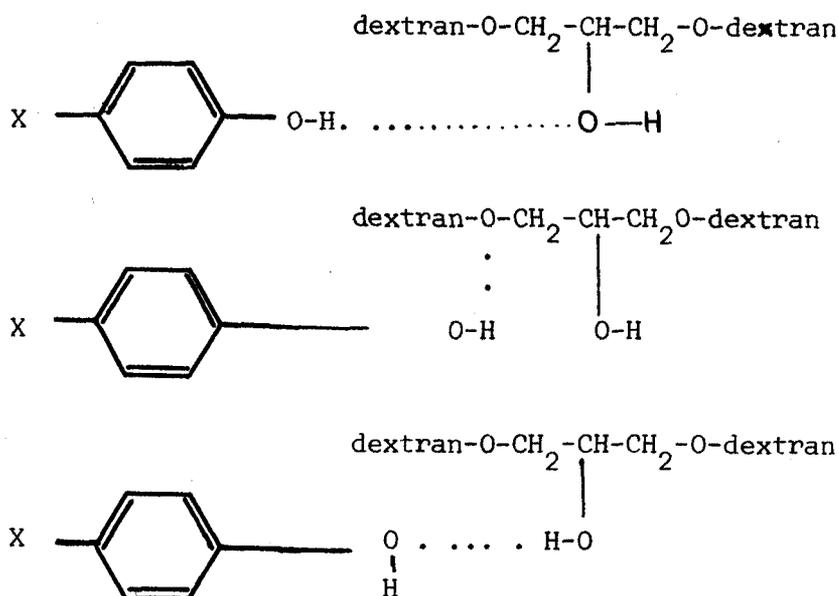
SWIFT et POSNER (1971) ont également noté cette influence de la concentration à propos du fractionnement sur Sephadex G100 d'un acide humique extrait par le pyrophosphate. Plus la concentration de l'échantillon est élevée moins il y avait de molécules exclues.

En général, les auteurs expliquent difficilement ces phénomènes dus à des variations de pH ou à des variations de concentration de substances humiques. Les interactions qui peuvent intervenir entre la matrice du gel et les molécules circulant dans le gel sont apparemment de deux types (JANSON, 1967) :

- d'une part des liaisons électrostatiques
- d'autre part des forces attractives

Les interactions électrostatiques peuvent s'expliquer par le fait que les gels Sephadex et Sephacryl contiennent un petit nombre de groupes carboxyles terminaux. Des cations pourraient ainsi être retenus par la matrice polysaccharidique tout au moins lorsque leur concentration est faible. Cette hypothèse a été avancée par GELOTTE (1960), SWIFT et POSNER (1971).

Les forces attractives, qui font donc intervenir des molécules non ioniques, sont représentées par les forces de WANDER WAALS ou des ponts hydrogènes. C'est par exemple en faisant intervenir ces liaisons hydrogènes que BROOK et MUNDAY (1970) interprètent la rétention des phénols, aniline et acide benzoïque sur les Sephadex. Ils proposent le type d'interactions suivant pour les phénols monosubstitués :



En ce qui concerne, pour expliquer aussi bien la rétention des molécules humiques correspondant au pic II lorsque les échantillons sont neutralisés que celles des molécules humiques du pic I' obtenues par acidification, il est difficile de faire intervenir des liaisons électrostatiques impliquant les groupes carboxyles du Sephadex ou du Sephacryl. En effet, bien que le Sephacryl d'après les fabricants, semble contenir une proportion plus élevée de carboxyles et que c'est avec lui qu'on obtient les rétentions les plus fortes, on ne voit pas très bien de quelle façon les molécules humiques pourraient intervenir dans ce type de liaison, étant donné que les sites fonctionnels les plus fréquents chez eux sont *anioniques* et non pas *cationiques*.

Cette hypothèse pourtant expliquerait très bien le comportement de nos molécules I' : un pH très acide aurait pu provoquer une augmentation de leur affinité avec le gel à la partie supérieure des colonnes par suite d'un accroissement de leurs charges ioniques, d'où leur fixation momentanée sur la matrice. Ensuite au fur et à mesure de l'éluion avec l'eau distillée, le pH s'alcalinise progressivement on aurait un "*décrochage*" de ces molécules, celui-ci se produisant d'autant plus tôt que le pH initial de l'échantillon était moins fortement acide (d'où une éluion de tant plus tardive du pic I' lorsque le pH est très bas).

On peut toutefois suggérer beaucoup d'autres hypothèses, par exemple une *modification de la conformation moléculaire des acides humiques de type I' en pH acide*. Ceci occasionne un degré de polymérisation différent ou une accessibilité différent de certaines de leurs fonctions conduisant à leur rétention sur le gel.

En outre, nous savons que le pH intervient sur la dispersion des molécules humiques et à partir d'un pH de 3,5 par exemple, les études viscométriques prouvent que les micelles d'acides humiques commencent à s'agglutiner (FLAIG et coll. 1965).

La formation de tels agrégats à pH acide a pu occasionner un comportement différent de ces molécules lors de leur chromatographie.

La comparaison au point de vue physico-chimique des molécules humiques représentant le pic I et I', peut nous donner des indications sur leurs conduites chromatographiques distinctes.

C'est en partie dans ce sens que nous avons essayé d'effectuer quelques analyses.

CHAPITRE V

ANALYSE DES FRACTIONS SEPARÉES A pH ACIDE

1. PURIFICATION DES ACIDES HUMIQUES (AH₁) CORRESPONDANT AUX PICS I et I'.

Pour comparer les caractéristiques des molécules d'acides humiques qui, à pH acide, ont présenté une rétention (pic I4) ou pas de rétention (pic I) sur Sephadex G25, il était avant tout nécessaire de les isoler le plus parfaitement possible. Aussi dans ce but, nous avons employé une colonne de Sephadex G25 plus haute que celle qui a servi à nos expériences précédentes. Comme nous le remarquons sur la fig. 29 une telle colonne (2,5 × 75 cm) permet une séparation plus parfaite des pics I et I4 puisque les fractions qui sont intermédiaires entre les pics n'absorbent pratiquement pas en U.V. Le maximum de concentration de chacune des familles moléculaires est situé respectivement dans les fractions 28, 45, 56 pour les pics I, I' et II.

Pour parfaire la purification et débarrasser les fractions moléculaires I et I' de toute trace de soude (car l'éluant utilisé pour la chromatographie précédente est toujours de l'eau distillée amenée à pH 8 avec de la soude) nous avons d'abord essayé de procéder de la façon suivante :

- les tubes contenant des molécules correspondant au pic I et au pic I' sont rassemblés et la solution obtenue est concentrée à l'évaporateur rotatif sous-vide. On ajoute alors de l'acide sulfurique de façon à obtenir un pH de 1 pour précipiter les acides humiques. Ceux-ci sont récupérés par centrifugation et rechromatographiés sur Sephadex G25 (grande colonne). Nous n'avons pu cependant poursuivre nos purifications en utilisant ce procédé car *les acides humiques I' ne précipitaient pratiquement pas à pH 1.*

Nous avons alors modifié nos modalités opératoires : après avoir effectué une série de chromatographie sur la colonne G25 en employant AH₁ pH 1,4 (généralement de l'ordre de six afin d'obtenir des concentrations plus élevées d'acides humiques).

Les éluants correspondant aux pics I et I' sont rassemblés, puis concentrés jusqu'à un très faible volume (quelques ml) de façon à pouvoir être rechromatographiés sur G25. Nous avons d'abord essayé d'effectuer cette chromatographie de purification (qui correspond aux molécules I ou I' suivant le cas et un ou 2 pics mineurs) en utilisant de l'eau distillée seule. Mais celle-ci a parfois provoqué la rétention importante des molécules de sorte que nous avons été obligé de continuer à éluer avec de l'eau distillée à pH 8.

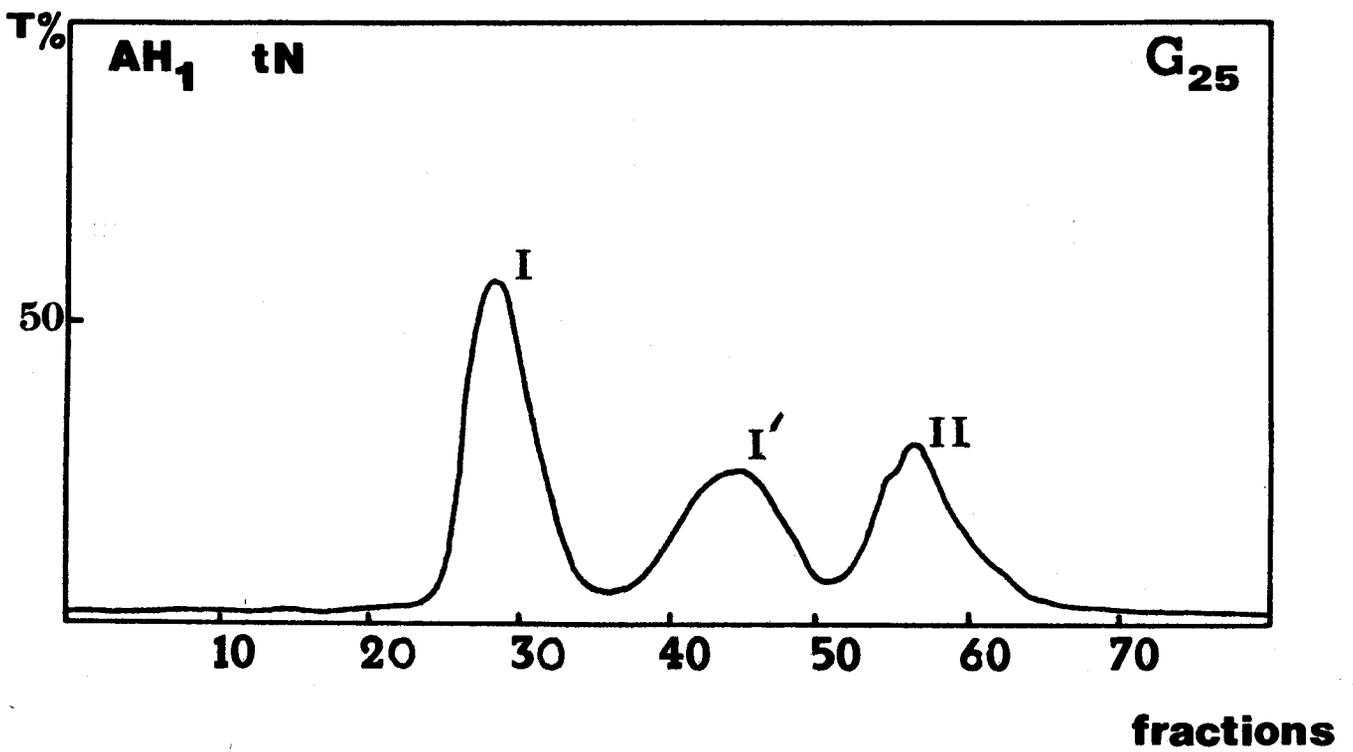


Fig. 29. Fractionnement de AH₁ pH 1,4 terre tN sur Sephadex G₂₅ grande colonne.

Après cette chromatographie de purification, les fractions d'acides humiques sont à nouveau concentrées sous-vide, dialysées contre de l'eau distillée en chambre froide afin d'éliminer les traces de soude, puis lyophilisées. Au cours de ces étapes de purification, nous avons constamment remarqué que le ph des solutions contenant les acides humiques de type I' était légèrement plus faible que celles qui renfermaient les molécules de type I.

2. DETERMINATION DE LEUR POIDS MOLECULAIRE APPROXIMATIF.

D'après les résultats des fractionnements chromatographiques obtenus jusqu'à maintenant il n'était pas possible de dire si les molécules I et I' avaient un poids moléculaire identique ou différent. L'utilisation de la chromatographie sur gel permet lorsque l'éluant est convenable *d'apprécier ces poids moléculaires.*

Compte tenu de la valeur des poids moléculaires le plus souvent cités dans la bibliographie nous avons choisi comme gel *le Sephacryl S200*, en conservant comme éluant le tampon tris-HCl ph 9 et en employant les colonnes de petit modèle (2,5 × 40 cm).

Les résultats obtenus avec les acides humiques de type I et I' sont indiqués dans *les figures 30 et 31.* Pour les acides humiques de type I on trouve le maximum d'absorption *dans la fraction 22* (le V_0 donné par le dextrane bleu correspond à la fraction 13) alors que pour les molécules de type I', ce maximum est obtenu *pour la fraction 27.* Ces deux familles moléculaires ne semblent par conséquent pas avoir le poids moléculaire identique ; le type I' possédant une valeur plus faible (pour être plus exact il est d'ailleurs préférable, pour ces acides humiques de parler plutôt de *poids moléculaire privilégié*, car nous n'avons pas affaire à des molécules parfaitement homogènes).

$$- \text{ Pour les acides humiques I ; } K_d = \frac{45}{V_1}$$

$$- \text{ Pour les acides humiques I' ; } K_d = \frac{70}{V_1}$$

Au lieu de caractériser ces substances par leur K_d dont nous ne pouvons donner la valeur exacte, nous pouvons définir une valeur proche qui est *le K_{av}* utilisée par certains auteurs dont ANDREUX et METCHE (1975).

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

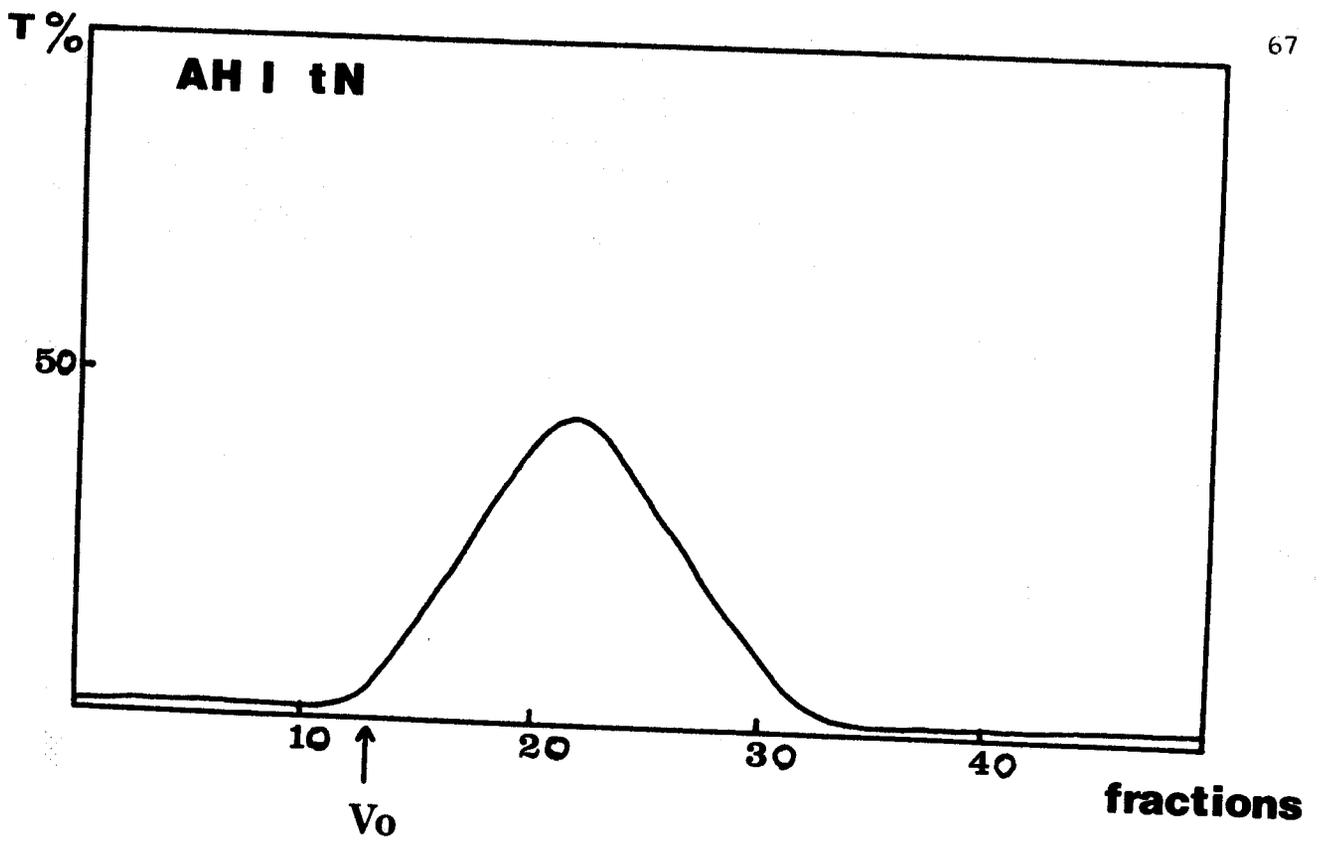


Fig. 30. Acide humique de type I sur Sephacryl 200 T_p tris-Hcl.

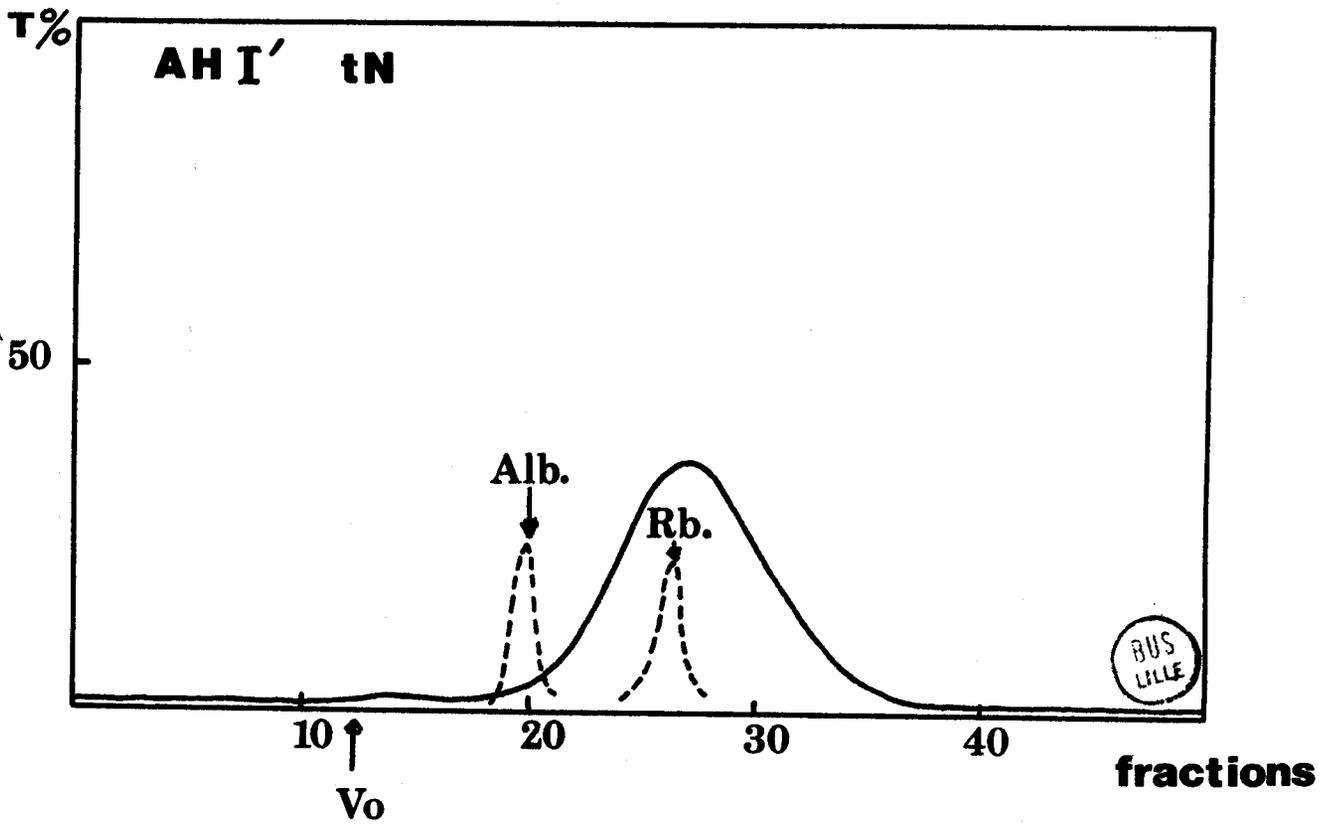


Fig. 31. Acide humique de type I' sur Sephacryl 300. T_p tris-Hcl. Les pointillés profil d'élution de quelques PM connues. Albumine (Alb) PM 67000 et Ribonuclease (Rb) PM 13700).

Il ne fait plus intervenir V_i et le V_t est facile à calculer puisqu'il correspond au volume total du gel gonflé.

- Pour les acides humiques I ; $K_{av} = 0,35$
- Pour les acides humiques I' ; $K_{av} = 0,54$

Ces valeurs sont relatives et permettent de les comparer à d'autres indépendamment du type de colonne employée, mais si nous voulons avoir une idée du poids moléculaire, nous devons passer sur la colonne des substances à poids moléculaire parfaitement connue.

Pour ces essais, nous avons utilisé différentes protéines et deux d'entre elles sont plus particulièrement intéressantes car elles ont été éluées dans des fractions voisines de celles qui ont reçu nos acides humiques. Il s'agit de l'Albumine bovine qui a un poids moléculaire de 67.000 et qui a été éluée dans la fraction 20 d'où un K_{av} de 0,27) et la Ribonucléase ayant un poids moléculaire de 13.700 et qui est éluée dans la fraction 26 d'où un K_{av} de 0,50).

D'après cet étalonnage, nous pouvons par conséquent proposer un poids moléculaire privilégié de 13.000 pour nos acides humiques I'. Pour les acides humiques de type I, ce poids moléculaire privilégié serait proche de 50.000, mais dans ce cas, cette valeur est beaucoup plus aléatoire car pour cette fraction humique, nous avons des molécules qui sont éluées dans les tubes 13, 14 c-à-d à la limite d'exclusion du gel (leur poids moléculaire pourrait être proche de 200.00).

Il faut aussi signaler que ces poids moléculaires que l'on attribue aux acides humiques sont donnés par comparaison avec des molécules protéiques de nature globulaire. Or, l'architecture des molécules humiques est encore énigmatique et ces valeurs, sont par conséquent approximatives. Néanmoins ces analyses nous ont prouvé que dans l'ensemble des fractions humiques de type I' ont un poids moléculaire nettement moins élevé que celles du type I.

3. ANALYSE DE LEURS SPECTRES UV ET VISIBLE.

L'analyse de l'absorption des molécules humiques en lumière UV et visible est une technique utilisée depuis assez longtemps étant donné que ces substances possèdent de nombreux noyaux aromatiques et de nombreuses doubles liaisons. En principe, l'absorption dans la gamme de longueur d'onde des lumières visibles augmente en fonction du degré de condensation des noyaux aromatiques, de l'importance du carbone dans ces noyaux ou dans les chaînes aliphatiques.

On a souvent utilisé pour caractériser les différentes substances humiques

une valeur E_4/E_6 qui correspond au rapport des densités optiques obtenues à 465 et 650 m μ (ou parfois 400 et 600 m μ). Ce rapport est indépendant de la concentration des molécules ; plus les molécules sont condensées plus le rapport E_4/E_6 décroît, et plus le poids moléculaire est élevé plus il décroît également.

Nous avons effectué ces analyses spectroscopiques à l'aide d'un appareil à double faisceau UNICAM SP 800 (PHILIPS). Le calcul du rapport E_4/E_6 a donné les valeurs suivantes pour nos fractions AH_1 et AF_1 :

- pour AH_1

Pic I $E_4/E_6 = 4,4$

Pic I' $E_4/E_6 = 4,2$

Pic II $E_4/E_6 = 3,7$

- pour AF_1

Pic I $E_4/E_6 = 4,8$

Pic II $E_4/E_6 = 5,5$

Ces résultats sont par conséquent conformes aux données classiques mais nous renseignent très peu sur les caractéristiques moléculaires de nos fractions d'acides humiques I et I', étant donné que la différence entre leur E_4/E_6 est relativement minime.

Les enregistrements obtenus en lumière UV présentent un tracé un peu plus intéressant et sont représentés dans la figure 32. La densité optique* augmente progressivement vers les longueurs d'ondes les plus courtes jusqu'à 210 m μ environ. Ce qui est normal puisqu'à ces faibles longueurs d'ondes, les noyaux aromatiques et les doubles liaisons absorbent énormément. Cependant, nous ne distinguons guère des différences entre les tracés obtenus, les molécules d'acides humiques purifiés I et I'.

Ces spectres donnés par I et I' sont d'ailleurs identiques à ceux donnés par le pic II de la même fraction AH_1 et avec les pics correspondant aux acides fulviques AF_1 . Cette similitude d'aspect de la plupart de tracés obtenus en UV ou en visible, a été signalé par la plupart des auteurs qui ont effectué des analyses

* on appelle *densité optique* le logarithme de l'inverse de la transmission à une longueur d'onde donnée.

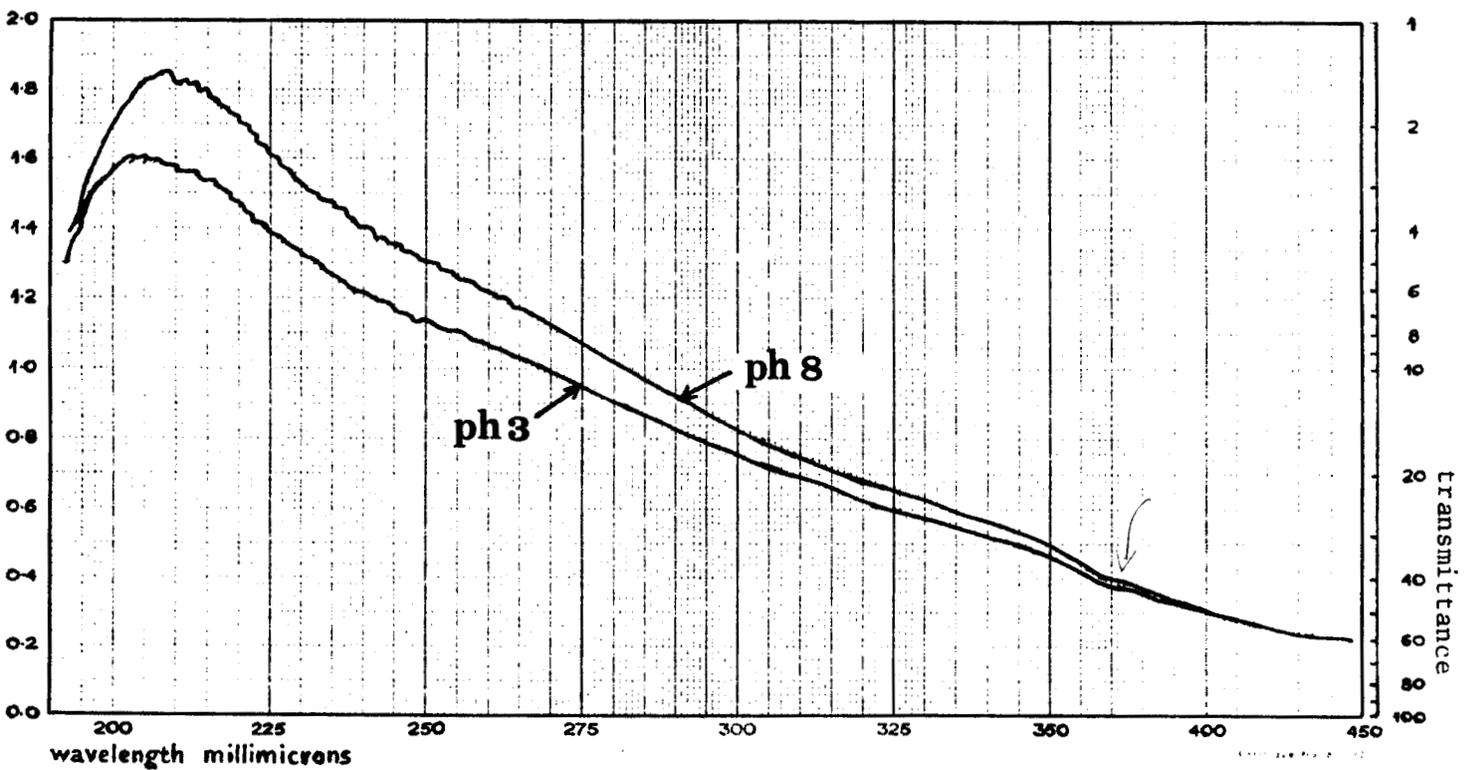
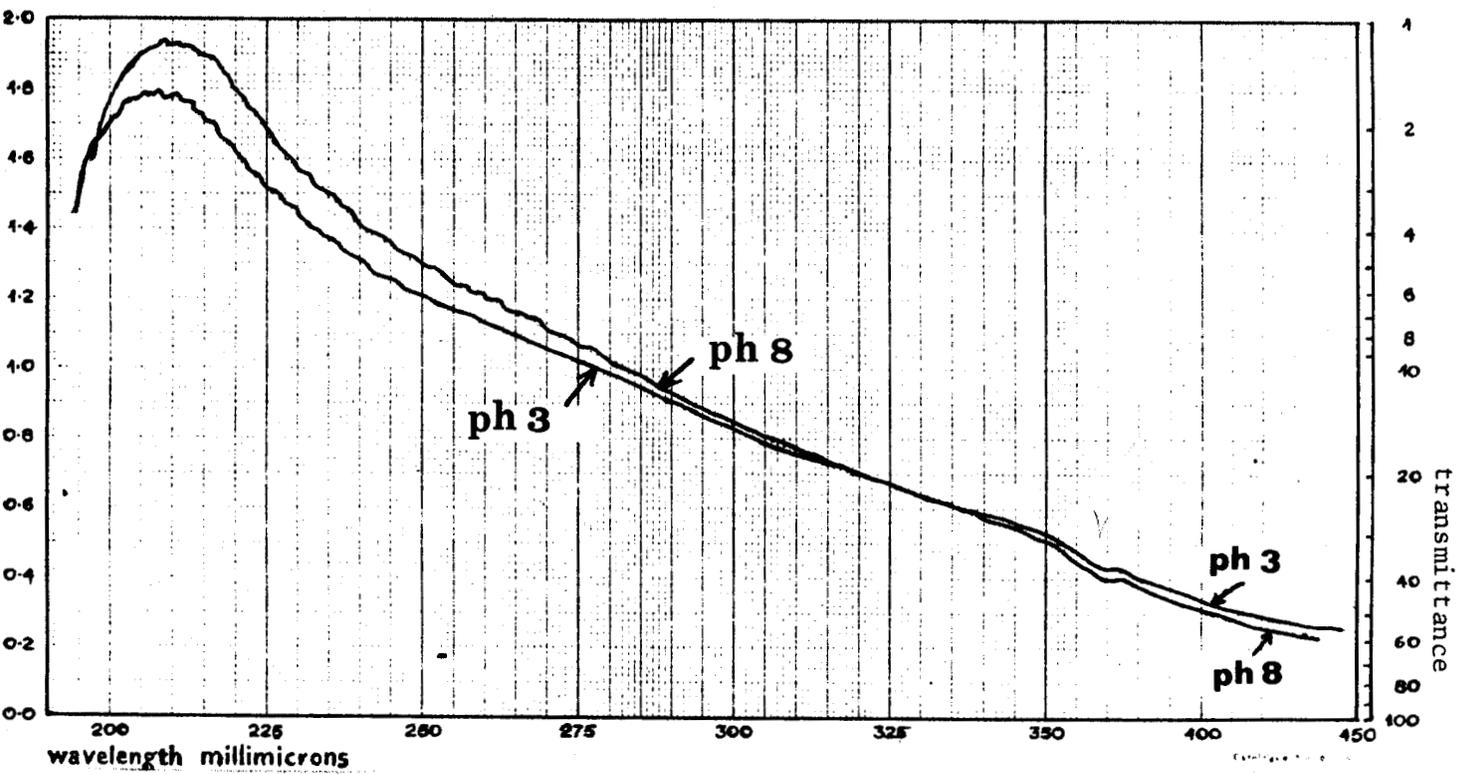


Fig. 32. Spectres en U.V. des fractions humiques I en haut et I' en bas (AH_1 de la terre de Neuville-en-Ferrain).

spectroscopiques par exemple LINDQUIST (1968), LADD (1969) et BAILLY (1973).

Etant donné les particularités chromatographiques que le ph de nos échantillons a occasionné, nous avons établi les spectres UV avec *les acides humiques I et I' à des ph acides*. En utilisant des solutions purifiées conservées depuis quelques jours en chambre froide, nous avons eu, tant pour les solutions d'acides humiques de type I que I', *des spectres assez semblables* même lorsque le ph est voisin de 1. Cependant, les solutions acides absorbent légèrement moins les longueurs d'ondes les plus courtes, mais ceci d'une façon progressive à partir de 350 m μ (fig. 32).

Ces résultats sont en accord avec ceux de TSUTSUKI et KUWATSUKA (1979) dont nous avons eu connaissance après l'obtention de nos propres résultats. Ces auteurs interprètent cette dépendance vis-à-vis du ph en faisant intervenir les changements dans les formes dissociées des groupes hydroxyles phénoliques et carboxyliques, des phénomènes de dispersion et d'association des particules humiques, la formation de complexes avec les métaux etc...

Lors de nos premiers essais, en employant des solutions d'acides humiques extraites depuis peu de temps, nous avons remarqué un phénomène curieux pour les molécules humiques de type I : à des ph très acides (proches de 1) le spectre UV a montré un pic d'absorption se situant vers 265 m μ (fig. 33). L'apparition de cette zone d'absorption qui est spécifique des bases puriques, pyrimidiques, et des acides nucléiques, n'a néanmoins pas été notée pour la fraction I'.

Dans la bibliographie, un maximum d'absorption dans les régions de 250 à 300 m μ a déjà été noté par certains auteurs : ZIECHMANN (1964) ; SATO et KUMADA (1967) ; SCHNITZER et SKINNER (1968) ; BAILLY (1973). Curieusement cette absorption est parfois obtenue à ph alcalin au contraire : c'est le cas des acides fulviques étudiés par SCHNITZER et SKINNER (1968) qui présentent un pic d'absorption à 265 m μ à ph alcalin (de l'ordre de 10), mais qui s'estompe lorsque la solution est acidifiée.

Cette absorption particulière n'est peut être pas très significative et BAILLY (1973) l'interprète en faisant intervenir en grande partie un effet de dilution (ce dernier n'obtient le pic d'absorption à 260 m μ qu'avec certaines fractions d'acides humiques séparées sur gel de dextrane).

Ce résultat distinguant I et I' à ph acide n'est pas reproductible dans nos expériences puisque des solutions "stabilisées", d'acides humiques I ne présentent plus de particularités. Nous avons par conséquent pensé qu'il n'était pas très utile de rechercher l'interprétation exacte de ce phénomène d'absorption à 260 - 265 m μ .

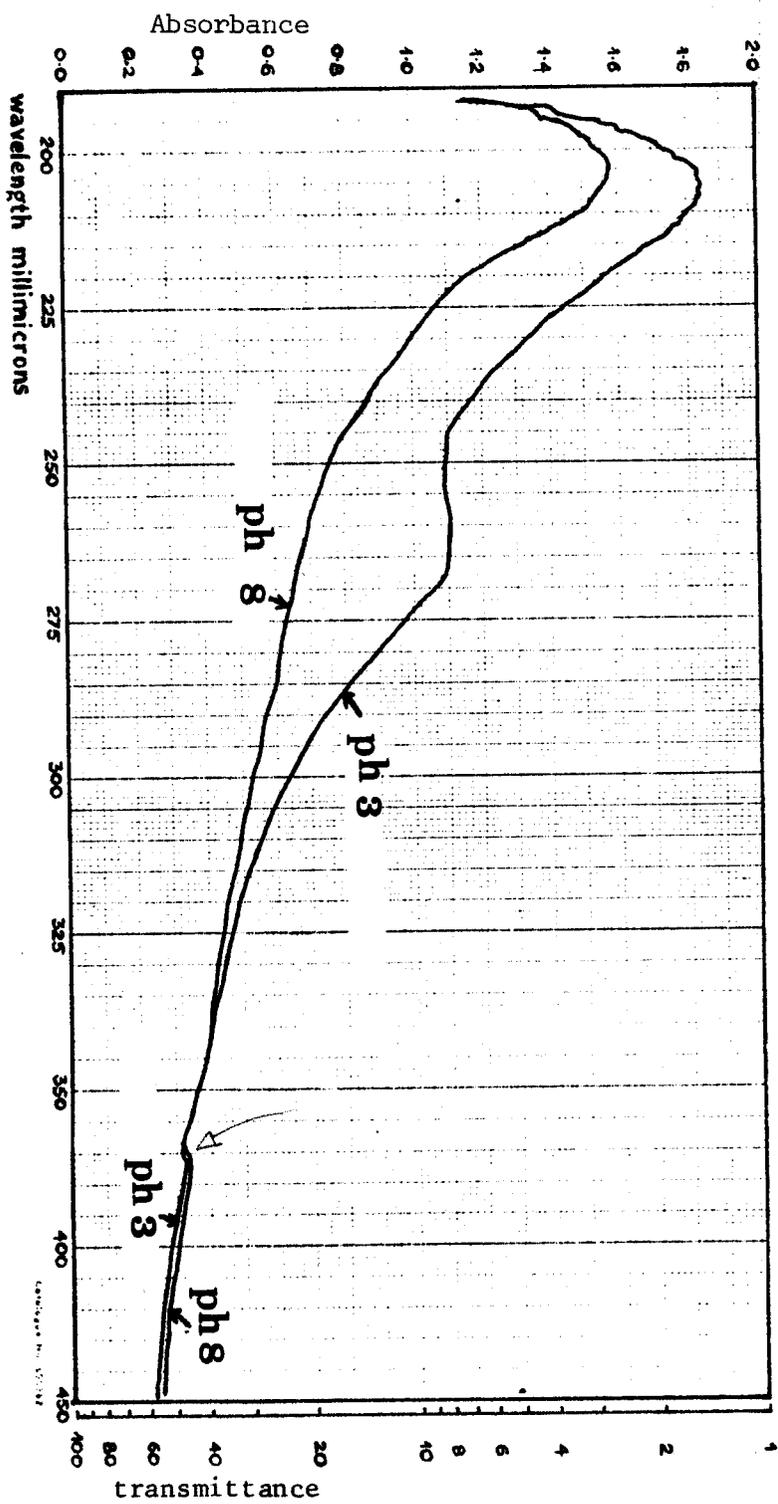


Fig. 33. Spectres en U.V. des acides humiques de la fraction I (AH_1 TN après acidification).

4. ANALYSE EN SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE.

Les spectres des acides humiques I et I' ont été enregistrés au laboratoire de chimie macromoléculaire, à l'aide d'un spectrophotomètre BECHMAN IR 18, entre 4000 et 600 cm^{-1} .

Nous avons utilisé la technique des pastilles au bromure de potassium : 1 mg de poudre pour 150 mg de bromure de potassium sont broyés ensemble puis pressés à 20 Kg/cm^2 pendant 5 minutes. Les pastilles obtenues sont ensuite séchées à 50° C sous vide pour éliminer l'eau (STEVENSON et GOH, 1974, ont vérifié que le chauffage élimine effectivement toute interférence due à l'humidité lorsque des substances humiques sont étudiées en spectroscopie I.R., mais signalent la formation possible d'anhydrides cycliques à partir des groupes carboxyles) les spectres obtenus sont représentés dans la figure 34, 35 : on y retrouve les quatre bandes de vibration assez classiques chez les acides humiques :

1° Bande d'absorption située entre 3400 et 3100 cm^{-1}

Cette forte absorption est due principalement aux vibrations de valence des hydroxyles alcooliques et phénoliques liés aux molécules humiques. Cependant, l'intensité d'absorption à ces fréquences est relativement peu significative car elle tient compte aussi de la présence éventuelle de molécules d'eau et de silicates hydratés dans les échantillons et d'après THENG et coll (1966), il reste de l'eau dans les préparations tant qu'un pic d'absorption persiste vers 3.380 cm^{-1} .

2° Bande d'absorption située entre 1650 et 1600 cm^{-1}

Elle est due aux vibrations des doubles liaisons C = C (dont les C = C aromatiques) aux doubles liaisons C = O, et, secondairement C = N.

Cette absorption serait plus nette lorsque l'humus est extrait par la soude et THENG et coll (1967) signalent effectivement des bandes dues aux C = C aromatiques de faible intensité lorsque l'extraction est opérée avec le pyrophosphate.

3° Bande d'absorption située vers 1400 cm^{-1}

Son interprétation est assez délicate. Elle peut correspondre à 4 phénomènes (BAILLY 1974) :

- présence des radicaux CH, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$
- présence de groupements $-\text{OH}$... des alcools tertiaires

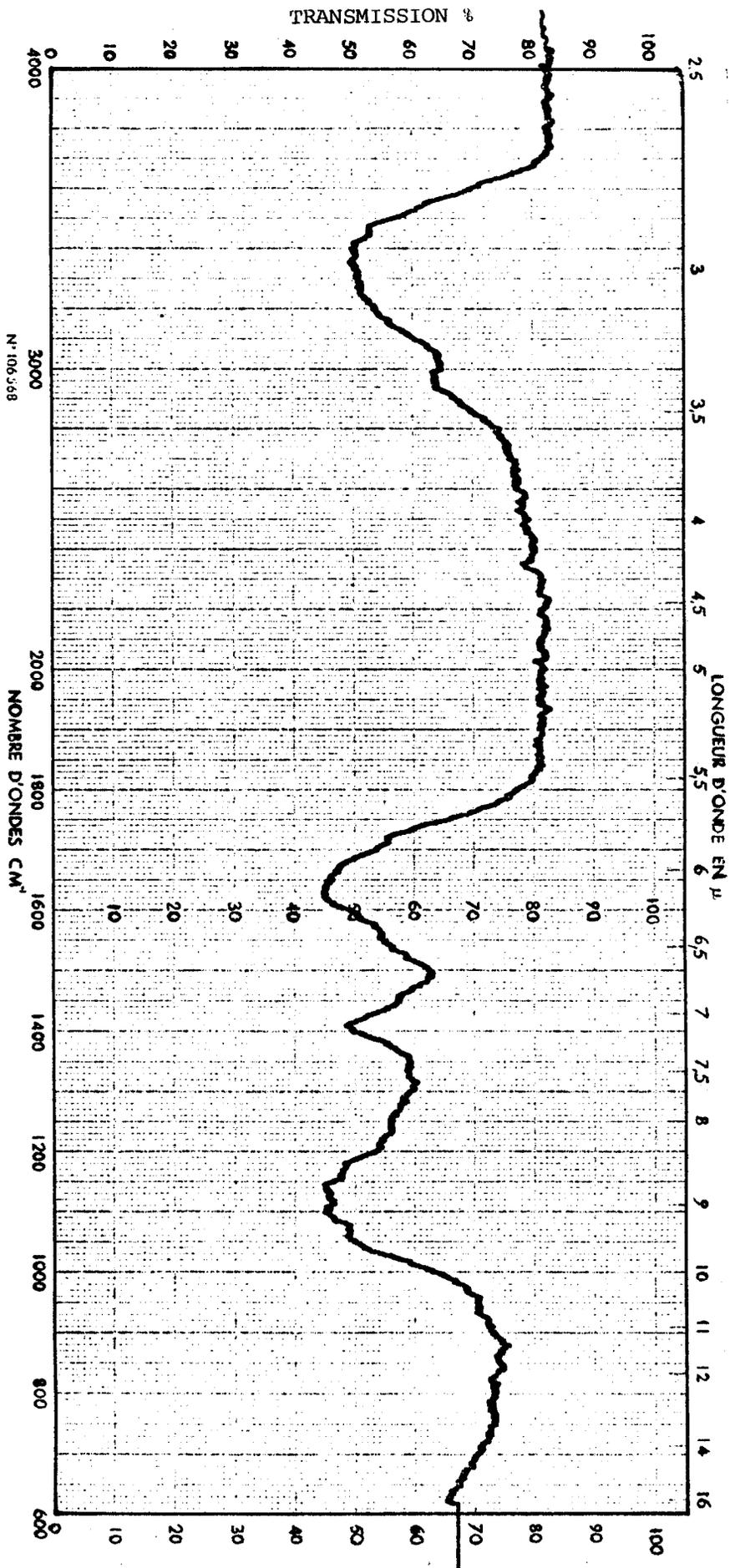


Fig. 34. Spectre en infra-rouge des Acides humiques I.

BUS
LILLE

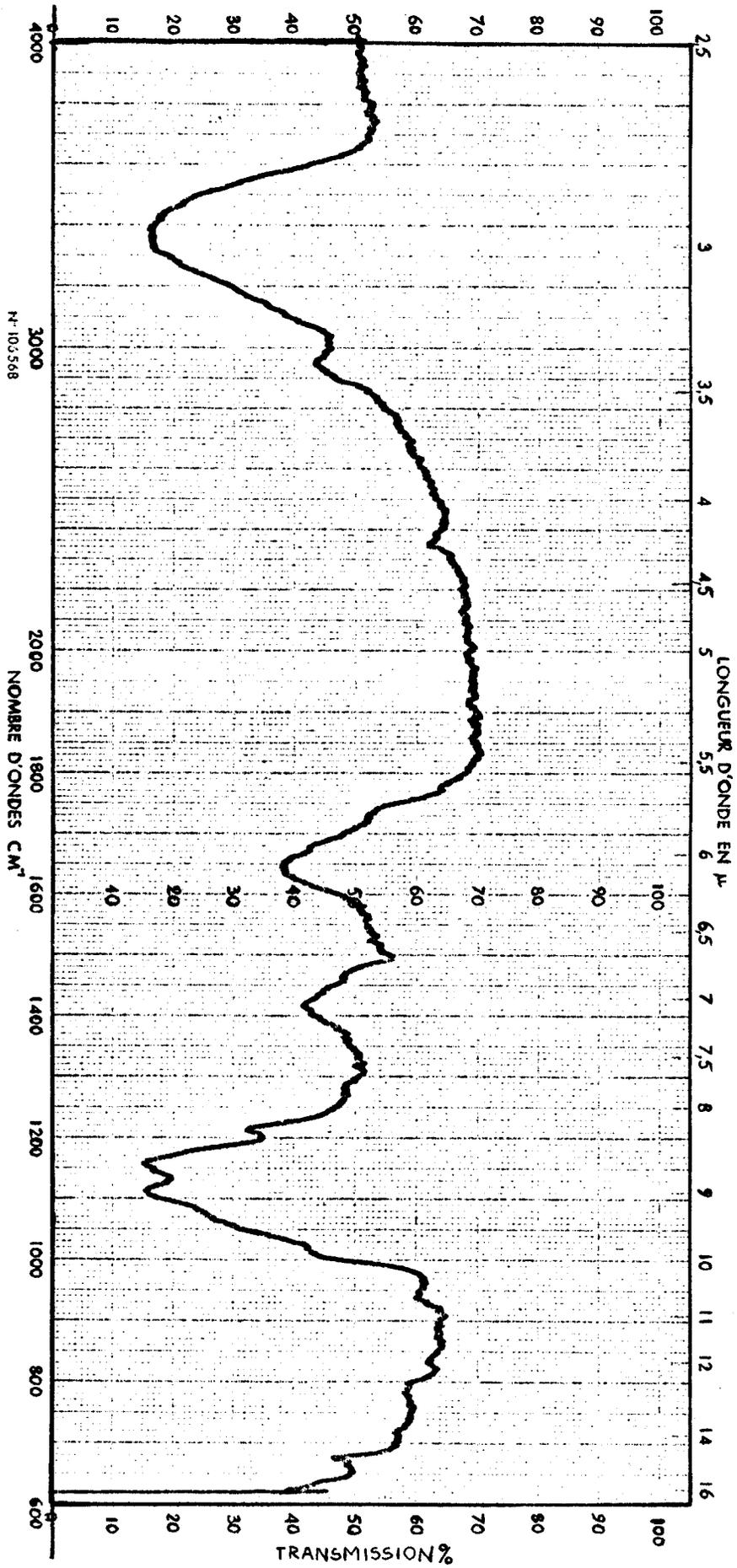


Fig. 35. Spectre en infra-rouge des Acides humiques I'.

BUS
LILLE

- présence de groupements - COO⁻ ionisés
- présence de groupements Si-phenyl.

Les OH alcooliques tertiaires présentent néanmoins une bande d'absorption située plutôt entre 1400 et 1300 cm⁻¹, et les Si-phenyl, à 1430 cm⁻¹ de sorte que l'on doit surtout retenir ici, comme le souligne SKLODOWSKI (1973) la présence des radicaux CH, CH₂, CH₃ et COO⁻.

4° Bande d'absorption centrée vers 1150 - 1100 cm⁻¹

Cette bande s'étend en réalité de 1250 à 950 cm⁻¹. Son interprétation est également assez difficile car elle résulte de la superposition de diverses absorptions.

D'après SKLODOWSKI (1973), l'absorption entre 1000 et 1200 cm⁻¹ est due à la présence des vibrations des C-O, OCH₃, et aux groupes C-O-H des différents alcools et acides carboxyliques, ainsi qu'aux éthers cycliques contenant C-O-C. Cependant, les groupements -COOH et C-O absorbent plutôt vers 1200 cm⁻¹, les groupements -OH... des alcools tertiaires entre 1200 et 1100 cm⁻¹, qui interfèrent avec la silice (absorption de Si-O-H ou Si-O-Si).

SCHNITZER (1965) insiste particulièrement sur l'absorption due à la silice (Si-O-Si) centrée à 1080 cm⁻¹.

A côté de ces 4 bandes de vibration importantes, on peut aussi déceler sur nos spectres des absorptions plus localisées :

- absorption vers 2920 cm⁻¹

Elle est due à la présence des groupes -CH aliphatiques (-CH₂, CH₃). On trouve cette absorption dans les spectres IR issus d'échantillons de lignine (ZIECHMANN, 1964), et dans les spectres obtenus à partir d'acides humiques fractionnés sur Sephadex G50 par TAN et GIDDENS (1972), particulièrement lorsque les molécules ont un poids moléculaire élevé (supérieur à 15.000).

- absorption vers 2360-2340 cm⁻¹

Elle est peu nette dans nos spectres, et pourrait correspondre aux ponts P-H (SKLODOWSKI 1973).

- absorption vers 1710 cm⁻¹

Nous avons en effet un petit épaulement à cette fréquence qui pourrait être dû

aux C = O des acides carboxyliques et cétone. Cependant, plusieurs travaux ont démontré que cette absorption, dans le cas des spectres relatifs aux substances humiques, est presque totalement due à la présence des groupes carboxyles et que les groupes cétone y contribuent très peu. En effet, MAC CARTHY et coll. (1975) qui ont effectué des mesures directes de spectre IR de composés humiques en solution aqueuse, ont démontré que cette bande disparaissait lorsque le pH de la préparation atteignait 8,0. De même, STEVENSON et GOH (1973) qui obtiennent une absorption importante à 1720 cm^{-1} avec des extraits d'acides humiques et d'acides fulviques de divers échantillons de sols ou de limons, constatent une disparition de cette bande quand les extraits sont convertis en sels (de sodium), avec l'apparition concomitante d'une bande d'absorption à 1390 cm^{-1} caractéristique de l'ion COO^- .

D'après DORMARR (1967) lorsque l'on trace la tangente au spectre obtenu entre 2100 et 1850 cm^{-1} , on obtient une pente qui est nulle, négative si elle est dirigée vers les basses fréquences, positive si elle est dirigée vers les hautes fréquences. Cette pente serait en relation avec le degré de polymérisation des molécules humiques analysées : les humus les moins polymérisés présentant une tangente avec une pente négative ou nulle. Cette relation a déjà été vérifiée notamment par DUPUIS et JAMBU (1969) qui trouvent un rapport entre la pente de cette tangente et la nature des substances (acides humiques ou fulviques).

En ce qui nous concerne, si nous traçons cette tangente, elle présente une pente qui est plutôt positive. Comme il s'agit d'acides humiques, cette relation proposée par DORMARR serait donc encore vérifiée. Il faut cependant noter que la pente que nous obtenons est moins prononcée que celle qu'indiquent DUPUIS et JAMBU. L'allure générale de ces spectres en IR auxquels nous sommes aboutis est proche des résultats obtenus par DUPUIS et JAMBU (1969) qui ont étudié des acides fulviques et humiques provenant d'anmoor et de tourbes prélevés en France dans le Marais Poitevin, de ceux de BAILLY (1974 et 1976) qui a analysé des chernozomes, sols gris forestiers et sols podzoliques de la région de MOSCOU, et ceux de TAN et GIDDENS (1972) relatifs à des acides humiques extraits de sols de l'Etat de GEORGIE (U.S.A.).

Nous pouvons également noter des similitudes avec les spectres d'acides humiques obtenus par JACQUIN et coll (1970) qui proviennent d'un podzol de la région des Vosges. Mais ceux-ci sont très fortement marqués par une absorption intense à 1030 cm^{-1} caractérisant la présence de phyllosilicates.

Cette bande d'absorption était également très nette dans certains spectres présentés par BAILLY.

Enfin certains spectres présentés par SHNITZER (1965) sont proches des nôtres : il s'agit cependant des acides fulviques (de podzols), mais il est quand même

très intéressant de remarquer que ce sont justement les acides fulviques extraits par le pyrophosphate neutre qui donnent ces spectres. Cette remarque peut aussi s'appliquer aux spectres obtenus par SKLODOWSKI (1973) avec des acides humiques podzoliques quand ils ont été extraits avec le pyrophosphate, et quand leur poids moléculaire est assez élevé (au moins supérieur à 3500).

En ce qui concerne maintenant la comparaison des spectres obtenus avec les acides humiques I et I', c'est essentiellement entre 1100 et 1160 cm^{-1} que leurs molécules les distinguent puisque les acides I' absorbent très fortement dans cette zone. Malheureusement, nous avons vu que l'interprétation est très délicate à ces fréquences et la bibliographie nous renseigne très peu. BAILLY a remarqué dans ses spectres publiés en 1974 une large bande centrée sur 1150 cm^{-1} caractérisant des fractions de faible poids moléculaire séparées par gel filtration. Mais il ne peut en donner une explication et dans des résultats publiés un peu plus tard (1976), il trouve aussi cette bande avec des molécules à poids moléculaire élevé. Ce résultat est cependant intéressant car il ne trouve pas d'absorption importante à 1150 cm^{-1} lorsque les acides humiques ne sont pas préalablement fractionnés sur Sephadex. Or, dans notre cas, les acides humiques I correspondent également à des molécules probablement beaucoup plus hétérogènes que celles des acides humiques I'.

Nous ne pensons pas que cette absorption puisse provenir de la présence de silice dans l'échantillon I' puisque celle-ci donne des bandes d'absorption centrées très précisément à des fréquences inférieures à 1100 cm^{-1} .

La présence de groupements acides $-\text{COOH}$ sous forme non dissociée par élimination de cations ne peut non plus expliquer la particularité du spectre I' puisque dans ce cas, comme l'indique BAILLY (1974), la bande à 1725 cm^{-1} devrait être plus important, ce qui n'est pas le cas.

Dans l'état actuel de nos recherches, il semble par conséquent que la seule explication que nous puissions proposer pour justifier l'absorption particulièrement des molécules I' consiste à faire intervenir la présence de nombreux groupements $-\text{OH}$... d'alcools tertiaires. Ceux-ci en effet donnent une absorption caractéristique à 1140 cm^{-1} (alors que les alcools primaires et secondaires absorbent entre 1000 et 1100 cm^{-1}). Nous avons déjà noté la présence de ces fonctions alcooliques tertiaires en considérant la bande située vers 1400 cm^{-1} (mais celle-ci est identique pour les spectres I et I').

A part cette particularité située entre 1100 et 1160 cm^{-1} , on ne remarque apparemment pas d'autres différences entre les spectres des acides humiques I et I'. L'absorption n'est peut être pas tout à fait identique vers 3400 cm^{-1} mais étant donné les interférences possibles dues à la présence de molécules d'eau, ce résultat ne peut être obtenu. D'autre part, la tangente au spectre inscrit entre 2100 et

1850 cm^{-1} donne une pente identique dans l'un et l'autre cas.

5. DISCUSSION DES RESULTATS

En considérant ces quelques critères d'ordre physico-chimique, nous constatons que la fraction moléculaire I' qui, à pH acide a présenté une certaine affinité avec les gels de dextrane, semble relativement bien distincte au point de vue structural de la fraction I. Elle comprend une famille de molécules plus homogènes dont le poids moléculaire moyen est inférieur à celui des molécules exclues et possède probablement des groupes fonctionnels différents, ou tout au moins une proportion différente de ces groupes.

L'acidification des extraits déposés sur les gels aurait donc plutôt conduit à une sélection de certaines molécules présentes dans le mélange initial et possédant des fonctions ou des caractéristiques architecturales particulières, qu'à une séparation banale d'une proportion donnée de molécules à partir d'un tout.

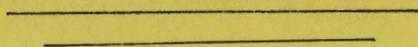
En solution à pH très acide, nous savons que les particules humiques ont tendance à s'associer pour former des agglomérats de taille plus importante. Ce phénomène a pu conduire à une rétention des acides humiques I' sur le gel de dextrane. Cet état serait alors maintenu tant que le pH n'aurait pas atteint un seuil limite. Et c'est le retour à une forme moléculaire "indépendante" qui aurait permis leur élution.

Selon cette hypothèse, les acides humiques I' représenteraient des molécules possédant des propriétés particulières leur conférant une aptitude à s'agglomérer facilement entre elles à pH acide, ou encore une aptitude à conserver cet état jusqu'à des pH relativement élevés.

Quant aux modalités de rétention des molécules humiques sur le gel de dextrane, nous ne pouvons pratiquement pas suggérer d'interprétation plausible car nous manquons d'information sur la configuration macromoléculaire exacte de ces gels. D'autre part, ces phénomènes qui peuvent expliquer les raisons du fractionnement sur gel des acides humiques I' conviennent très peu lorsqu'il s'agit de considérer des acides humiques II. Dans ce dernier cas, l'intervention des forces de rétention entre la molécule humique et la trame moléculaire du gel est plus probable.

Une comparaison des caractéristiques physico-chimiques des molécules I' et II nous apporterait probablement la solution.

CONCLUSIONS GENERALES



Ces recherches sur la structure des composés humiques du sol ont été entreprises à partir de plusieurs échantillons de terres prélevées dans la région du Nord de la France. Ces prélèvements de nature sablo-argileuse et crayeuse, concernent toujours l'horizon supérieur et proviennent de parcelles de prairie, de culture ou de forêt.

L'extraction des substances humiques a été effectuée séquentiellement avec le pyrophosphate neutre, alcalin et la soude. Mais la majorité des analyses a été menée sur les extractions au pyrophosphate neutre qui altère peu les substances organiques et fournit les acides humiques et fulviques dont le fractionnement moléculaire donne de meilleurs résultats. Ces séparations ont été opérées selon la technique du tamis moléculaire en utilisant des gels de dextrane : Sephadex, Sepharose et Sephacryl.

En employant des colonnes de gels Sephadex G25, élués avec l'eau distillée à pH 8, les acides humiques et fulviques de nos échantillons extraits au pyrophosphate neutre et solubilisés dans de la soude diluée, se sont séparés en deux fractions moléculaires principales I et II indépendamment de leur origine (avec le produit des autres extractions, ce résultat est beaucoup moins net). L'isolement de ces deux fractions n'est pas fonction de leur poids moléculaire mais de leur affinité pour le polymère : *les substances I sont exclues du gel* alors que *les substances II présentent une certaine rétention* dont les causes sont difficiles à établir actuellement. Sur colonne de Sepharose Cl, 2B dont l'utilisation est particulièrement indiquée pour le fractionnement des molécules à poids moléculaire élevé, les résultats ne semblent guère plus intéressants que ceux du Sephadex. Sur Sephacryl S200 ou S300, les séparations obtenues sont assez intéressantes mais assez peu exploitables car elles ne sont pas très reproductibles lorsque la concentration des échantillons analysés varie.

Lorsque les extraits humiques déposés sur colonnes de gel sont acidifiés le fractionnement fait apparaître *une nouvelle catégorie de molécules humiques* : il s'agit de molécules qui, à pH neutre ou à pH peu acide étaient précédemment exclues du gel, et qui dès que le pH est inférieur à 2 (dans nos conditions expérimentales) manifestent une certaine rétention se traduisant par *l'apparition d'un pic supplémentaire I' sur les enregistrements*, intermédiaires entre le pic I et le pic II. En outre, l'éluion de ces molécules I' est d'autant plus retardé que le pH est bas, mais c'est lorsque sa valeur est comprise *entre 1,4 et 1,5* que leur isolement

est le plus aisé car leur élution interfère alors très peu avec les autres substances I et II.

Ce fractionnement particulier consécutif à l'acidification a également été noté, indépendamment de l'échantillon de terre avec les trois fractions d'acides humiques extraites, mais il est plus accentué avec l'extrait obtenu par le pyrophosphate neutre, qui fournit des quantités relativement plus importantes de ces molécules I'.

Nous avons enfin essayé d'analyser quelques propriétés physico-chimiques de ces acides humiques I' qui ne présentent des affinités avec les gels de dextrane que lorsqu'elles sont concentrées à pH très acide. Pour caractériser la présence de propriétés particulières, nous avons également effectué ces analyses sur les molécules de type I de façon à pouvoir les comparer.

Ces substances I et I' ont d'abord été isolées après fractionnement sur gel Sephadex G25, ceci en employant une colonne plus grande qui permet d'améliorer, abstraction faite de la valeur du pH, les séparations moléculaires. Elles ont ensuite été purifiées par de nouvelles filtrations sur gels et conservées à l'état lyophilisé. La détermination de leur poids moléculaire privilégié obtenu par chromatographie sur Sephacryl S200 a donné une valeur de 13.000 pour I' (et 50.000 pour I). Ces valeurs sont approximatives car elles ont été calculées en considérant le poids moléculaire de molécules témoin, protéiques de nature globulaire habituellement employées pour ces mesures, mais rien ne prouve que les acides humiques ont une structure globulaire.

Les spectres UV lumière visible sont assez semblables dans les deux cas et donnent peu de renseignements exploitables. Par contre, les premières analyses obtenues en spectroscopie infra-rouge semblent intéressantes : en effet, on retrouve pour I et I' des bandes de vibration assez classiques, puisque nous avons pu vérifier leur présence dans un certain nombre de spectres publiés à propos des acides humiques, par des auteurs français ou étrangers. Mais le spectre donné par les acides humiques I' présente, par rapport à I, une bande d'absorption *beaucoup plus importante entre 1100 et 1160 cm^{-1}* . L'interprétation de ce résultat est délicate car cette bande provient souvent de la superposition de plusieurs absorptions de nature différente. Aussi, ce n'est qu'à titre hypothétique que nous suggérons la présence particulière de nombreux groupements alcools tertiaires dans les acides I' responsables de l'originalité de leur spectre.

Quant à l'interprétation du phénomène qui a conduit à une séparation de ces molécules I' des autres lorsque le ph est acide, nous avons formulé une hypothèse suivant laquelle il aurait été provoqué par *leur faculté de former des agglomérats moléculaires en milieu acide*. Cette justification tend à confirmer l'hypothèse structurale des acides humiques émise par WERSHAW.

B I B L I O G R A P H I E

- 8 ANDREUX F., 1978.- Etude de la stabilisation physico-chimique et biologique d'acides humiques modèles. Thèse. Doct. Etat, Nancy I, 174 p.
- ANDREUX F. et METCHE M., 1975.- Formation d'Allomélanines préhumiques au cours de l'autolyse des feuilles de *Juglans Regia*. Biodégradation et humification, édition Pierron, 479-490.
- 4 ANNE P., 1945.- Détermination du carbone total. Ann. Agron. 15, 161-172.
- BAILLY J.R., 1967.- Fractionation of HA according to their molecular size. A brief assisment of some favoured molecular weights. C. R. Acad. Sci., 264, 564-566.
- BAILLY J.R., 1973.- Spectroscopie UV - visible des acides humiques non fractionnés et de certaines de leurs fractions obtenues sur gels de dextrans. Plant and Soil, 38, 281-297.
- BAILLY J.R., 1974.- Spectroscopie infra-rouge de quelques acides humiques. Plant and Soil, 40, 285-302.
- 6 BAILLY J.R., 1976.- Spectroscopie infra-rouge de quelques fractions d'acides humiques obtenues sur Sephadex. Plant and Soil, 45, 95-111.
- BAILLY J.R. et MARGULIS H., 1968.- Etude de quelques acides humiques sur gels de dextrane. Plant and Soil, 29, 343-361.
- BLOIS M.S., 1965.- Random Polymers as a matrix for chemical evolution. In : The origins of prebiological systems, edit. by Sidney W. Fox, Academic Press New-York - London, 19-38.
- BROOK A.J.W. et MUNDAY K.C., 1970.- The interaction of phenols, anilines and benzoic acids with Sephadex gels. J. Chromatog., 47, 1-8.
- CAMERON R.S., THORNTON B.K., SWIFT R.S. et POSNER A.M., 1972.- Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. J. Soil Sci., 23, 394-408.
- DARWIN C., 1881.- The formation of vegetable mould, through the action of worms with observation on their habits, London, John Murray.
- DEHERAIN P., 1888.- Recherches sur les fermentations du fumier de ferme. Ann. Agric., 14, 97.
- DEMOLON A., 1952.- La dynamique du sol. Dunod, Paris, 148-160.
- 8 DE SAUSSURE Th., 1804.- Recherches chimiques sur la végétation, Paris, Ann. 12, 162.

- ✓ DETERMANN H., 1969.- Chromatographie sur gel : filtration, perméation, tamassage moléculaire. Masson, Paris, 193 p.
- DOMMARGUES Y. et MANGENOT F., 1970.- Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie, Paris.
- ✓ DORMAAR J.F., 1967.- Infrared spectra of humic acids from soils formed under grass or trees. *Geoderma*, 1, 37-45.
- DORMAAR J.F., 1974.- Molecular-sieve chromatography of humic substances extracted with chelating resin from chernozemic AH horizons. *Plant and Soil*, 41, 51-64.
- DRAGUNOV, 1961.- *In* KONONOVA 1966.- Soil organic matter. Pergamon Press.
- DUBACH P., MEHTA N.C., JAKAB T., MARTIN F. et ROULET N., 1964.- Chemical investigations on soil humic substances. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 28, 1567-1578.
- ✓ DUCHAUFOR Ph., 1965.- Précis de Pédologie. Masson et Cie, Paris, 482 p.
- DUCHAUFOR Ph. et JACQUIN F., 1966.- Nouvelles recherches sur l'extraction et sur le fractionnement des composés humiques. *Bull. Ec. Nat. Sup. Agron. Nancy*, 8, 3-24.
- ✓ DUPUIS J. et JAMBU P., 1969.- Etude par spectrographie infra-rouge des produits de l'humification en milieu hydromorphe calcique. *Sci. du sol*, 1, 23-35.
- FELBECK G.T., 1965.- Structural chemistry of soil humic substances. *Adv. Agron.*, 17, 327-368.
- FLAIG W., 1960.- *Sci. Proc. Roy. Dubli Soc. A1.*, 149-162. *In* : FELBECK G.T., 1965.- Structural chemistry of soil humic substances. *Adv. Agron.*, 17, 327-368.
- FLAIG W., 1964.- *Geochim. Cosmochim. Acta*, 28, 1523-1535. *In* : FELBECK G.T., 1965.- Structural chemistry of soil humic substances. *Adv. Agron.*, 17, 327-368.
- FLAIG W., 1970.- Contribution à la connaissance de la constitution et de la synthèse des acides humiques. *Sci. du sol*, 2, 39-72.
- FREUDENBERG K., 1965.- Lignin : its constitution and formation from p. hydroxycinnamyl alcohols. *Sci.*, 148, 595-600.
- ✓ GELOTTE B., 1960.- Studies on gel filtration. Sorption properties of the bed material Sephadex. *J. Chromatog.*, 3, 330-342.

- GONZALEZ VILA F.J., LENTZ H. et LÜDEMANN H.D., 1976.- FT, C 13 nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 1063-1070.
- GRANDEAU L., 1872.- A new mineral humic theory of plant nutrition and a new method of estimating soil fertility based on it. *Sel. Khoz. Lesovod.*, Nov.-déc.
- GRANT D., 1977.- Chemical Structure of humic substances. *Nature*, 270, 709-711.
- HAWORTH R.D., 1971.- The Chemical nature of humic acid. *Soil Sci.*, 111, 71-79.
- γ HUC A.Y., 1973.- Contribution à l'étude de l'humus marin et de ses relations avec les Kérogènes. Thèse Doct. Ingén., Univ. Nancy I.
- λ ISHIWATARI R., 1973.- Chemical characterization of fractionated humic acids from lake and marine sediments. *Chem. Geol.*, 12, 113-126.
- JACQUIN F., CALVEZ C., DORMAAR J.F. et METCHE M., 1970.- Contribution à l'étude des processus d'extraction et de caractérisation des composés humiques. *Bull. Ass. Fr. Et. Sol*, 4, 27-49.
- λ JACQUIN F., BRUCKERT S., NGUYEN QUAT HAO, 1971.- Mise au point sur l'utilisation des gels Sephadex pour le fractionnement de composés humiques. *Bull. Ass. Fr. Et. Sol*, 2, 9-13.
- JANSON J.C., 1967.- Adsorption phenomena on Sephadex. *J. Chromatog.*, 28, 12-20.
- KONONOVA M.M., 1961-1966.- Soil organic Matter. Its Nature, its role in Soil Formation and in Soil Fertility. Pergamon Press Ltd., New-York, 450 p.
- KOSINKIEWICZ B., 1977.- Humic-like substances of bacterial origin. II. Fractionation of the bacterial humic-like substances by gel filtration on Sephadex gels. *Acta microbiol. polon.*, 26, 387-392.
- KOSTYCHEV P.A., 1890.- Some properties of humus and its composition, *Sel. Khoz. Leovod.*, 10, 115.
- λ LABROUE L., 1976.- Etude écologique des sols alpins du pic du midi de Bigorre. Thèse Doct. Etat, Univ. Toulouse.
- λ LADD J.N., 1969.- The extinction coefficient of soil humic acids fractionated by Sephadex gel filtration. *Soil Sci.*, 107, 303-306.

- LINDQUIST I., 1967.- Adsorption effects in gel filtration of a humic acid. Acta chem. Scand., 21, 2564-2566.
- LINDQUIST I., 1968.- On the extraction and fractionation of humic acids, Lantbrukshögsk. Ann., 34, 377-389.
- MAC CARTY P., MARK H.B. et GRIFFITHS P.R., 1975.- Direct measurement of the infrared spectra of humic substances in water by Fourier transform infrared spectroscopy. Agricultural and Food Chemistry, 23, 600-602.
- MAILLARD L.C., 1912.- Formation d'humus et de combustibles minéraux sans interventions de l'oxygène atmosphérique, des microorganismes des hautes températures ou de fortes pressions. C. R. Acad. Sci., 66-154.
- MARTIN J.P. et HAIDER K., 1971.- Microbial activity in relation to soil humus formation. Soil Sci., 111, 54-63.
- MONNIER G., TURC C. et JEANSON-LUUSINANG G., 1962.- Une méthode de fractionnement densimétrique par centrifugation des matières organiques du sol. Ann. Agro., 13, 55-63.
- MUSSO H. et FIGGE K., 1961.- Chem. Berl., 94, 1105-1115. In : LABROUE L., 1976. Doct. Etat, Univ. Toulouse.
- ODEN S., 1912.- Zur Kenntris der Humssäure des sphagnum. Torfes Berdtsch. Chem. Ges., 35, 651.
- ORTIZ DE SERRA M. et SCHNITZER M., 1972.- Extraction of humic acid by alkali and chelating resin. Canad. J. soil Sci., 52, 365-374.
- PAULI F.W., 1961.- Humus and Plant. Science Progress, 49, 429-431.
- PLEVEN J., SCHMELTZ C. et RIGHI D., 1967.- Méthode d'extraction et de fractionnement des composés humiques de P. DUCHAUFOR et F. JACQUIN. Bull. Ass. fr. Et. sol., 6, 15-23.
- POSNER A.M., 1966.- The humic acids extrated by various reagents from a soil. Part I. Yield, inorganic components and titration curves. J. Soil Sci., 17, 65-78.
- RAMANN E., 1888.- Die Arbeiten von Post über Schlamm, Moor, Torf, und humus. Landw. Jb, 17, 405.
- SATO O. et KUMADA K., 1967.- The chemical nature of the green fraction of P type humic acid. Soil Sci. and Plant Nutrition, 13, 4-121.
- SCHLOESING Th., 1876.- Sur les échanges d'ammoniaque entre l'atmosphère et la terre végétale. C. R. Acad. Sci., 82, 1105.

- SCHNITZER M., 1965.- The application of infrared spectroscopy of investigations on soil humic compounds. *Can. Spectros.*, 10, 121-127.
- SCHNITZER M. et SKINNER S.I.M.- Gel filtration of fulvic acid, a soil humic compound. *Isotopes and radiation in soil organic matter studies*. I. A. E. A. Vienna, 41-55.
- SCHNITZER M. et KHAN S.U., 1972.- *Humic substances in the environment*. Marcel Dekker, INC., New-York, 327 p.
- SERVE L., 1975.- Etude par chromatographie sur gels de dextrane des acides humiques de quelques sols siliceux de haute montagne. *C. R. Acad. Sci.*, 280, 2317-2320.
- SKLODOWSKI P., 1973.- Characteristics of absorption spectra in the infrared of humic acids separated from podzolic soil. *Polish J. Soil Sc.*, 6, 117-123.
- SÖCHTIG H., 1972.- Gel chromatography as a method for characterization of humic systems. *Proc. int. Meet. Humic substances*, Nieuwersliuis, 1972, P. POVOLEDO, H.L. GOLTERMANEDS PUDOC, WAGENINGER (1975), 321-335.
- SOMMET J., 1969.- Stratigraphie des Limons de la région du Nord de la France (Flandre-Artois). *In* : *La Stratigraphie des Loess d'Europe* ; suppl. *Bull. Assoc. fr. Et. Quatern. 8e Congrès INQUA*, Paris, 71-78.
- STEVENSON F.J. et GOH K.M., 1971.- Infrared spectra of humic Acids and related substances. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 35, 471-483.
- STEVENSON F.J. et GOH K.M., 1974.- Infrared spectra of humic acids : elimination of interference due to hygroscopic moisture and structural changes accompanying heating with KBr. *Soil Sc.*, 117, 34-41.
- SWIFT R.S. et POSNER A.M., 1971.- Gel Chromatography of humic acid. *J. soil Sci.*, 22, 237-243.
- TAN K.H. et GIDDENS J.E., 1972.- Molecular weights and spectral characteristics of humic and fulvic acids. *Geoderma*, 8, 221-229.
- THENG B.K.G., WAKE R.H. et POSNER A.M., 1966.- The infrared spectrum of humic acid. *Soil Sci.*, 102, 70-72.
- THENG B.K.G., WAKE R.H. et POSNER A.M., 1967.- The humic acids extracted by various reagents from a soil. II : Infrared, visible and ultra-violet absorption spectra. *J. Soil Sci.*, 18, 349-362.
- THIELE H. et KETTNER H., 1953.- *Kolloid-Z*, 130, 131-160.

- TSUTSUKI K. et KUWATSUKA S., 1979.- Chemical Studies on soil humic acids
VI : Absorbance-ph curves of humic acids. Soil Sci. Plant Nutr., 25,
365-371.
- VILA F.G., SAIZ-JIMENEZ C. et MARTIN F., 1973.- Comparative studies of
humic acids extracted with alkaline agents. Agrochimica, 18, 164-172.
- WALLERIUS J., 1761.- Agriculturae Fundamenta Chemica Uppsala.
- WATERLOT G., 1969.- Aperçu géologique de la région de Lille. Ann. Soc. géol.
Nord, 1, 67-77.
- WERSHAW R.L. et PINCKNEY D.J., 1973.- The fractionation of humic acids from
natural water systems. J. Res. U. S. Geol. Sur., 1, 361-366.
- WERSHAW R.L., PINCKNEY D.J. et BOOKER S.E., 1977.- Chemical Structure of
humic acids. Part 1 : a generalized structural model. J. Res. U. S.
Geol. Sur., 5, 565-569.
- WHEATON R.M. et BAUMANN W.C., 1953.- Ann. N. Y. Acad. Sci., 57, 159. In :
DETERMANN H., 1969.- Chromatographie sur gel : filtration, perméation,
tamisage moléculaire. Masson, Paris, 193 p.
- WILSON M.A., JONES A.J. et WILLIAM B., 1978.- Nuclear magnetic resonance
spectroscopy of humic materials. Nature, 276, 487-489.
- 82 + ZIECHMANN W., 1964.- Spectroscopic investigations of Lignin, humic subs-
tances and peat. Geochem. et Cosmochem. Acta, 28, 1555-1566.

