

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

ECOLE NATIONALE SUPÉRIEURE D'INGÉNIEURS DE POITIERS
ECOLE DOCTORALE : SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT GAY LUSSAC

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Spécialité : Chimie et Microbiologie de l'Eau

Par

Aurélien LAVAUD

EXTRACTION ET CARACTERISATION DE LA MATIERE ORGANIQUE SOLUBLE DES HORIZONS PROFONDS D'UN SOL ARABLE

Soutenance prévue le 08 Avril 2010, devant la Commission d'Examen :

Rapporteurs :	Mr Emmanuel NAFFRECHOUX Mr Eric SMOLDERS
Examineurs :	Mme Delphine DERRIEN Mr Laurent LEMEE
Directeur de Thèse :	Mr Jean-Philippe CROUÉ
Directeur de Thèse :	Mr Abad CHABBI

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une bourse Région-INRA au sein du laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau (LCME – CNRS UMR 6008) de l'Ecole Supérieure d'ingénieurs de Poitiers.

Je tiens tout particulièrement à remercier la région Poitou-Charentes et l'INRA du Poitou-Charentes pour leur soutien financier.

Je voudrais également remercier le directeur du LCME à mon entrée au laboratoire, Monsieur le professeur Bernard LEGUBE pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'acceptant dans son laboratoire.

J'adresse également des remerciements à monsieur le professeur Jean-Philippe CROUE dit « moustache » et à Abad CHABBI pour leur encadrement pendant ces trois années, avec les hauts et les bas rencontrés.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur Erik SMOLDERS, professeur à l'université de Leuven en Belgique, à Monsieur Emmanuel NAFFRECHOUX, professeur à l'université de Savoie, à Monsieur Laurent LEMEE, Ingénieur de recherche à l'université de Poitiers et enfin à madame Delphine DERRIEN, chargée de recherche à l'INRA de Nancy pour avoir accepté de juger mon travail.

Je n'oublie pas tous les membres du laboratoire, permanents et surtout étudiants, pour les bons moments passés et surtout NICO (gros moche).

Pour finir, j'ai une pensée pour tous les gens qui me sont chers et qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse : Mamie MARIE, Maman NATH, KENNY, JEAN bon beurre et DOUDOUNETTE.

LISTE DES ABREVIATIONS

INRA : Institut National de Recherche Agronomique
ORE : Observatoire de Recherche Environnementale
ACBB : Agroécosystème Cycle Biogéochimique et Biodiversité
IHSS : International Humic Substances Society
LCME : Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau
BioEMCO : Laboratoire de Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux

Autres abréviations

AB : Alkyle-Benzène
ACP : Analyse en Composante Principale
AMS : Accélérateur de spectrométrie de masse
AS : Aminosucres
BIX : Indice de contribution autochtone
BP : Bougies poreuses
CEC : Capacité d'Echange Cationique
COD : Carbone Organique Dissous
COT : Carbone Organique Total
Da : Daltons
Ex : Longueur d'onde d'excitation (nm)
Em : Longueur d'onde d'émission (nm)
FID : « Free Induction Decay »
HIX : Indice d'humification
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HPSEC-DOC: « High Performance Size Exclusion Chromatography-Dissolved Organic Carbon »
ICP : « Inductive Coupled Plasma »
IR : Infrarouge
MEEF : Matrice d'Emission-Excitation de Fluorescence
MM : Masse Moléculaire
MSSV : « Micro Scale Sealed Vessel »
NOD : Azote Organique Dissous
Nt : Azote total
PHA : Polyhydroxyaromatiques
PR : Protéines
PS : Polysaccharides
Pyrolyse GC/MS : Pyrolyse en phase gazeuse détection à spectre de masse
RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire du ¹³C
SUVA : « Specific UV Absorbance » : Absorbance UV spécifique à 254 nm
TMAH : « Tétraméthyl Ammonium Hydroxide »
US : Ultrasons
UV : Ultra-Violet

Matières organiques

AH : Acide humique
AF : Acide Fulvique
HPI : Fraction Hydrophile
HPIA : Fraction Hydrophile Acide
HPIB : Fraction Hydrophile Basique
HPO : Fraction Hydrophobe
MO : Matière organique
MOD Matière Organique Dissoute
MON : Matière Organique Naturelle
MOS : Matière Organique des Sols
TPH : Fraction Transphilique
SH : Substances Humiques

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. Qu'est ce qu'un sol ?	5
I-1. Les différents horizons d'un sol.....	5
I-2. Composition des horizons	7
I-2-1. Aspects minéralogiques	7
I-2-2. Aspects organiques	9
II. Extraction de la MO des sols.....	13
II-1. Les principaux protocoles d'extraction.....	13
II-2. Extraction de la MO hydrosoluble	14
II-3. Collecte de la matière organique hydrosoluble par un dispositif de plaques lysimétriques	17
III. Composition de la MO extraite des sols	21
III-1. L'humine	22
III-2. Substances Humiques.....	22
III-3. Substances non humiques	24
III-3-1. Les composés azotés et les protéines	25
III-3-2. Les hydrates de carbone.....	25
III-3-3. Les lipides.....	27
III-3-4. Les lignines.....	28
III-3-5. Les tanins	29
III-3-6. Les terpénoïdes	30
IV. Facteurs qui influencent la quantité de MO hydrosoluble dans les sols.....	31
IV-1. La température.....	31
IV-2. Le pH.....	32
IV-3. La force ionique	32
IV-4. Le CO₂ atmosphérique	32
IV-5. Le sol et les pratiques agricoles	33
IV-6. L'azote.....	33
IV-7. Les cycles d'humidité et de sécheresse.....	34
V. Origine et quantité de la MO dans les eaux souterraines.....	35
VI. Caractérisation directe ou après purification de la MO soluble.....	39
VI-1. Résonance magnétique nucléaire (RMN ¹³C)	39
VI-2. Pyrolyse-MS (Spectrométrie de Masse).....	41
VI-3. Spectrofluorimétrie	45
VI-4. Chromatographie d'exclusion haute performance (SEC).....	50
VI-5. Spectrophotométrie (IR)	52
VI-6. Pyrolyse MSSV (Micro Scale Sealed Vessel)	54
VI-7. Analyse en C¹⁴ et δ C¹³	55
VI-8. Analyse des monosaccharides	57

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	61
I. Contexte général et cadre du travail	61
I-1. Les Traitements expérimentaux du site de Lusignan	62
I-2. Instrumentation du site.....	64
I-3. Caractéristiques générales du sol étudié	65
I-4. Les monolithes	66
II. Suivi de la qualité des eaux collectées par plaques lysimétriques (PL) et bougies poreuses (BP)	67
II-1. Suivi temporel des eaux collectées à 105 cm au niveau des parcelles.....	67
II-2. Prélèvements au niveau des monolithes	69
III. Etude quantitative et structurale des matières organiques hydrosolubles des sols	69
III-1. Quantification des matières organiques hydrosolubles : préparation des solutions de sol.....	69
III-2. Extraction des matières organiques dissoutes par résines XAD.....	71
III-2-1. Fractions Hydrophobe (HPO) et Transphilique (TPH)	72
III-2-2. Fractions Hydrophiles (HPI).....	73
III-2-3. Fractionnement analytique sur résine XAD	74
IV. Expérimentation sur les monolithes : Cycle séchage-réhumidification	75
V. Matériel et méthodes analytiques	75
V-1. Bain/Sonde à ultrasons.....	75
V-2. Dosage du carbone organique dissous (COD) et de l'azote total (N _t).....	76
V-3. Analyse UV-visible et détermination du SUVA	76
V-4. Analyse spectrofluorimétrique	76
V-5. Chromatographie d'exclusion stérique haute performance.....	77
V-5-1. HPSEC/UV(254)/Fluo	77
V-5-2. HPSEC/UV(254)/N _t	78
V-5-3. HPSEC/UV(254)/COD	80
V-6. Analyse élémentaire	81
V-7. Analyse en spectroscopie infrarouge	82
V-8. Analyse en Résonance Magnétique Nucléaire ¹³ C (RMN ¹³ C)	83
V-9. Analyse ¹⁴ C	84
V-10. Pyrolyse-CG/SM et Thermochemiolyse TMAH	84
V-10-1. Pyrolyse CG/SM.....	85
V-10-2. Thermochemiolyse CG/SM.....	87
V-11. Pyrolyse MSSV (Micro Scale Sealed Vessel).....	88
CHAPITRE 3 : EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT ANALYTIQUE DE LA MO SOLUBLE A L'EAU	91
I. Introduction	91
II. Extraction de la MO soluble aux ultrasons (US)	93
II-1. Extraction multi-étape versus extraction simple	93
II-2. Optimisation des conditions d'extraction sous ultrasons	94
II-2-1. Importance de la phase de séparation par centrifugation	94

II-2-2. Importance du mode et de la durée de mise sous ultrasons.....	96
II-2-3. Agitation post-US	97
II-2-4. Bilan.....	98
II-2-5. Comparaison des concentrations en carbone obtenues par extraction eau + US versus méthodes traditionnelles (NaOH et CaCl ₂)	99
III. Caractérisation des solutions de sol.....	101
III-1. Fractionnement analytique sur résines XAD	101
III-2. Analyse en chromatographie d'exclusion stérique.....	102
III-2-1. Matières organiques solubles isolées des horizons de sols par ultrasons.....	103
III-2-2. Comparaison avec les matières organiques solubles isolées des plaques lysimétriques et des bougies poreuses.....	104
IV. Conclusion	106
CHAPITRE 4 : DYNAMIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE SOLUBLE DANS LES HORIZONS PROFONDS.....	107
I. Introduction	107
II. Les matières organiques des eaux du sol : approche quantitative.....	108
II-1. Suivi du COD en fonction de la profondeur	108
II-2. Suivi du COD et de l'azote total (N _T) des eaux collectées au niveau des horizons profonds.....	109
II-2-1. Influence des conditions climatiques : température, pluviométrie.....	112
II-2-2. Comparaison plaques/bougies	115
II-2-3. Impact du mode d'occupation : cultures/prairies.....	116
II-2-4. Influence de l'apport d'azote sur les parcelles.....	116
II-3. Bilan sur le flux de COD à 1 m de profondeur	117
III. Analyse qualitative directe des matières organiques solubles des horizons profonds..	118
II-1. Analyses spectrophotométriques UV	118
II-2. Analyse fluorimétrique	121
III-3. Chromatographie d'exclusion stérique haute pression.....	126
III-3-1. Profils HPSEC-UV-DOC.....	126
III-3-2. HPSEC/UV(254 nm).....	128
IV. Importance des conditions climatiques : dynamique attendue du COD en période estivale.....	132
IV-1. Séchage du monolithe	132
IV-2. Arrosage du monolithe n°3.....	133
IV-3. Caractérisation des eaux collectées aux différentes profondeurs	134
IV-4. Evolution de la qualité des eaux collectées à 2 mètres de profondeur en fonction du temps	140
V. Conclusion.....	142
CHAPITRE 5 : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES MATIERES ORGANQUES SOLUBLES DES SOLS : HORIZONS PROFOND ET HORIZON DE SURFACE	145
I. Introduction	145

II. Résultats	147
II-1. Extraction des matières organiques solubles des sols sur résines XAD	147
II-2. Rapport carbone/azote et SUVA des MOD des sols	153
II-3. Spectrofluorimétrie	156
II-4. Chromatographie d'exclusion de taille haute performance (HPSEC) détection UV et azote	160
II-5. Spectroscopie infrarouge (IR)	163
II-6. Résonance magnétique nucléaire ¹³C (RMN-¹³C)	165
II-7. Datation au C¹⁴ et δ C¹³	170
II-9. Pyrolyse GC-MS/Thermochemiolyse	171
II-9-1. Pyrolyse GC-MS	171
II-9-2. Thermochemiolyse TMAH	177
II-10. Pyrolyse MSSV (Micro Scale Sealed Vessel)	183
III. Discussion	185
III-1. Comparaison globale des extraits et de leur origine par une approche multi variables : ACP	186
III-1-1. Corrélation entre les différents paramètres	187
III-1-2. Corrélation entre les fractions	188
a) Pyrolyse, chromatographie d'exclusion de taille et RMN ¹³C	188
b) Pyrolyse et RMN ¹³C	189
III-2. Distribution des substances humiques et non humiques : corrélation avec l'aromaticité	191
III-3. L'azote organique dissous : Abondance relative et distribution moléculaire	192
III-4. Des matières organiques dissoutes plus âgées en profondeur (Datation au ¹⁴C)	198
III-5. L'aromaticité : un paramètre discriminant ?	200
III-5-1. Analyse Globale	200
III-5-2. Présence de structures à caractère humique dans la matrice organique soluble des horizons profonds	202
III-5-3. Identification de structures dérivées des terpènes	203
III-6. Analyse structurale : confirmation de la présence de terpènes	205
CONCLUSION GENERALE	209
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	215

INTRODUCTION GENERALE

L'augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique due à la combustion des ressources fossiles et à la déforestation est aujourd'hui l'un des grands problèmes environnementaux. Pour stocker du carbone et ainsi diminuer la concentration du CO₂ émis par l'activité humaine dans l'atmosphère, il faudrait pouvoir agir sur les puits de carbone situés dans la biosphère continentale. Le plus grand réservoir superficiel de carbone de la biosphère continentale est le sol, qui stocke 1500 Mt de carbone, comparé aux 640 Mt stockées dans la végétation. Ce réservoir, contrairement aux autres grands réservoirs dans le cycle du carbone (ex. océan), est susceptible de réagir aux modes de gestion d'utilisation des sols. Le stockage du carbone dans le sol est souvent cité comme possibilité importante pour compenser et réduire les concentrations en CO₂ atmosphérique. Le potentiel des sols français à stocker du carbone est actuellement évalué pour l'horizon labouré, i.e. les premiers 30 cm (DUPOUEY et al. 1999). Toutefois, des travaux récents ont montré qu'une proportion importante du carbone des sols est stockée dans les horizons B et C. Il a été suggéré que les processus conduisant à la stabilisation des MOS diffèrent dans les horizons profonds par rapport à la surface. Le rôle précis du carbone organique soluble ou COD (Carbone Organique Dissous) dans la stabilisation et/ ou déstabilisation du carbone des horizons profonds est indispensable pour pouvoir adapter les modes de gestion des terres et les systèmes de cultures afin d'augmenter le stock de carbone dans les sols.

Au cours des 10 dernières années, les projets de recherche développés dans le domaine des sciences du sol ont permis des avancées significatives dans la connaissance des milieux notamment le rôle du COD. Aujourd'hui, il est communément admis que le COD est probablement la fraction bio-disponible la plus importante de la matière organique des sols (MOS) (MARSCHNER et KALBITZ, 2003) même si elle n'en représente qu'une très faible proportion. Elle contribue significativement au cycle des nutriments (QUALLS, 2000) et joue un rôle très important dans les processus de la stabilisation de la matière organique des sols. Les modes d'occupation du sol et/ou pratiques agricoles affectent les propriétés du sol et par conséquent influencent la dynamique du COD. Les impacts sur la quantité, la qualité et la composition chimique restent très peu étudiés et les informations acquises sont très fragmentées voire constamment contradictoires (KALBITZ et al. 2000 ; CHANTIGNY, 2003). Malgré une littérature abondante, les études concernant les COD sont principalement limitées aux sols des écosystèmes forestiers et surtout à l'échelle du laboratoire. Les résultats obtenus n'ont jamais été confirmés sur le terrain.

La raison pour laquelle ces études ont privilégié le sol forestier (horizons de surface e.g. GREGORICH et al. 2003, MATLOU et HAYES, 2006, FROBERG et al. 2003) plutôt que les sols des systèmes arables est certainement liée à l'importance des stocks de carbone des sols forestiers ($440-620 \times 10^{15}$ g C). L'étude des facteurs gouvernant la dynamique du COD dans les systèmes dit perturbés et pauvres en C (e.g. agro-écosystèmes) reste peu abordée. Ceci est d'autant plus important que le COD a été identifié comme source majeure des MO stabilisées à long terme dans les horizons profonds des sols (KAISER et GUGGENBERGER, 2000).

Les horizons profonds, quel que soit l'écosystème étudié, demeurent très peu appréhendés du fait de leur faible concentration en carbone de l'ordre du mg/L. Les pratiques anthropiques, modes d'occupation du sol et/ou pratiques agricoles, engendrent des effets sur la dynamique des matières organiques des sols et agissent sur leur stabilisation. Le COD n'est jamais pris en compte dans l'étude des processus de stabilisation des MOS et dans les modèles du cycle global du carbone malgré son importance pour l'activité des microorganismes (NEFF et ASNER, 2001) mais également pour les pertes potentielles en C au travers des phénomènes de lixiviation. Bien qu'il représente une portion très faible (1%) de la matière organique totale du sol (NIEROP et al. 2001), le COD est considéré comme la fraction la plus mobile des matières organiques du sol (MOS). A travers son mouvement tout au long du profil (de la surface du sol aux horizons profonds), il peut représenter un flux important de MO vers l'hydrosphère. Une étude récente révèle qu'une partie importante de carbone ($7 \text{ g m}^{-2} \text{ an}^{-1}$) absorbée par la biosphère à l'échelle européenne n'est pas retrouvée dans le bilan global des stocks de carbone terrestre (JANSSENS et al. 2003). L'étude récente de SIEMENS et al. (2003) suggère que le déficit de C dans le bilan global des stocks du C terrestre est principalement lié aux pertes de C sous forme de COD par drainage vers l'hydrosphère, plutôt que par les activités agricoles (transport de biomasse, travail du sol, etc).

Ce mécanisme de perte de C s'il s'avère exact, permettrait de dégager de nouvelles pistes pour tenter de quantifier et de caractériser les fractions de COD entraînées par lixiviation, en distinguant les fractions labiles (i.e. fractions bio-disponibles) probablement minoritaires de celles qui vont contribuer par la suite au carbone stable du sol (demi-vie de plusieurs centaines d'années) via des mécanismes de sorption sur la phase minérale.

L'objectif général de cette thèse est de mieux définir la proportion des matières organiques hydrosolubles des différents horizons d'un sol arable et préciser leurs principales caractéristiques structurales. Ce travail prend en compte l'importance du mode de pratique cultural et l'impact des

périodes de sécheresse prolongées en particulier au niveau des horizons profonds. Les objectifs spécifiques de cette thèse sont :

- D'évaluer le potentiel de carbone organique soluble extractible à l'eau des différents horizons, en travaillant sur l'optimisation des conditions d'extraction (ultrasons, température, centrifugation) afin de proposer un protocole de détermination de la fraction soluble des MOS.
- De suivre sur une période de deux ans la dynamique des matières organiques solubles en profondeur (105 cm profondeur à laquelle ont été placés nos systèmes de collecte) en fonction du mode d'exploitation des sols et des saisons. A l'analyse quantitative (suivi du COD) est associée une approche qualitative avec l'utilisation d'outils de caractérisation directe spectrométrique et chromatographique.
- De caractériser la structure des matières organiques solubles des eaux collectées en profondeurs avec des outils analytiques de référence (RMN ^{13}C , Infrarouge, pyrolyse GC/MS,...), après les avoir fractionnées et isolées des eaux à l'appui d'un protocole d'extraction sur résines non ioniques XAD plus couramment utilisé dans le cadre de travaux menés sur des eaux de surface (AIKEN et LEENHEER, 1993). Ce protocole permet d'obtenir trois fractions HPO, TPH et HPI, fractionnement qui s'appuie sur un phénomène de partition associé au caractère d'hydrophobicité variable des constituants de la matière organique naturelle (solubilité, masse moléculaire). En complément des extraits HPO et TPI ont été isolés à partir d'une solution de sol de l'horizon de surface (0-30 cm) préparée par percolation sur colonne avec de eau ultrapure.

Pour répondre à ces objectifs, le site de l'ORE-ACBB de Lusignan (Observatoire de Recherche en Environnement- Agro-écosystème, cycles biogéochimique et biodiversité) a été équipé en 2003 d'un système de collecte des eaux de l'horizon profond (105 cm) par plaques lysimétriques et bougies poreuses. Ce dispositif installé pour le long terme (> 20 ans) a été conçu spécialement pour capter les évolutions au long terme du système sol-végétation et les différentes rétroactions qui les gouvernent. L'objectif principal de cet ORE est centré sur la dynamique d'évolution quantitative et qualitative des matières organiques du sol (MOS) qui détermine l'évolution globale du système en tant que source principale d'énergie. Cette composante est caractérisée par une grande inertie, ce qui justifie les études sur le long terme.

En complément des systèmes de collecte par plaques lysimétriques et des bougies poreuses mis en place sur les différentes parcelles, le site de l'ORE a été équipé en 2007 de trois monolithes

installés sur le site. Chacun des trois monolithes est équipé de sonde de température mais également de huit bougies poreuses.

Ce mémoire comporte cinq chapitres distincts :

Le premier est consacré à une présentation des données bibliographiques relatives d'une part à la matière organique des sols (notamment la fraction soluble), d'autre part aux méthodes d'extractions du COD et aux outils de caractérisation couramment employés.

Le deuxième chapitre présente le site de l'ORE-ACBB, le matériel et les différents outils analytiques utilisés dans nos travaux.

Le troisième chapitre est relatif à l'élaboration d'un protocole d'extraction du COD à l'eau et aux ultrasons. L'idée ici est d'évaluer le potentiel de MO « solubilisable » à l'eau au niveau des différents horizons d'un sol, détermination qui passe par l'optimisation des conditions d'extractions afin de proposer un outil fiable de caractérisation des différents horizons. Une première partie permet d'optimiser les différents paramètres du protocole (temps de contact, agitation, vitesse de centrifugation...). La seconde compare les résultats obtenus avec des protocoles d'extraction plus couramment utilisés dans le domaine des sols pour extraire la matière organique (NaOH et CaCl₂).

Le quatrième chapitre présente les résultats obtenus sur la dynamique du COD dans l'horizon profond. Dans un premier temps, nous présenterons un suivi des concentrations en COD et en azote mais aussi une caractérisation des eaux collectées tout au long de l'année par spectrophotométrie UV, spectrofluorimétrie et chromatographie d'exclusion de taille avec détection UV. Dans un second temps, nous aborderons l'impact de la sécheresse sur la qualité et la quantité de COD extractible dans les horizons des sols grâce à l'utilisation des monolithes de l'ORE-ACBB.

Enfin, le dernier chapitre synthétise dans un premier temps l'ensemble des résultats de caractérisation du COD (spectrophotométrie UV, spectrofluorimétrie, spectrométrie infrarouge, RMN ¹³C du solide, chromatographie d'exclusion de taille détection UV et azote, pyrolyse flash et thermochemiolyse TMAH, datation au ¹⁴C). Dans un second temps, les résultats obtenus sur les extraits de l'horizon profond sont comparés aux données obtenues par des travaux antérieurs (LCME) sur des eaux de surface, afin de dégager les implications sur la dynamique et la séquestration du carbone dans les horizons profonds.

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Qu'est ce qu'un sol ?

I-1. Les différents horizons d'un sol

Un sol est une pellicule d'altération recouvrant une roche, il est formé d'une fraction minérale et de matières organiques (l'humus). Les processus d'altération, d'humidification et de différenciation aboutissent à l'apparition de couches superposées plus ou moins distinctes et différentes selon la texture, la structure et la composition chimique.

Ces différentes couches correspondent aux horizons dont l'ensemble constitue le profil du sol. Ces horizons peuvent être déclinés en différents sous horizons en fonction du type de sols rencontrés.

On distingue quatre horizons majeurs (BAIZE et JABIOL, 1995) :

L'horizon A est un horizon majeur occupant la partie supérieure du profil (0-30 cm) et présentant une quantité importante de matière organique et une faible quantité en argile, fer et aluminium. Cette matière organique provient des plantes en phase de décomposition, c'est une matière organique jeune d'origine biologique.

L'horizon S situé au-dessous de A (50-90 cm) est le lieu d'altération des minéraux primaires, de libération d'oxyhydroxydes de fer, de décarbonatation, etc.

L'horizon B est situé au-dessous de S (90-150 cm), il est caractérisé par des teneurs en argile, fer et humus plus élevées que les horizons A, S et C. Cet enrichissement peut être du soit à des transformations des minéraux préexistants, soit à des apports illuviaux. La matière organique présente dans cet horizon est plus âgée et provient de l'horizon supérieur (A). Elle est adsorbée sur les argiles et les oxydes de fer et d'aluminium.

Enfin l'horizon C situé au-dessous de B (en dessous de 150 cm) est un horizon minéral avec une faible teneur en matière organique.

Les facteurs de différenciation de la couverture pédologique sont : les formations superficielles et le matériau dans lesquels la pédogenèse se développe, le relief et la géomorphologie, la végétation, la faune et les diverses activités humaines, l'énergie apportée au

système par le soleil (chaleur), la terre (la gravité) et l'atmosphère (apports d'eau et de particules) mais aussi par la biologie (végétation, faune) et enfin la durée d'évolution.

Les effets du climat constituent un facteur de différenciation important sur la structure des différents sols. En effet, en fonction des températures et de l'humidité on verra apparaître des sols différents Cryosols (zones froides) ou Ferralsols (zones chaudes). La figure 1.1 représente de manière simplifiée l'influence de quelques paramètres sur les facteurs de pédogenèse (BAIZE et JABIOL, 1995).

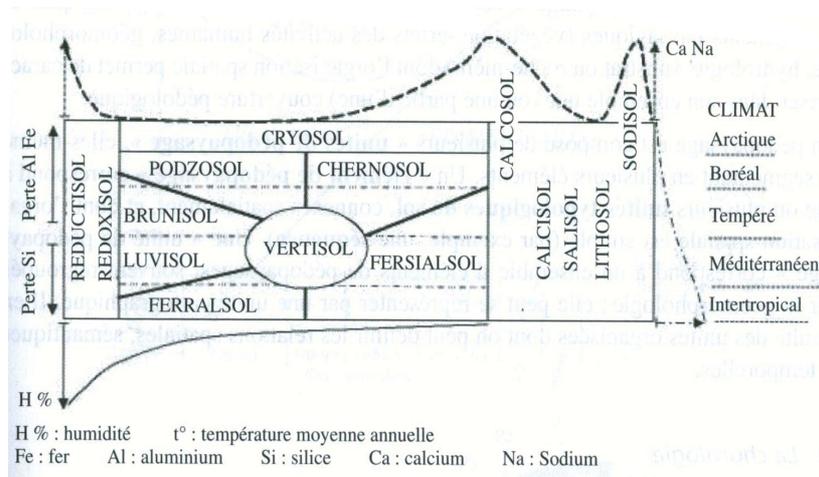


Figure 1.1 : Représentation simplifiée de quelques catégories de sols en fonction de facteurs de pédogenèse (BAIZE et JABIOL, 1995)

En France, il existe une multitude de sols qui diffèrent selon de nombreux paramètres (figure 1.1) mais aussi en fonction du mode d'occupation des sols. Ainsi, un sol forestier sera plus riche en matière organique qu'un sol agricole. La figure 1.2 montre la répartition des différents types de sol en France établi par l'INRA d'Orléans en 1998.

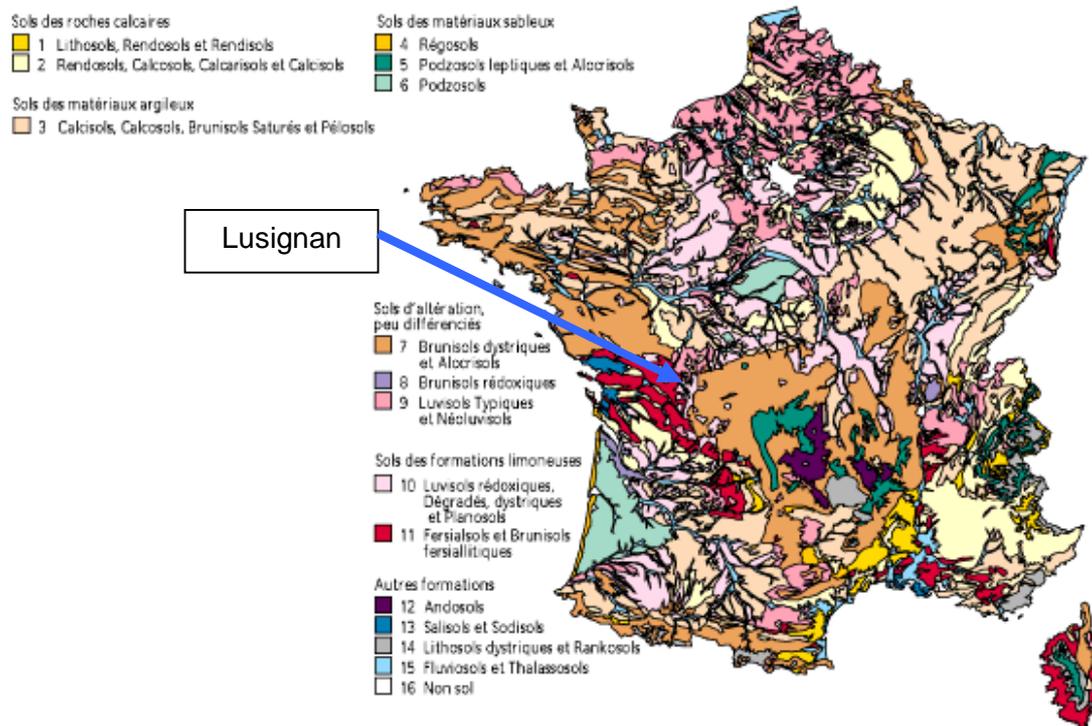


Figure 1.2 : Différents types de sols rencontrés sur le territoire français (INRA, Orléans, 1998)

Notre étude porte sur le dispositif de l'Observatoire de Recherche Environnementale (ORE) de Lusignan situé dans la Vienne dans l'ouest de la France. Cette région se situe dans une zone géologique caractérisée par des sols de type Brunisols/Luvisols.

I-2. Composition des horizons

Un sol est constitué de différents horizons (cf. I.1), la composition minérale et organique de chacun d'entre eux diffère non seulement avec leur profondeur mais aussi avec le type de sol rencontré.

I-2-1. Aspects minéralogiques

Les minéraux des sols sont nombreux et leur nature dépend des roches sur lesquelles les sols se sont formés. Ils constituent environ 90-99 % de la masse du sol à l'exception des sols très organiques comme les tourbes.

Tous les éléments présents dans la roche se retrouvent dans les sols en proportions souvent voisines (SPOSITO, 1989). La figure 1.3, indique les teneurs moyennes des principaux éléments chimiques des sols.

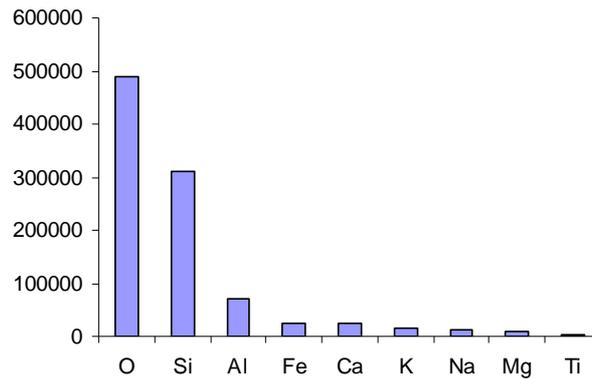


Figure 1.3 : Teneur moyenne (mg.kg⁻¹) des principaux éléments chimiques des sols (horizon 0-20 cm) (SPOSITO, 1989)

Ces teneurs sont souvent voisines dans les différents types de sols, néanmoins il existe dans certains sols un enrichissement ou un appauvrissement en certains éléments du à l'utilisation du sol mais surtout à la très grande variabilité spatiale des sols (SPOSITO, 1989). Ces minéraux ne contiennent pas de carbone et d'azote, ces deux éléments sont apportés aux sols par la matière organique et leur abondance est donc liée à la présence et à l'activité des organismes vivants.

On distingue deux catégories de minéraux. Les minéraux primaires qui sont des minéraux hérités de la roche parentale qui se trouve dans le sol, sont plus ou moins fragmentés et peu ou pas altérés. C'est le cas par exemple de l'épidote, la tourmaline, le zircon et le rutile qui sont très résistants au processus d'altération. Les minéraux secondaires sont des minéraux primaires altérés, leurs quantités dépendent de la roche et de l'efficacité du processus d'altération (BEAR et DAGAN, 1965).

Les propriétés physiques des minéraux sont nombreuses. De part leurs conséquences sur les phénomènes aux interfaces, la taille, la forme et la surface spécifique sont les propriétés les plus importantes (GRIM, 1968).

Les minéraux possèdent aussi des propriétés physico-chimiques importantes, elles peuvent être regroupées en trois ensemble principaux : les propriétés de dissolution en milieu aqueux, les propriétés liées à la présence de charges électriques et les propriétés d'adsorption des molécules non ionisées.

La solubilité des minéraux dans l'eau est extrêmement variable ; très grande par exemple pour du chlorure de sodium et très petite pour le mica (biotite : $K^+(Mg,Fe,Ti)^{2+}_3[Al_{1+x}Si_{3-x}O_{10}(OH)_2]^{7-}$). Selon SPOSITO (1984), la dissolution d'un minéral est favorisée par les petites forces ioniques, les faibles pH et la présence de ligands complexants.

Certains minéraux possèdent à leur surface des charges électriques, c'est le cas des oxydes et des hydroxydes métalliques ainsi que des minéraux argileux. Ces charges (négatives le plus souvent) sont compensées par la présence de cations (appelés ions compensateurs). Ces cations sont très mobiles et participent à de nombreux phénomènes d'échanges (i.e. capacité d'échange cationique ou CEC) avec des ions présents dans le milieu environnant. Selon MARTIN et NOLIN (1991), une CEC faible correspond généralement aux sols sableux, des CEC modérées ou élevées à des sols argileux et une CEC très élevée à des sols minéraux recouverts d'une surface tourbeuse.

Enfin les surfaces des minéraux sont en fait des surfaces d'atome d'oxygène, de groupes OH avec un nombre plus ou moins grand d'ions compensateurs. D'un point de vue électrostatique, elles peuvent être considérées comme des surfaces portant des charges électriques, des dipôles électriques et des sites de liaison hydrogène. Ce sont donc des surfaces susceptibles d'attirer et d'adsorber des molécules non ionisées et polaires mais aussi des molécules chargées (GRIM, 1968 ; THENG, 1976). Deux catégories de molécules ont été particulièrement étudiées dans les années 1950 : l'eau et les molécules organiques.

L'adsorption de l'eau par les minéraux est un phénomène largement étudié. La quantité d'eau adsorbée dépend de la structure des minéraux, de l'empilement des feuillets et de la nature des cations compensateurs. Cette adsorption de l'eau sur les minéraux est un phénomène intéressant en raison de son implication dans la rétention de l'eau et donc du phénomène de biodisponibilité notamment de la matière organique soluble.

I-2-2. Aspects organiques

L'élément central de ces travaux est la matière organique, constituée en majorité par le carbone organique. La quantité de carbone organique dans les sols varie en fonction du type de sol et de son mode d'occupation. En effet, il est admis qu'un sol forestier sera plus riche en carbone organique qu'un sol agricole par son apport en débris végétaux et animaux. Les deux éléments principaux constituants cette matière organique sont le carbone et l'azote.

Le tableau 1.1 montre les teneurs en carbone organique dans différents sols dans l'horizon 0-15 cm.

Tableau 1.1 : Estimation des teneurs en carbone organique des sols du monde (BRADY et WEIL, 2002)

Types de sols	Teneur de C organique de l'horizon 0-15 cm (g C/100g)
Entisols	0,06-6,0
Inceptisols	0,06-6,0
Histosols	12-57
Andisols	1,2-10
Vertisols	0,5-1,8
Aridisols	0,1-1,0
Mollisols	0,9-4,0
Spodosols	1,5-5,0
Alfisols	0,5-3,8
Ultisols	0,9-3,3
Oxisols	0,9-3,0

On remarquera que les Histosols et les Andisols sont les plus riches en carbone organique. Cela est dû, soit à des conditions anaérobies et acides pour les Histosols, soit à l'existence de complexes organo-métalliques dans les Andisols. Au contraire, les Aridisols sont les plus pauvres en carbone organique du fait de l'aridité du climat qui limite la production de biomasse végétale.

En ce qui concerne l'azote, 90% est sous forme organique. La teneur moyenne de la couche de surface des sols cultivés est de l'ordre de 0,06 à 0,3 % (STEVENSON, 1982). Cet azote organique est présent comme constituant des tissus végétaux et des corps microbiens ainsi que des molécules organiques non humiques (peptides, protéines...) et humiques (acides fulviques, humiques et humines).

Il existe plusieurs méthodes pour quantifier les concentrations en carbone organique total dans les différents sols.

La première méthode fut proposée par SCHOLLENBERGER (1927) puis par WALKLEY et BLACK (1934). Elle consiste à oxyder en milieu acide (H_2SO_4) les formes de carbone organique en présence de bichromate de potassium en excès. Le dosage volumétrique du bichromate de potassium consommé par le carbone organique est effectué en retour par oxydoréduction (sulfate ferreux ou sel de Mohr) en présence d'indicateur.

La teneur en matière organique totale s'exprime en $g.kg^{-1}$ et est égale à : $[C]_{org\ tot} \times 1,724$ (1.724 facteur de VAN BEMMELEN). Ce coefficient est basé sur l'hypothèse d'une matière organique contenant principalement des acides humiques à 58% de carbone ($100/58 = 1,724$). Généralement, on utilise un coefficient de 2 pour les sols à végétation permanente et de 1,724 pour les sols cultivés (WALKLEY et BLACK 1934). Cette méthode est à l'heure actuelle assez peu utilisée.

La seconde méthode est le procédé de perte au feu ou « loss on ignition ». C'est une méthode très ancienne (ERNST STAHL, 18^{ème} siècle), qui repose sur la calcination et sur une différence de masse. Elle fut largement utilisée comme méthode permettant d'estimer la quantité de matière organique et la teneur en carbonate en particulier dans les sédiments (ANDERSEN, 1976). Cependant les résultats obtenus ont montré une importante variabilité sur un même échantillon du à la présence des argiles (importante dans les horizons profonds), des sels et le contenu variable du carbone organique. Il en résulte que cette méthode par son manque de fiabilité et d'exactitude fut peu à peu abandonnée comme méthode quantitative.

Enfin la troisième méthode repose sur l'utilisation d'un analyseur élémentaire de carbone qui détecte le CO_2 par infrarouge après oxydation thermique ou chimique du carbone. Cette méthode est actuellement la plus utilisée pour le dosage du carbone organique (CHEN et al. 2002 ; PETERSON et al. 2003).

De nombreux travaux existent sur la quantification du carbone organique total des sols. Ces travaux diffèrent en fonction du type de sol et de la méthode d'analyse utilisée. Le tableau 1.2 montre les différentes concentrations en carbone organique total, obtenues par quelques travaux dans différentes conditions.

Tableau 1.2 : Teneur en carbone organique total, obtenues sur différents sols et zones géographiques

Type de sol	Horizons	Méthode d'analyse	[COT] g C/kg de sol	Auteurs		
Sol agricole (Podzoluvisol) Allemagne	0-25 cm	Analyseur de carbone	4,3	ELLERBROCK et al. 1999		
Sol agricole (Podzolsol) USA	0-20 cm	Analyseur de carbone	16,0	OHNO et al. 2005		
Sol agricole (Cambisol) USA	0-20 cm	Analyseur de carbone	19,0			
Sol forestier sous chêne vert Italie	0-2 cm 2-5 cm 5-20 cm	Analyseur de carbone	239,0 62,2 27,3	TRAVERSA et al. 2008		
Sol forestier sous pin Italie	0-2 cm 2-5 cm 5-20 cm		Analyseur de carbone		117,6 66,8 49,8	
Sol agricole USA	0-25 cm				Analyseur de carbone	15,1
Sol forestier (Podzolsol) sous pin France	0-25 cm 25-50 cm 50-75 cm	Analyseur de carbone		44,4 20,8 6,9	DELPRAT et al. 1997	
Sols agricole (Cambisol) Allemagne	0-10 cm 20-30 cm		Analyseur de carbone	12,9 2,8		EMBACHER et al. 2007
Sols agricole (Luvisol) Allemagne	0-10 cm 20-30 cm			Analyseur de carbone		
Sol cultivé semi- aride Espagne	0-20 cm	Oxydation au bichromate	12,9	HERNANDEZ et al. 2007		

Le constat initial est que les concentrations en carbone organique total des sols varient énormément d'une étude à l'autre. Ces concentrations varient non seulement en fonction du type de sol (forestier/ agricole) mais aussi en fonction de la zone géographique avec une influence importante du climat, du mode d'occupation des sols (culture de maïs, de blé) et enfin de la végétation présente (pin, chêne).

Enfin, plusieurs travaux (DELPRAT et al. 2006 ; TRAVERSA et al. 2008) montrent que ces concentrations en carbone organique total diminuent de manière importante avec la profondeur des horizons.

Ce carbone organique total des sols a fait l'objet de nombreux travaux afin d'extraire et de caractériser ses différents composants, pour cela plusieurs protocoles ont été mis au point.

II. Extraction de la MO des sols

II-1. Les principaux protocoles d'extraction

La matière organique des sols est souvent synonyme de matières humiques. Elles peuvent être libérées en solution par des méthodes d'extraction capables de rompre une partie des liaisons organo-minérales. BRUCKERT (1979) distingue trois types d'extractants :

- Les solutions salines permettant de rompre les liaisons électrostatiques par simple échange d'ions et ainsi faciliter la mise en solution des molécules organiques par ionisation des groupes fonctionnels acides et phénoliques. Les substances extraites par cette méthode ont un poids moléculaire relativement faible et sont caractérisées par une teneur en métaux faible. On peut citer la méthode de ZSOLNAY (2003) qui extrait la matière soluble de différents horizons (surface et profond) avec un mélange sol/CaCl₂ avec un rapport massique 1/2 sous agitation pendant 10 minutes. La suspension est ensuite centrifugée à 4000 RPM pendant 10 minutes et filtrée sur un filtre de porosité 0,4 µm en polycarbonate. La solution est acidifiée à pH 2 pour éliminer les carbonates et la mesure du carbone organique dissous s'effectue avec un analyseur de carbone.

- Les complexants capables de rompre les liaisons de coordination ; le plus connu est le pyrophosphate de sodium employé à pH 9,8. Il affecte les liaisons des complexes avec les sites métalliques sur les argiles et peut solubiliser les complexes à forte teneur métallique. On peut citer notamment la méthode de DABIN (1976).

- La soude à pH 12 est l'extractant le plus efficace capable de détruire des liaisons organo-minérales. On peut citer la méthode de SCHNITZER (1982) et la méthode IHSS (International Humic Substances Society).

II-2. Extraction de la MO hydrosoluble

La matière organique extraite par ces différentes méthodes notamment les solutions alcalines très souvent utilisées, ne permettent pas d'estimer ni la quantité ni la qualité de la matière organique biodisponible dans les sols. En effet, ce processus d'extraction rompt des liaisons, modifie des structures qui ne seraient pas altérées dans des conditions naturelles plus douces. D'une manière générale, la matière organique se décompose dans les 10 premiers centimètres du sol et migre ensuite vers les horizons profonds. Les processus de minéralisation et d'humification sont les clés du transfert de la matière organique hydrosoluble dans les horizons profonds (NELSON et al. 1994). Une faible proportion de la matière organique hydrosoluble est mobile en profondeur (BOYER et GROFFMAN, 1996). Cependant, elle joue un rôle très important pour les microorganismes, pour la mobilité des espèces métalliques et des composés organiques (ZHOU et WONG, 2000) ainsi que pour l'adsorption des espèces minérales (KALBITZ et al. 2000).

Quelques protocoles existent sur l'extraction de la matière organique à l'eau pure, on peut citer notamment :

Tout d'abord, DELPRAT et al. (1997) qui extraient le carbone organique dissous en mélangeant le sol avec de l'eau pure. La suspension est agitée pendant 10 minutes et centrifugée. Le surnageant est filtré sur membrane de porosité $0.45 \mu\text{m}$; le COD est analysé avec un DOHRMANN DC180 (oxydation chimique).

Puis, BRUCKERT et al. (1978) qui préconisent une dispersion mécanique à l'eau. Cette technique utilise un traitement mécanique de faible intensité par agitation contrôlée en présence de billes d'agate. Cette méthode de dispersion mécanique fut aussi utilisée par FELLER (1979) et ANDREUX et al. (1980) en faisant varier le nombre de billes ainsi que la vitesse d'agitation. Ce protocole permet de casser des particules et de libérer un peu plus de carbone notamment dans les horizons supérieurs.

Enfin, EDWARDS et BREMER (1967) soumettent une suspension aqueuse des échantillons de sol à une vibration sonique (9 kHz, 50 W) avec un vibreur Raytheon S-102A pendant 30 min. Les résultats obtenus avec la vibration sonique sont identiques à ceux obtenus par dispersion chimique (NaOH ou $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$).

Parmi les travaux utilisant des méthodes d'extraction à l'eau pure, on peut montrer à titre d'exemple les résultats obtenus par :

GREGORICH et al. (2003) qui comparent deux modes d'extraction de la fraction soluble : une extraction à l'eau froide et une à l'eau chaude. Le sol étudié vient d'une ferme expérimentale au Canada sur lequel plusieurs modes d'occupation ont été mis en place : une monoculture de maïs et une culture de maïs et soja en alternance. L'étude porte sur un horizon de surface (0-15cm). Les concentrations initiales en carbone organique total et en carbone organique soluble ont été mesurées par la méthode au bichromate de potassium.

Une autre étude a été réalisée par MATLOU et HAYNES en 2006 sur un sol avec trois modes d'occupation différents (gazon : Kikuyu, Gazon : Ray-grass et maïs), 3 extractions indépendantes avec K_2SO_4 , KCl et à l'eau. L'horizon étudié est l'horizon de surface (0-15cm). Les concentrations en COD ont été mesurées par un analyseur de carbone de type SHIMADZU 5000A.

Les résultats de ces deux travaux sont regroupés dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Concentrations en carbone organique soluble sur différentes cultures (d'après GREGORICH et al. 2003 et MATLOU et HAYNES., 2006)

	Types de sols (0-15 cm)	[C] organique total en g C.kg ⁻¹ de sol	[C] organique soluble en mg C.kg ⁻¹ de sol		
			Eau froide	Eau chaude	
GREGORICH et al. 2003	Maïs avec engrais	34,4	570	1226	
	Maïs sans engrais	25,3	283	674	
	Alternance maïs/soja fertilisée	25,6	307	664	
	Alternance maïs/soja avec engrais	29,2	419	801	
MATLOU et HAYNES. 2006	Kikuyu	76,0	111	239	252
	Ray-grass	41,0	19	153	163
	Maïs	38,0	18	126	151

Il est à noter au vu des résultats présentés tableau 1.3 que la concentration en carbone organique dissous varie de façon importante suivant le mode d'occupation, le type de sol et le mode

d'extraction. De plus, on peut remarquer que la fraction du carbone organique extractible représente une très faible proportion quelque soit le mode d'extraction et le mode d'occupation.

Le tableau 1.4 montre le pourcentage de carbone organique soluble extrait par rapport au carbone total en fonction des différents types de sol et du mode d'extraction obtenus dans quelques travaux.

Tableau 1.4 : Récapitulatif de différents modes d'extraction : pourcentage du carbone soluble extrait

Origine des sols	Type d'extraction	[COD]	Proportion représentée par le carbone extrait (%)	Auteurs
0-10 cm Eutric Luvisol	CaCl ₂	34.7 mg.kg ⁻¹	0.31	Embacher et al. 2007
20-30 cm Eutric Luvisol	CaCl ₂	36.0 mg.kg ⁻¹	0.32	Embacher et al. 2007
0-10 cm Haplic Chernozem	CaCl ₂	31.7 mg.kg ⁻¹	0.16	Embacher et al. 2007
20-30 cm Haplic Chernozem	CaCl ₂	37.2 mg.kg ⁻¹	0.21	Embacher et al. 2007
0-15 cm Humic Gleysol maïze monoculture manured	Eau froide	570 mg.kg ⁻¹	1.66	Gregorich et al. 2003
	Eau chaude (80°C)	1223 mg.kg ⁻¹	3.55	
0-15 cm Humic Gleysol maïze monoculture no amendment	Eau froide	283 mg.kg ⁻¹	1.12	Gregorich et al. 2003
	Eau chaude (80°C)	674 mg.kg ⁻¹	2.66	
0-15 cm Humic Gleysol maïze-soybean manured	Eau froide	307 mg.kg ⁻¹	1.05	Gregorich et al. 2003
	Eau chaude (80°C)	664 mg.kg ⁻¹	2.27	
0-15 cm Humic Gleysol maïze-soybean fertilized	Eau froide	419 mg.kg ⁻¹	1.64	Gregorich et al. 2003
	Eau chaude (80°C)	801 mg.kg ⁻¹	3.13	
0-15 cm Rhodic Ferisols KiKuyu grass pasture	Eau froide	111 mg.kg ⁻¹	0.14	Matlou et Hayes. 2006
	K ₂ SO ₄	239 mg.kg ⁻¹	0.31	
	KCl	252 mg.kg ⁻¹	0.33	
0-15 cm Rhodic Ferisols Ryegrass pasture	Eau froide	19 mg.kg ⁻¹	0.05	Matlou et Hayes. 2006
	K ₂ SO ₄	153 mg.kg ⁻¹	0.37	
	KCl	163 mg.kg ⁻¹	0.40	
0-15 cm Rhodic Ferisols Maïze pasture	Eau froide	18 mg.kg ⁻¹	0.05	Matlou et Hayes. 2006
	K ₂ SO ₄	126 mg.kg ⁻¹	0.33	
	KCl	151 mg.kg ⁻¹	0.40	
Horizon Oi (forest soil, Sweden)	NaCl	95 ^{+/-} 6 mg.l ⁻¹	0.41	Fröberg et al. 2003
Horizon Oe (forest soil, Sweden)	NaCl	45 ^{+/-} 2 mg.l ⁻¹	0.19	Fröberg et al. 2003
Horizon Oa (forest soil, Sweden)	NaCl	28 ^{+/-} 2 mg.l ⁻¹	0.14	Fröberg et al. 2003

Les résultats présentés dans le tableau 1.4 permettent de confirmer que la fraction du carbone organique soluble est très faible quelque soit le mode d'occupation ou le mode d'extraction. Cependant il est à noter que l'eau chaude extrait une proportion plus importante du carbone organique.

II-3. Collecte de la matière organique hydrosoluble par un dispositif de plaques lysimétriques

Il est possible de collecter la matière organique hydrosoluble des sols et en particulier des horizons profonds par un système de plaques lysimétriques. Ce système collecte l'eau qui percole dans le sol à différentes profondeurs en fonction du système mis en place. Quelques travaux existent sur la caractérisation de la matière organique hydrosoluble qui percole dans le sol ; on peut citer les travaux de MICHALZIK et MATZER en 1999.

Le sol étudié est un sol forestier de type Cambisol possédant 3 lysimètres en dessous des trois horizons de la litière (premiers centimètres de sol) Oi, Oe et Oa. Sur les différentes eaux collectées, des mesures de concentration en carbone et azote organique dissous ont été réalisées par un analyseur de carbone et d'azote. Les concentrations obtenues sont regroupées dans le tableau 1.5.

Tableau 1.5 : Récapitulatif des concentrations observées en NOD et COD collectées au niveau de plaques lysimétriques dans un sol forestier (MICHALZIK et MATZER, 1999)

Horizons	[NOD] mg.L ⁻¹	[COD] mg.L ⁻¹
Oi	1,33	35,7
Oe	1,28	38,2
Oa	1,22	37,8

Les concentrations observées par MICHALZIK et MATZER (1999) sont plus faibles que celles observées par FRÖBERG et al. (2003) (présentée dans le tableau 1.4) dans les mêmes horizons. Cette différence s'explique par le mode d'extraction de la matière organique soluble. Tandis que FRÖBERG et al. (2003) utilisent une solution saline pouvant rompre des liaisons, MICHALZIK et MATZER. (1999) collectent à partir de PL qui permettent un drainage naturel. Le rapport COD/NOD de l'ordre de 30 montre une faible proportion d'azote organique extractible à l'eau par PL.

On peut également citer FRÖBERG et al. (2003) qui proposent une autre étude sur les sols forestiers en Suède. L'étude porte sur 3 horizons Oi, Oe et Oa. Pour chaque horizon, trois

échantillons ont été élaborés : le premier est le sol en lui-même, le second la solution récupérée sur des plaques lysimétriques et enfin le troisième est une solution provenant de l'extraction à l'eau d'un échantillon du sol. McDOWELL et LIKENS (1988) émettent l'hypothèse que la majeure partie du COD dans l'horizon O provient du sol forestier plutôt que de la litière récente déposée par les feuilles. La figure 1.4 montre l'évolution de la concentration en COD collecté à partir des PL.

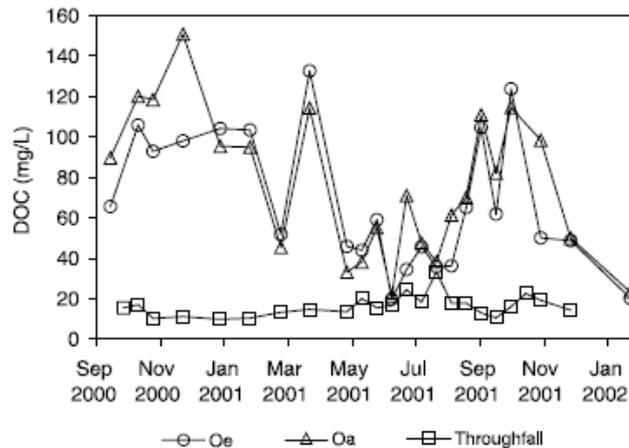


Figure 1.4 : Evolution de la concentration en COD en mg/l au cours des saisons (FROBERG et al. 2003)

Les solutions de plaques lysimétriques des horizons Oe et Oa possèdent des concentrations en COD voisines. Des variations temporelles sont observables pour ces deux horizons avec notamment une diminution de la concentration en COD en été.

MERTENS et al. en 2007 ont également étudié la dynamique du COD à partir de prélèvement sur PL à différentes profondeurs. Le site expérimental est un domaine agricole situé près de Merzenhausen en Allemagne. Le sol étudié est un sol nu de type Orthic Luvisol avec une fraction limoneuse dominante et une nappe phréatique à environ 15 m en dessous de la surface. La température moyenne annuelle est de 9,5°C et la quantité de précipitation annuelle moyenne de 689 mm. Le site est équipé de plaques lysimétriques à 40 et 120 cm de profondeur. Les concentrations en COD obtenues au cours de cette période, varient entre 0,8 et 92,5 mg C/L à 40 cm de profondeur et entre 0,1 et 50,5 mg C/L à 120 cm. A partir de ces résultats, MERTENS et al. (2007) ont émis l'hypothèse d'un effet tampon du sol sur les concentrations en COD au vu des faibles variabilités spatiales et temporelles observées.

Les résultats des concentrations en COD au cours des années 1998 à 2000 à 40 et 120 cm sont présentés figure 1.5.

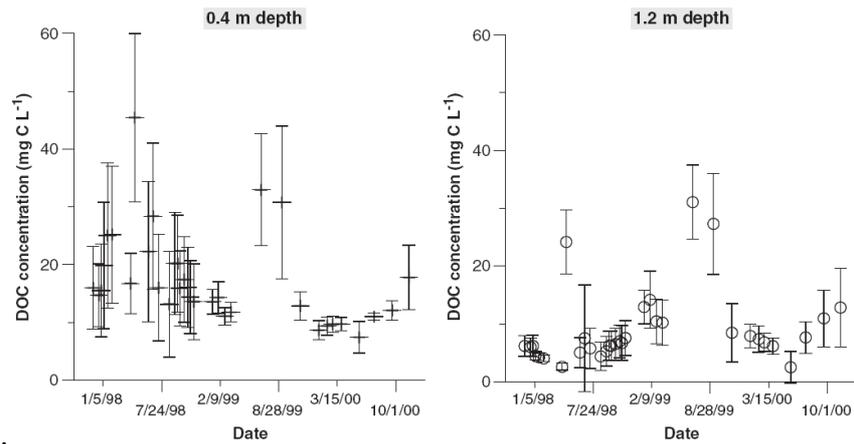


Figure 1.5 : Evolution annuelle de la moyenne et écart type des concentrations en COD à 40 et 120 cm (MERTENS et al. 2007)

MERTENS et al. (2007) montrent que les concentrations en COD à 40 et 120 cm suivent la même dynamique temporelle. En parallèle, un suivi de la température et de l'humidité du sol à été réalisé à proximité des zones de prélèvement à 20, 45 et 100 cm de profondeurs afin de déterminer s'il existait une corrélation entre le COD et ces deux paramètres. Les résultats obtenus sont présentés figure 1.6

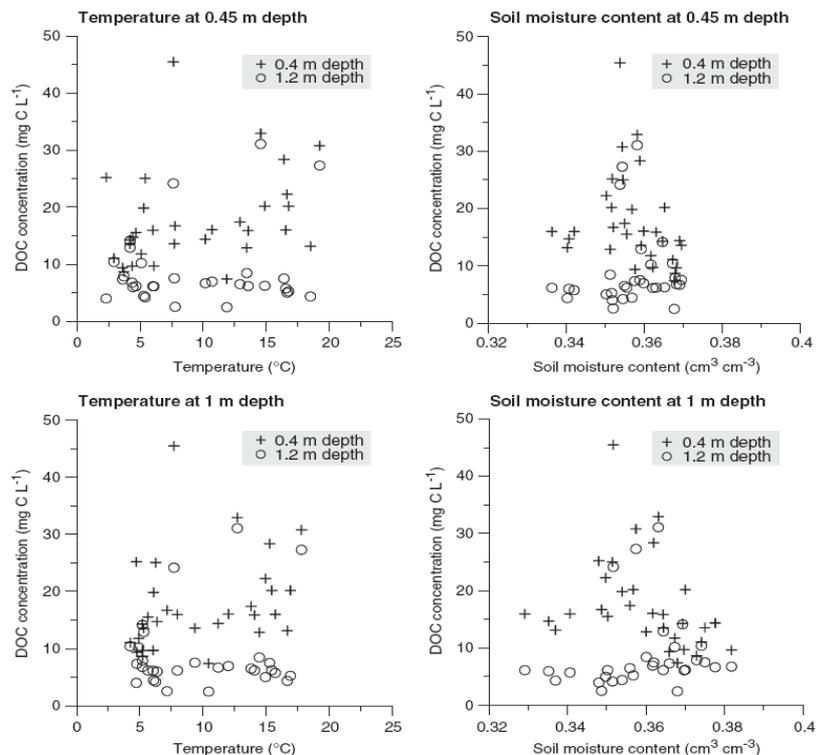


Figure 1.6 : Evolution de la concentration en COD à 40 et 120 cm en fonction de la température et de l'humidité du sol (MERTENS et al. 2007)

Selon MERTENS et al. en 2007 les concentrations en COD ne semblent pas liées à la température. Cette absence d'effet de température est en opposition avec d'autres études (GUGGENBERGER et al. 1998 ; TIPPING et al. 1999), même si ces deux études avaient été réalisées sur des sols forestiers et cultivés en contraste avec le sol nu étudié par MERTENS et al. (2007).

En effet, dans ces études la décomposition des résidus végétaux et microbienne de la matière organique est affectée par la température.

De la même manière, aucune corrélation n'a été observée entre l'humidité du sol et les concentrations en COD. Comme l'a signalé KALBITZ et al. (2000), l'étude des relations entre l'humidité et les concentrations en COD ont montré des résultats variables. Plusieurs travaux attribuent l'augmentation des concentrations en COD à un renforcement de l'activité microbienne. Toutefois GUGGENBERGER et ZECH en 1994 n'ont trouvé aucun effet de l'humidité du sol sur les concentrations en COD même dans un sol forestier.

D'autres études en particulier AMERY et al. en 2008 ont étudiés la mobilisation du cuivre par le COD dans un horizon de sol agricole. Le site d'étude est situé à Leuven en Belgique sur un sol limoneux de type Luvisols. Le domaine agricole a été cultivé pendant plus de 30 ans en rotation avec du maïs, du blé et de l'orge. La pluviométrie annuelle moyenne est de 775 mm. Le site est équipé de mèches capillaires en fibre de verre installées à 45 cm de profondeur permettant de collecter l'eau de lixiviation par aspiration. Cette opération s'effectue toutes les deux semaines. Les concentrations en cuivre ont été mesurées par ICP (inductive coupled plasma) avec une limite de détection de 1µg/L, et les concentrations en COD par un analyseur de carbone. Des analyses UV ont ensuite permis de déterminer le SUVA. Les résultats obtenus lors de ces travaux sont présentés figure 1.7.

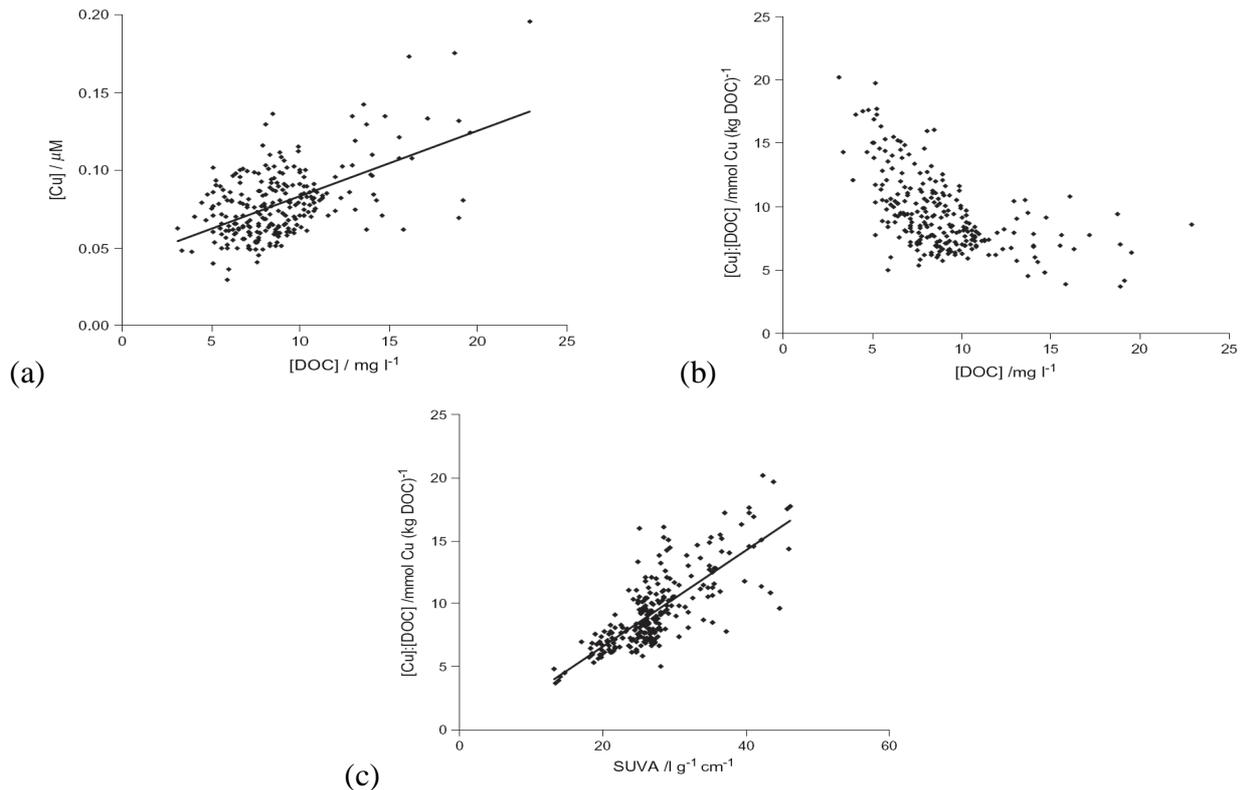


Figure 1.7 : Evolution de la concentration en COD à 45 cm en fonction de la concentration en Cu (a) du rapport [Cu]/[COD] (b) et Evolution du SUVA en fonction du rapport [Cu]/[COD] (c) (AMERY et al. 2008)

Les résultats présentés permettent de montrer une corrélation positive entre les concentrations en Cu et celles en COD dans les lixiviats. Toutefois, le coefficient de corrélation obtenu par AMERY et al. (2008) reste assez faible ($r = 0,56$), cette corrélation confirme l'importance de la quantité du COD sur la mobilisation du Cu comme l'ont montré précédemment TEMMINGHOFF et al. 1998 ; ROMKENS et al. 1999. De plus, il est à noter que le rapport [Cu]/[COD] augmente avec la diminution de la concentration en COD. Enfin, le rapport [Cu]/[COD] est corrélé de manière positive avec le SUVA (bon coefficient $r = 0,77$). Ce bon coefficient indique que l'aromaticité est un bon indicateur de la mobilité du Cu dans le sol, ainsi plus la MOD est aromatique plus elle a d'affinités avec le Cu.

III. Composition de la MO extraite des sols

Dans cette matière organique, on distingue trois grands groupes : les substances humiques, les substances non-humiques et l'humine. La classification de ces trois groupes ne repose que sur des propriétés de fractionnement et non sur la classe des molécules présentes.

III-1. L'humine

L'humine est la fraction insoluble de la matière organique en phase aqueuse à tous les pH. Cette fraction ne sera donc pas étudiée dans ce manuscrit. Pour information, elle représente une partie importante à la fois par la masse de carbone organique qu'elle représente et par son rôle dans la biogéochimie du carbone. L'humine représente 30 à 50 % du carbone organique des sols (KONONOVA, 1966 ; STEVENSON, 1982) et plus de 70 % du carbone organique des sédiments (KEIL et HEDGES, 1995). L'humine apparaît plus riche en azote et en groupe carbonyle. Le tableau 1.6 compare la composition élémentaire et la teneur en groupes fonctionnels oxygénés d'acides humiques et d'humine d'après des travaux de SCHNITZER et KHAN en 1972 et LICHTFOUSE en 2000.

Tableau 1.6 : Composition élémentaire et groupe fonctionnel oxygéné de l'humine comparé aux acides humiques (SCHNITZER et KHAN, 1972 repris par LICHTFOUSE, 2000)

Elément	Acides humiques	Humine
	Composition élémentaire	
C	57,30	55,90
O	34,40	32,80
H	5,05	5,75
N	2,80	4,85
S	0,60	0,75
Groupe fonctionnel oxygéné		Teneur cmole/kg
COOH	788	545
OH phénolique	368	320
OH alcoolique	422	225
CO	233	-

III-2. Substances Humiques

Une méthode de référence utilisant une solution alcaline permet d'extraire les substances humiques (SH). Les extractions réalisées par des solutions alcalines conduisent à des solutions contenant en mélange un grand nombre de molécules de taille et de composition très variées. Les résultats obtenus dépendent de plusieurs facteurs comme la teneur en métaux des sols et en particulier la concentration des réactifs alcalins utilisés. Les composés humiques extraits sont

classés selon leur différence de solubilité en phase aqueuse, en fonction du pH (SCHNITZER et KHAN, 1972). Ce protocole (figure 1.8) conduit à l'obtention d'une phase insoluble (*humine-III-1*) et d'une solution foncée ou phase alcalino-soluble (*substances humiques*), qui après acidification donne deux fractions : les acides humiques (AH) qui précipitent et les acides fulviques (AF) présents en solution.

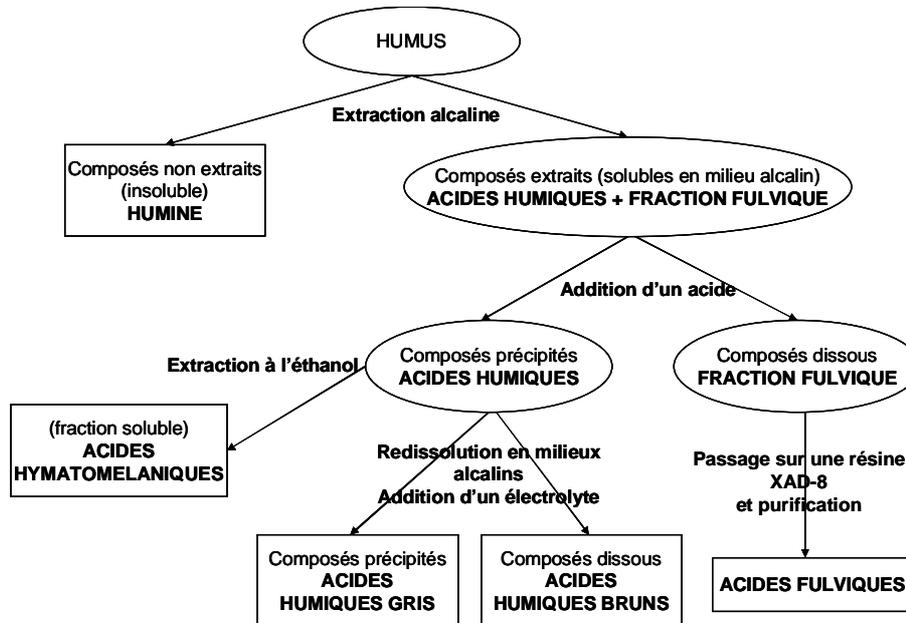


Figure 1.8 : Schéma d'extraction et de fractionnement de substances humiques
(STEVENSON, 1989 ; SCHNITZER et KHAN, 1972)

Les principales fractions : les acides humiques et fulviques, ainsi définies ne sont le résultat que d'une procédure conventionnelle de séparation ; autrement dit, il s'agit de définitions opérationnelles qui ne reposent pas sur des caractéristiques fonctionnelles ou structurales particulières. Cette procédure ne sépare pas des molécules individualisées mais donne des mélanges d'espèces possédant des propriétés similaires.

Les SH constituent une famille chimique complexe (SCHULTEN et LEINWEBER, 1996). Présentes dans tous les écosystèmes, les SH représentent la majeure partie du carbone organique globalement distribué dans les environnements aquatiques et terrestres. Elles se retrouvent dans les sols, les sédiments et les eaux naturelles (EYHERAGUIBEL et al. 2008). 50 à 70% du carbone du sol se trouvent dans les SH (GRIFFITH et SCHNITZER, 1975). Elles constituent des mélanges très complexes de MO hétérogènes de couleur jaune à noire, de composition mal définie et variable, de caractère acide, partiellement aromatiques, difficilement dégradables dans les conditions thermodynamiques où elles se trouvent, présentant une large gamme de masses molaires (poids

moléculaire élevé, de quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers de daltons). Les SH peuvent avoir des origines très diverses. Elles peuvent provenir de MO d'origine animale, végétale ou bactérienne.

La composition des substances humiques est donnée par les teneurs en groupements fonctionnels, groupements azotés (amine primaire, imine, etc), groupements oxygénés aliphatiques (acides, aldéhydes, Cétones, etc) et groupements oxygénés aromatiques (phénol, quinone, etc).

La formule chimique moyenne serait pour les acides humiques $C_{10}H_{12}O_5N$ et pour les acides fulviques $C_{12}H_{12}O_9N$ (STEVENSON, 1982). Le rapport O/C est environ 0,5 pour les acides humiques et 0,7 pour les acides fulviques. Cette relative richesse en oxygène des acides fulviques par rapport aux acides humiques est due à un plus grand nombre de fonctions COOH et à une plus grande abondance d'hydrates de carbone. Leur composition élémentaire est présentée dans le tableau 1.7 à partir des travaux de STEELINK en 1985

Tableau 1.7 : Composition élémentaire (%) des acides humiques et fulviques de sol (STEELINK, 1985)

Elément	Acides humiques	Acides fulviques
C	53,8-58,7	40,7-50,6
O	32,8-38,3	39,7-49,8
H	3,2-6,2	3,8-7,0
N	0,8-4,3	0,9-3,3
S	0,1-1,5	0,1-3,6

III-3. Substances non humiques

Les substances non humiques sont des molécules appartenant à des familles chimiques identifiées : hydrate de carbone, protéines et acides aminés, lipides, tannins, lignines, terpénoïdes et acides organiques. Ces molécules sont parfois qualifiées de biomolécules pour rappeler leur origine biologique parce qu'elles proviennent soit de la dégradation des constituants cellulaires, soit de synthèses microbiennes. Ces substances organiques, de faible poids moléculaire, sont généralement labiles et relativement faciles à métaboliser et/ou dégrader par les enzymes hydrolytiques produites par les microorganismes.

III-3-1. Les composés azotés et les protéines

Ce sont les acides aminés, les sucres aminés, les acides nucléiques et un certain nombre de pigments. Les deux premiers groupes étant quantitativement les plus importants. Les acides aminés les plus abondants dans le sol sont ceux des parois cellulaires des micro-organismes. Plusieurs facteurs ont une influence sur la quantité et la distribution des acides aminés dans les sols : les réactions de synthèse et de dégradation, les organismes vivants, l'adsorption et les réactions chimiques avec les quinones et les sucres.

Dans le sol, les acides aminés sont donc : libres dans la phase liquide, à l'état adsorbé sur les colloïdes humiques et minéraux, et enfin combiné avec les peptides et les protéines (LOWE, 1978). Ces protéines et ces peptides ont fait l'objet de quelques travaux. Ils présentent des pics caractéristiques en infrarouge et en RMN-¹³C permettant de les identifier facilement. La méthode de fractionnement de l'azote organique dissous (LEENHEER et al. 2007) a montré que les protéines ne sont généralement pas conjuguées avec les polysaccharides car la fraction des protéines est relativement homogène et se trouvent dans la fraction hydrophobe. En effet, le pic des polysaccharides ou hydrates de carbone C-O, près de 1100 cm⁻¹ n'est pas très important dans les fractions hydrophobes alors qu'il est majoritaire dans la fraction colloïdale dans laquelle les aminosucres prédominent. Bien que biodégradables, les protéines sont stabilisées par adsorption sur des surfaces d'argile minérale.

III-3-2. Les hydrates de carbone

Les hydrates de carbone sont des composés très répandus dans le monde vivant, ils sont des constituants importants des structures cellulaires. Ils représentent 5 à 25 % de la matière organique du sol et proviennent des résidus des végétaux et des synthèses microbiennes. Ils sont généralement très rapidement biodégradés sauf quand ils sont liés aux colloïdes du sol. Une distribution approximative dans le sol est indiquée dans le tableau 1.8 (STEVENSON, 1994).

Tableau 1.8 : Distribution des hydrates de carbone dans le sol (STEVENSON, 1994)

Composé	% de la matière organique du sol
Sucres aminés	2-6
Acides uroniques	1-5
Hexoses	4-12
Pentoses	<5
Cellulose et dérivés de la cellulose	<15
Autres	Traces

Ces polysaccharides se trouvent dans le sol sous différents états. Tout d'abord sous forme de sucres libres dans la solution du sol en très petite quantité, seulement 1 % (SWINCER et al. 1969). Sous forme de polysaccharides complexés fortement adsorbés par les minéraux et les oxydes métalliques. Enfin, sous forme de polymères complexes de formes et de tailles variables. Le tableau 1.9 donne quelques exemples des teneurs en polysaccharides dans différents sols extraits par une hydrolyse acide d'après des travaux de OADES et al. (1970).

Tableau 1.9 : Quantité de sucres extraits par hydrolyse acide (mg/100g de sol) (d'après OADES et al. 1970)

Sucres	Sol limoneux	Sol argileux	Fumier
Glucose	124	257	664
Galactose	37	77	319
Mannose	40	105	282
Xylose	36	53	222
Arabinose	39	99	326
Rhamnose et fucose	21	56	187
Total des sucres	297	647	2000
Teneur en MO g/100g	2,1	4,4	59,0
Teneur totale en sucres g/100g de MO	14,1	14,7	3,4

Des travaux existent sur la détermination de l'origine des sucres dans les sols mais ils ne concernent que des sols forestiers du fait de leur forte concentration en carbone organique facilitant la recherche de tels composés. Notre recherche bibliographique ne nous a pas permis de collecter des données sur des sols agricoles pauvres en carbone organique. Parmi ces travaux on peut citer

ceux de RUMPEL et DIGNAC (2006) sur un Cambisol. La détermination des ratios, C_6/C_5 (mannose + galactose)/(xylose + arabinose) et déoxy/ C_5 (rhamnose + fucose)/(xylose + arabinose) permettent selon MURAYAMA (1984) et OADES (1984) de déterminer l'origine des sucres. Des ratios inférieurs à 0,5 indiquent des sucres dérivés de plantes alors que des ratios supérieurs à 2,0 indiquent une origine microbienne (GUGGENBERGER et ZECH, 1994).

Parmi le groupe des hydrates de carbones, les aminosucres constituent un groupe important même s'ils représentent des pourcentages très variables de la matière organique dissoute selon l'origine de la matière organique et l'état trophique de l'eau (oligotrophe et eutrophe).

Les sources d'aminosucres de la MON ont été identifiées dans la paroi cellulaire des bactéries et des champignons (WHITE et al. 1964). Les aminosucres libres ne sont pas trouvés dans les sols mais le groupe amino existe sous la forme acétylé. Les Aminosucres ont récemment été isolés des autres éléments de la matière organique dissoute et de sels minéraux en utilisant des membranes de dialyse ou d'ultrafiltration (LEENHEER et al. 2000 ; REPETA et al. 2002). Les aminosucres sont des substances incolores présentant une absorbance et une fluorescence faibles ou inexistantes dans l'UV. Leurs masses molaires ont été estimées dans une gamme allant de 500-20000 Daltons par chromatographie d'exclusion stérique (HER et al. 2002). Ces composés peuvent être facilement identifiables par leurs spectres infrarouges et RMN- ^{13}C . La dégradation par pyrolyse des aminosucres conduit à la formation d'acétamide grâce au groupe fonctionnel N-acétyl (BRUCHET et al. 1990).

Dans les échantillons d'eau, les hydrates de carbone se situent majoritairement dans les fractions transphiliques et hydrophiles de la matière organique dissoute (LEENHEER et al. 2004).

III-3-3. Les lipides

Les lipides sont constitués par un ensemble de composés organiques dont leur caractère commun est d'être soluble dans des solvants organiques (benzène, méthanol, éthanol, acétone...). Leur nature chimique est variée, simples composés comme les acides gras, ou molécules plus complexes comme les stérols, les terpènes, les cires et les résines. Ils représentent environ 2 à 6 % de la matière organique en provenance des résidus végétaux et des micro-organismes. La figure 1.9 donne un exemple de la teneur en lipides de différents sols (STEVENSON, 1982). La grande variabilité des résultats est attribuée par les auteurs aux difficultés d'analyses.

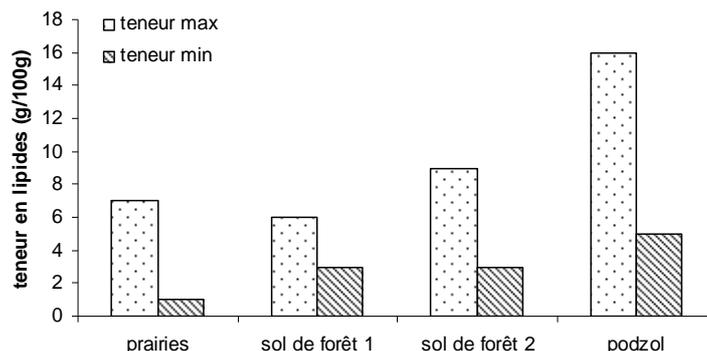


Figure 1.9 : Exemples de teneurs en lipides de la matière organique de divers (STEVENSON, 1982)

Les principaux constituants des lipides sont divisés en quatre catégories :

- Les cires, il s'agit d'esters d'acides gras et d'alcools à longue chaîne. Ces composés sont saturés et comportent un nombre d'atomes de carbone de 12 à 34.

- Les acides organiques, il s'agit d'acide gras jusqu'à 32 atomes de carbone. Les principaux acides gras des sols identifiés sont associés aux acides humiques et fulviques (SCHNITZER et NEYROUD, 1975).

- Les hydrocarbures, il s'agit de composés aliphatiques, de n-alcanes en C_{14} - C_{36} . Les C_{14} - C_{23} seraient d'origine microbienne et les C_{24} - C_{36} proviendraient des végétaux (STEVENSON, 1982).

- Les autres composés de la fraction lipidique des sols contiennent divers composés tels que les glycérides, les stéroïdes, les terpénoïdes.

Les chaînes poly(méthylène) des lipides dans la MON sont facilement détectées par un pic intense vers 2920 cm^{-1} en infrarouge, et par le pic près de 30 ppm en RMN- ^{13}C .

III-3-4. Les lignines

Par leur abondance dans la biosphère, les lignines sont sans aucun doute des précurseurs important de la matière organique des sols, les sédiments et l'eau. Des travaux sur les lignines et les produits de dégradations ont montré qu'elles possédaient des structures aromatiques substituées par des groupements aliphatiques phenyl-propane en position 1, ortho substituées par des groupements phénol/méthoxy ou substituées en position 3, 4 ou 5 par des groupement aryle éther. La figure 1.10 montre la structure possible d'une lignine.

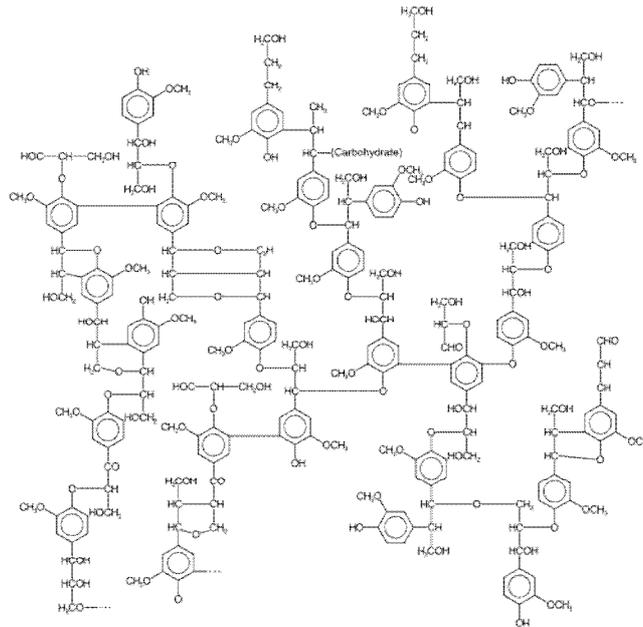


Figure 1.10 : Structure possible d'une lignine selon GLAZER et NIKAIDO, 1995

Les structures des précurseurs des lignines dans la matière organique peuvent être identifiées par les méthodes dégradatives (HEDGES et ERTEL, 1982) ou non dégradatives. La présence du groupe méthoxy aromatique est généralement caractéristique de la lignine, bien que certaines structures méthoxy substituées aient également été trouvées dans les tanins (ROBINSON, 1991). Le groupe méthoxy (O-CH_3) donne des pics aux alentours de 1127 cm^{-1} en infrarouge et vers 55 ppm dans les spectres RMN ^{13}C . Le squelette aromatique de la lignine donne un pic intense vers 1510 cm^{-1} en infrarouge, et le carbone aromatique non substitué en ortho de la fonction C-O de la lignine donne des pics allant de $105\text{-}120 \text{ ppm}$ en RMN ^{13}C , en fonction de la substitution du cycle.

III-3-5. Les tanins

Les tanins sont les principaux constituants des feuilles et de la litière végétale (PRESTON et al. 1997). Au cours de la dégradation des feuilles et de la décomposition de la litière, un assemblage complexe de structures humiques solubles et insolubles est formé de tannins, de lignines, de glucides et de protéines (WERSHAW et al. 1999 ; WERSHAW et al. 1998). Les tanins et les flavonoïdes sont des antioxydants qui se dégradent rapidement en phloroglucinol et en acides phénoliques lorsqu'ils sont en présence d'oxygène (LARSON, 1997).

III-3-6. Les terpénoïdes

Généralement regroupés dans la famille des lipides, les terpénoïdes représentent une classe de composés importante dans les sols. Ils sont représentés par différents groupes de composés (résines, stéroïdes, alcaloïdes, pigments, glycosides), la plupart possède une structure de base dérivée de l'acide mévalonique (ROBINSON, 1991). La structure des terpénoïdes est constituée d'unités d'isoprène ou d'isopentane qui aboutissent à la formation de cycles alicycliques tels qu'on peut les trouver dans les stéroïdes. La présence unique de ces unités d'isoprène dans divers acides fulviques (provenant de lixiviats de MO), d'eaux de surface et d'eaux souterraines, a permis de conclure que les terpénoïdes sont les principaux précurseurs des acides fulviques aquatiques (LEENHEER et al. 2003).

Les terpénoïdes tels que les stéroïdes et hopanoïdes sont difficiles à dégrader biologiquement (JAAP et al. 1995), cependant une voie métabolique de dégradation des terpénoïdes a été proposée par TRUDGILL en 1984. Deux de ces voies ont permis d'aboutir à la formation d'acides hydrophobes (constituants des acides fulviques) (Figure 1.11).

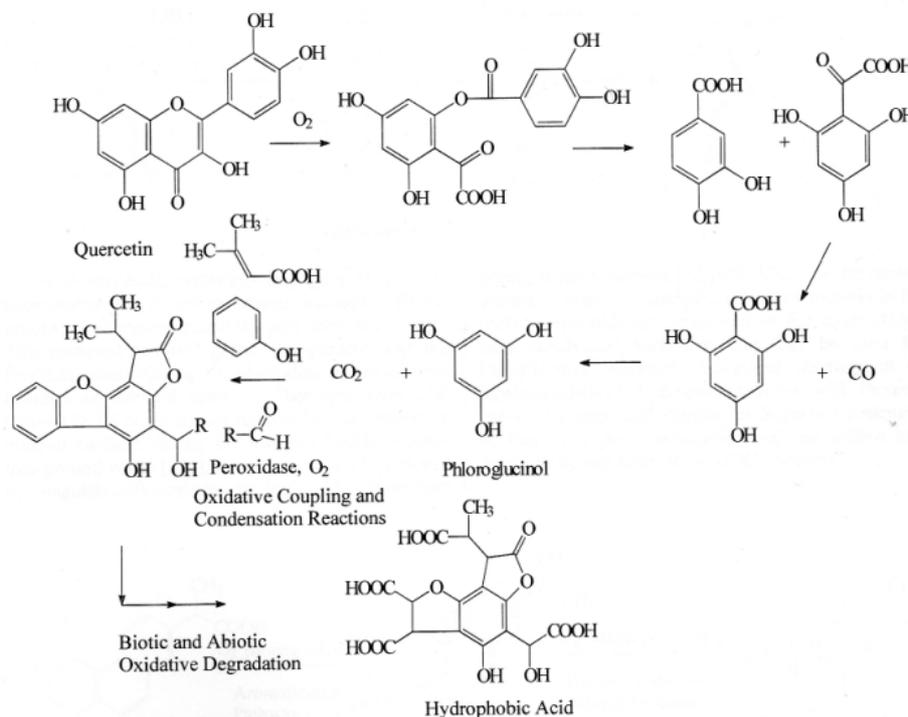


Figure 1.11 : Réaction conduisant à la formation d'acides hydrophobes à partir de terpénoïdes (LEENHEER et al. 2007)

Tout d'abord, la voie de l'aromatisation peut expliquer la partie du carbone aromatique observée par RMN ^{13}C qui ne peut pas être facilement expliquée par les acides phénoliques dérivés des lignines et des tanins. Ensuite, la voie de Baeyer-Villiger peut en partie expliquer les structures ester qui se trouvent généralement dans les terpénoïdes dérivés d'acide fulvique.

Ces deux voies métaboliques aboutissent à la formation des acides fulviques dans lesquels des groupes carboxyles sont répartis autour des cycles. Ces groupes carboxyles arrangés autour des cycles aromatiques ne facilitent pas les liaisons métalliques ou l'adsorption par les sesquioxides sur des surfaces minérales. Par conséquent, les dérivés terpénoïdiques des acides des matières organiques dissoutes ne sont pas éliminés par adsorption sur des surfaces minérales durant l'infiltration des eaux de surface vers les eaux souterraines. Ainsi, ces dérivés peuvent se retrouver dans les eaux souterraines (LEENHEER et al. 2003).

IV. Facteurs qui influencent la quantité de MO hydrosoluble dans les sols

IV-1. La température

FRÖBERG et al. (2004) ont travaillé sur trois sites situés en Suède, ayant les mêmes caractéristiques géologiques, pédologiques, végétales. Ils se sont aperçus que le COD variait avec la latitude, dans les horizons de surface. Le COD était plus élevé au Sud là où la température est la plus chaude. On peut citer PROKUSHKIN et al. (2005) et MICHALZIK et al. (1999) qui ont également abouti à la même remarque respectivement sur les sols de Sibérie et sur des eaux souterraines forestières. TIPPING (1999), a aussi étudié l'influence de la température en chauffant un lysimètre installé à 28 cm de profondeur. Ses résultats ont montrés une augmentation du COD dans les premiers temps mais cette augmentation est restée transitoire. Des études en laboratoire ont confirmé l'influence positive de la température sur la production de COD (CLARK et al. 2005).

D'un point de vue microbiologique, l'étape limitante de la décomposition de la matière organique est l'hydrolyse enzymatique des composés organiques de hautes masses moléculaires en plus petites molécules utilisables par les microorganismes. Cette décomposition est due à des enzymes, on peut citer, la phénoloxydase qui est sensible aux conditions climatiques. FREEMAN et al. (2001) mais aussi KANG et FREEMAN (1999) ont démontrés que plus la température est élevée, plus l'enzyme est stimulée. Une augmentation de la température favorise donc l'activité de la phénoloxydase mais augmente également la production de COD. Enfin, MATLOU et HAYNES (2006) suggèrent que l'effet de la température affecte la production de COD en amont, c'est-à-dire que plus la température est haute plus la saison de croissance est longue, et donc plus il y aura de déchets biologiques qui est la première source du COD.

Cependant, certains travaux ne permettent pas de mettre en corrélation la température et la concentration en COD, parmi ceux-ci on peut noter WILSON et WILLIAMS (2006) qui ont chauffé le sol grâce à des tubes chauffants incérés dans le sol et n'ont pas relevé d'influence de la température sur le COD.

IV-2. Le pH

Le pH joue également un rôle important. En effet, lorsque la terre est enrichie en acides minéraux, le sol relargue moins d'acide organique, il tamponne donc l'impact de la sédimentation acide sur l'écoulement des eaux (EVANS ET al. 2005). Le COD est composé entre autres d'acides organiques donc plus il y aura d'acides organiques, plus il y aura de COD. Alors, le COD dans les eaux de surface est moins élevé lorsque l'on est en présence d'une forte quantité d'acides anioniques et inversement (EVANS et al. 2005). En laboratoire, KENNEDY et al. (1996) ont observé que l'augmentation du pH s'accompagne d'une augmentation des matières organiques naturelles dissoutes.

Toutefois, EVANS et al. (2005) citent quelques expériences réalisées grandeur nature, qui ne notent pas de réponse du COD face au changement de pH (HESSEN et al. 1997 ; DAVID et al. 1999).

IV-3. La force ionique

La force ionique d'une solution pourrait aussi avoir un effet sur la quantité et la qualité de la matière organique dissoute. En laboratoire, VANCE et al. (1989) ont montré que lorsque la force ionique d'une solution d'eau naturelle augmente, il y a une diminution du COD. On peut tout de même remarquer qu'étant donné que l'acidité est un paramètre qui affecte la force ionique, il est difficile de savoir quel est le paramètre qui est réellement responsable de la variation de la quantité de COD.

IV-4. Le CO₂ atmosphérique

Pour FREEMAN (2004) et EVANS et al. (2005), il semblerait que la concentration en COD soit beaucoup plus sensible aux facteurs environnementaux qui affectent la production première de matière organique que ceux qui affectent la décomposition uniquement. EVANS et al. (2005) remarquent que pendant ces dernières années où les recherches se sont consacrées à la réponse du COD à un changement climatique, un facteur avait aussi beaucoup augmenté : le CO₂

atmosphérique. Depuis 1988, on constate une augmentation du CO₂ atmosphérique de 10% pouvant être à l'origine de 1 à 6% de l'augmentation du COD (EVANS et al. 2005). La littérature l'explique par le fait que le CO₂ améliore la production du COD et d'exsudat de plantes en augmentant la matière organique naturelle potentielle. Selon EVANS et al. (2005), une augmentation de 235 ppm de CO₂ conduirait à une augmentation du COD de 14 à 61%. Cependant, les recherches sur ce facteur restent encore très minces et peu de conclusions peuvent être affirmées.

IV-5. Le sol et les pratiques agricoles

Il est communément admis que les teneurs en COD diffèrent en fonction du type de sol. Dans un sol minéral, les phénomènes d'adsorption avec les minéraux tels que le fer, l'aluminium et la silice sont plus nombreux que dans un sol organique. La concentration en COD en sera donc diminuée. TIPPING (1999) met en évidence que la matière organique n'est pas la même quel que soit le type de sol. En se basant sur la fraction hydrophile du COD, il montre que seulement 37% du COD est hydrophile pour les tourbières alors que la portion hydrophile atteint 56% pour les terres marrons et 87% pour les sols micropodzols.

L'influence des pratiques du sol sur le COD reste encore très controversée. Certaines études n'ont rien montré (EVANS et al. 2005) alors que d'autres tel que HAYNES (2000) et MATLOU et HAYNES, (2006) remarquent une différence de concentration du COD en fonction des cultures. HAYNES en 2000 met en évidence que sur un champ en pâturage, la teneur en COD est plus élevée que sur un champ de sol arable. Il l'explique par le fait que dans un sol arable la quantité de matière organique qui retourne au sol est beaucoup plus faible que dans un pâturage. MATLOU et HAYNES, (2006) remarquent qu'un champ couvert d'herbe kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) depuis plus de cinquante ans présente une concentration en COD plus élevée que des champs couverts de seigle (*Lolium multiflorum*) depuis plus de cinquante ans ou de maïs (*Zea maize*) depuis plus de vingt-cinq ans.

IV-6. L'azote

L'azote est un nutriment limitant dans les écosystèmes terrestres et a un rôle sur la mobilisation de la matière organique labile.

Les travaux de EVANS et al. (2005) n'ont pas permis de mettre en évidence un quelconque effet de la quantité d'azote présente sur la production de COD. Néanmoins, cela n'exclue pas la possibilité qu'un enrichissement en azote d'un sol, à long terme, puisse avoir des conséquences sur la quantité en COD.

Les travaux de FRÖBERG et al. (2004), montrent qu'une forte concentration en azote a un double effet. D'une part, il aide au développement de la flore mais d'autre part, il gêne la décomposition de la matière organique et donc la production de COD.

IV-7. Les cycles d'humidité et de sécheresse

Les cycles d'humidité et de sécheresse ont été identifiés comme ayant une influence majeure dans la production de COD car ils rendent possible l'aération de zones normalement saturées en eau et ainsi la décomposition de la matière organique, mais aussi l'activité de la phénoloxydase enzyme, inhibée en condition anaérobie (FREEMAN et al. 2001).

Plusieurs études sur le terrain ont mis en évidence une augmentation du COD dans les différents horizons lors d'une réhumidification après une période de sécheresse (WILSON et al. 2008). La période de sécheresse est souvent accompagnée d'une diminution du COD notamment dans les eaux de tourbières (CLARK et al. 2005). Cette augmentation du COD observée annuellement entre le début du printemps et la fin de l'été (WILSON et al. 2007 ; FRÖBERG et al. 2006) correspond effectivement à une période de réhumidification.

L'influence de la sécheresse sur le COD serait plus prononcée dans les horizons superficiels. LUNDQUIST et al. 1999 montrent que c'est l'horizon supérieur qui est le plus sensible à la sécheresse. Ceci peut être expliqué par le fait que la décomposition de la matière organique est dépendante de l'humidité du sol (KALBITZ et al. 2000). La réponse du COD à la sécheresse dépend donc des conditions initiales d'humidité du sol, et ce sont les horizons supérieurs qui sont les plus touchés par la variation d'humidité.

ZSOLNAY et GÖRLITZ (1994) remarquent que la concentration en COD après réhumidification est plus élevée dans les sols qui ont été exposés à une grande sécheresse.

Cependant, les travaux de FRÖBERG n'ont pas permis de montrer que l'humidité ne semble pas avoir d'impact sur l'horizon O. L'horizon B quant à lui, a une teneur en COD plus élevée en période humide.

La caractérisation de la matière organique hydrosoluble des horizons profonds des sols n'est pas simple. De nombreux paramètres entrent en jeu dans la détermination qualitative et quantitative que ce soit le type de sol, la méthode d'extraction, le mode d'occupation ou bien tous les paramètres détaillés dans la partie IV de ce chapitre. Il est donc nécessaire d'avoir comme point d'appui des références sur la composition de la matière organique hydrosoluble dans les horizons profonds, difficilement trouvables dans le domaine des sols au vu des faibles concentrations en COD dans les horizons profonds.

C'est pourquoi le domaine des eaux offre un point de comparaison non négligeable. En effet, la matière organique des eaux de surface est connue pour provenir du lessivage de l'horizon de surface des sols, des débris végétaux et animaux. On pourrait donc supposer que la matière organique retrouvée dans les eaux souterraines pourrait provenir de la percolation de l'eau dans les horizons profonds, et donc être de nature comparable.

Il est donc nécessaire de montrer quelques résultats de la caractérisation de la matière organique des eaux souterraines parmi la multitude de travaux existants.

V. Origine et quantité de la MO dans les eaux souterraines

Peu de travaux existent sur l'origine et la quantité de matière organique soluble des sols dans les horizons profonds (> 105 cm). La plupart des études portent sur l'horizon labourable (0-30 cm) beaucoup plus riche en carbone soluble permettant une plus grande facilité d'extraction et d'analyse. Il est donc difficile d'avoir des points de repère afin de comparer les résultats obtenus à des résultats déjà publiés. C'est pourquoi, il semble judicieux de comparer le carbone soluble des horizons profonds des sols à celui des eaux souterraines qui semble avoir des quantités et des qualités en carbone assez similaire.

La matière organique des eaux souterraines fait l'objet d'une multitude de travaux. Parmi ces travaux, on peut tout d'abord citer l'étude réalisée par KHAN et al. en 2007 sur la caractérisation et la dynamique de la matière organique fluorescente d'eaux souterraines, de rivières et de lacs. Les eaux collectées ont fait l'objet d'analyses en carbone et en spectrofluorescence 3D permettant de déterminer la matrice d'excitation- émission (EEM). Quelques résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 1.10.

Tableau 1.10 : Résultats COD et fluorescence obtenus par KHAN et al. en 2007 sur quelques sites (rivières, eaux souterraines et lacs).

Echantillons (Japon)	pH	COD ($\mu\text{M C}$)	Pic C (Ex/Em = nm)	Pic M (Ex/Em = nm)	Pic A (Ex/Em = nm)	Pic T (Ex/Em = nm)
Aotsuchi (rivière)	8,0	51	330/429	nd	260/458	nd
Shikawa (rivière)	7,6	113	340/432	nd	240/413	280/369
Kito (eau souterraine)	7,0	50	330/431	nd	260/438	280/370
Endo (eau souterraine)	7,0	98	305/424	nd	260/427	nd
Lac Biwa (2,5 m)	7,7	94	350/445	305/429	250/433	285/357
Lac Biwa (40 m)	7,7	92	355/446	305/429	255/435	280/348

Les concentrations en COD obtenues par KHAN et al. (2007) sont distribuées de manière irrégulière dans les eaux souterraines et varient de façon importante entre les sites d'échantillonnages. Cependant, ils remarquent une augmentation de la concentration en COD d'amont en aval, en particulier pour l'eau souterraine.

En fluorescence, l'acide fulvique (pic C) des eaux souterraines et de rivières est différent de celui observé dans l'eau du lac qui subit d'importantes radiations solaire modifiant le pic C en pic M de forte intensité et un pic C de plus faible intensité. Ce pic M se situant dans les faibles longueurs d'ondes (décalage vers le bleu) et le pic C vers les plus hautes longueurs d'ondes (décalage vers le rouge). La longueur d'onde d'émission du pic T attribuable aux protéines, semble montrer un décalage vers le bleu dans les eaux de rivière par rapport aux eaux souterraines.

KHAN et al. (2007) montrent également qu'il existe une relation linéaire entre les concentrations en COD et l'intensité de fluorescence des pics C, A et T dans les eaux souterraines et de rivière, ce qui suggère que la matière organique dissoute fluorescente représente une part importante de la matière organique dissoute.

Enfin, le pic de fluorescence de type C dans l'eau de rivière a une intensité deux fois plus importante que dans celle de l'eau souterraine et trois fois par rapport à celle du lac. Ce fluorophore

C des eaux souterraines semble plus sensible à la dégradation chimique et au processus microbien par rapport au fluorophore A.

D'autres travaux sur les eaux souterraines peuvent être cités, en particulier ceux de GONI et GARDNER en 2003 qui étudient l'impact des saisons sur la concentration en carbone organique dissous dans des aquifères côtiers recouverts de forêt. Dans le cadre de cette étude GONI et GARDNER ont échantillonné les eaux souterraines ainsi que les eaux de surface sur deux années (1998 et 1999). Des analyses en COD ont été effectuées. Les résultats obtenus montrent une faible salinité aux alentours de 2 ppt pour les eaux souterraines. Cette salinité varie en fonction de la zone géographique et de la saison (en automne 2-10 ppt et en été 1-2 ppt). Les concentrations en COD des eaux souterraines sont faibles, elles varient de 6 à plus de 120 mg/L. Les concentrations les plus élevées (> 50mg/L) sont rencontrées dans les régions recouvertes par des forêts et les concentrations les plus faibles (< 10mg/L) dans les régions recouvertes par les marais. Ces concentrations diminuent de manière progressive et significative quand on s'éloigne des zones forestières pour aller vers les zones marécageuses.

De nombreux auteurs mettent les concentrations en COD en relation avec la salinité des eaux souterraines et des eaux de surface. Selon BOYLE et al. (1974), la salinité pourrait être un bon indicateur des concentrations en COD dans les aquifères. En effet, GONI et GARDNER montrent une forte diminution du COD avec les faibles salinités. La figure 1.12 montre la relation mise en avant par GONI et GARDNER entre le COD et la salinité.

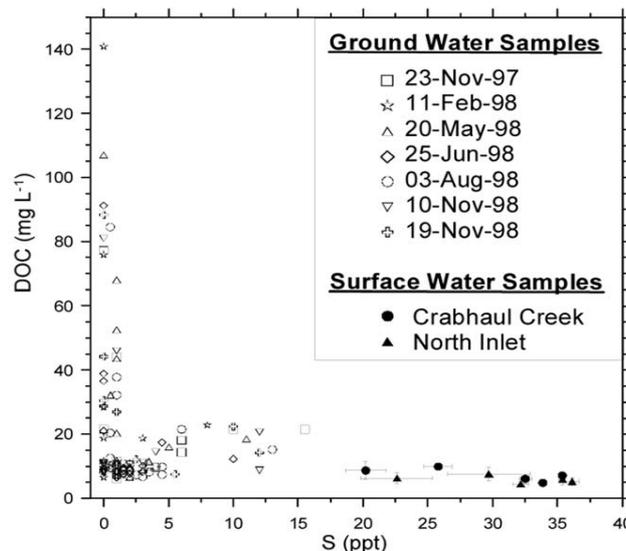


Figure 1.12 : Relation entre le COD et la salinité de différents échantillons (eaux de surface et eaux souterraines) (GONI et GARDNER, 2003)

Enfin, parmi tous les travaux sur la matière organique des eaux souterraines, on peut citer les travaux d'ARTINGER et al. en 2000 sur la caractérisation des substances humiques des eaux souterraines. Plusieurs paramètres ont été mesurés sur ses échantillons : le pH, la conductivité, les différents ions présents, les concentrations en COD, en acides humiques et fulviques (tableau 1.11). En plus de tous ces paramètres, des mesures en fluorescence (Ex = 340 nm) et en carbone 14 ont été effectuées.

Tableau 1.11 : Paramètres des échantillons étudiés par ARTINGER et al. 2000

Echantillons	Profondeur (m)	Température (°C)	pH	Conductivité (mS/cm)	COD (mgC/L)	AH (mgC/L)	AF (mgC/L)
Gorleben	15-18	9,6	6,4	0,13	0,5	0,009	0,14
Gorleben	21-24	8,9	8,4	0,20	1,4	0,11	0,46
Munich	0,5-23	9,3	7,2	0,63	0,6	-	0,12
Munich	2-7	9,0	7,3	0,67	0,7	-	0,12
Fuhrberg	1,3	9,4	4,3	0,24	6,1	-	1,3
Fuhrberg	14	10,0	6,0	0,51	9,8		1,8

Outre l'aquifère de Gorleben, dans la plupart des autres aquifères le COD est composé de 10 à 40 % d'acide fulvique, le reste étant constitué de composés hydrophiles. Les concentrations élevées en COD dans l'aquifère du Fuhrberg sont attribuées à des différences dans le sol et aux conditions de végétation y compris les activités agricoles.

Les acides humiques et fulviques des différents aquifères montrent des propriétés et des caractéristiques différentes. Ces différences selon ARTINGER et al. (2000) semblent dépendre de la source des acides humiques et fulviques ainsi que des caractéristiques physico-chimiques et des conditions géologiques des eaux souterraines.

Au vue des travaux présentés ci-dessus (KHAN et al. 2007 ; GONI et GARDNER en 2003 ; ARTINGER et al. 2000), la composition et la quantité de la matière organique soluble dans les eaux souterraines dépendent d'une multitude de paramètres : la saison, la géologie des sols (argile), la couverture des sols (forêt, prairie, désert). Ces conclusions peuvent être appliquées au sol si l'on considère les eaux souterraines comparables aux carbones solubles des horizons profonds.

VI. Caractérisation directe ou après purification de la MO soluble

VI-1. Résonance magnétique nucléaire (RMN ^{13}C)

La RMN du ^{13}C permet d'avoir des informations qualitatives sur la structure du carbone organique. Les spectres de RMN du ^{13}C du solide sont composés de bandes caractéristiques répertoriées dans le tableau 1.12 (WILSON et al. 1987).

Tableau 1.12 : Principales bandes en RMN ^{13}C (WILSON et al. 1987)

Groupements chimiques	Types de composés	Déplacement chimique (ppm)
C-H	Carbone aliphatique	0-55
C-N	Amines, amides, protéines	40-55
O-CH ₃	Groupes méthoxy des lignines et tanin	55-60
C-O	Alcools aliphatiques, éthers, esters	60-90
O-C-O	Carbone anomérique des sucres, lactols	90-110
φ	Carbone aromatique	95-165
Φ-O	Esters aromatiques, éthers, phénols	135-165
O=C-O ; O=C-N	Acides carboxyliques, esters, amides	160-190
O=C-C=C	Flavones, quinones	170-200
O=C-C	Cétones aliphatiques et aromatiques	190-220

Plusieurs travaux utilisent la technique de RMN du ^{13}C pour la caractérisation de la matière organique des sols.

On peut citer les travaux de FROBERG et al. (2003) qui étudient les sous-horizons Oi, Oe et Oa d'un sol forestier. L'objectif était de comprendre le rôle de la matière organique présent dans les trois sous-horizons dans la lixiviation de la matière organique dissoute de l'horizon O. Cette compréhension passe par une étude sur des solutions récupérées au niveau de plaques lysimétriques, de solutions de sol extraites à l'eau et du sol. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 1.13.

Tableau 1.13 : Intensité relative en % obtenus en RMN ^{13}C sur les trois solutions (FROBERG et al. 2003)

Groupements	Sol	Sol	Sol	Ext Oi	Ext Oa	Ext Oe	Lys Oe	Lys Oa
	Oi	Oe	Oa					
Carbonyle (160-220 ppm)	7,7	10,0	13,2	13,5	12,6	11,1	14,8	15,1
Aromatique (110-160 ppm)	18,5	19,7	23,0	15,6	11,3	9,1	16,4	16,0
O-Alkyle (45-110 ppm)	52,8	47,2	40,6	47,4	54,6	56,2	43,3	44,4
Alkyle (10-45 ppm)	21,0	23,0	23,1	23,5	21,5	23,5	25,4	24,4

Les résultats montrent la présence de pic majoritaire des O-alkyl entre 50 et 90 ppm notamment vers 73 ppm caractéristique d'hydrates de carbone. De plus, avec l'augmentation de la profondeur des horizons, l'intensité de la bande O-alkyl diminue, indiquant une augmentation du degré d'aromaticité de la matière organique en profondeur. A l'inverse, une augmentation est observée avec la profondeur pour les groupements carboxyles vers 160-185 ppm et pour les groupements aldéhydes et cétones vers 185-220 ppm. Cependant, et contrairement aux échantillons de sol, l'intensité des O-alkyl augmente et l'aromaticité diminue avec la profondeur dans les échantillons obtenus par extraction à l'eau.

Les travaux de NIEROP et BUURMAN, (1999) ont également utilisé la RMN ^{13}C sur des échantillons obtenus par trois extractions : une fraction hydrosoluble, une fraction sodique et une fraction humine. Les attributions des pics dans ces travaux sont basés sur les données de NIMZ, 1981; HATCHER 1987; KOGEL et al. 1988; WILSON et HATCHER 1988; KOGEL-KNABNER, 1997 et PRESTON, 1992. Les spectres obtenus montrent que le pic caractéristique du carbone O-alkyl domine le spectre de la fraction hydrosoluble. La fraction hydrosoluble est composée de nombreux pics (72, 74, 80 et 83 ppm) attribuables aux carbones C2, C3, C4 et C5 des unités sucres, mais aussi d'un pic à 106 ppm pouvant être dû aux tannins (WILSON et HATCHER, 1988).

Les spectres des fractions sodiques et humine ont également ces pics mais de façon moins abondante. La fraction sodique est composée en majorité des pics aromatiques (115, 130, 148 et 152 ppm) avec des groupements OH et O-méthyl (148 ppm) mais aussi méthoxy (152 ppm). Les autres pics : aldéhydes et cétones (197 ppm), acides carboxyliques et amides (173 ppm) sont plus intenses que dans les fractions hydrosolubles et humine. La fraction humine possède le signal le plus important aux alentours des 30 ppm correspondant au C-alkyl et attribué aux groupements méthylène.

Enfin, on peut noter les travaux de GONZALEZ PEREZ et al. (2004) qui étudient les acides humiques d'un sol tropical soumis à différents modes d'occupation par RMN ^{13}C . Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 1.14.

Tableau 1.14 : Distribution du carbone dans les différents modes d'occupation ainsi que le degré d'aromaticité (GONZALEZ PEREZ et al. 2004) (CT : labourage conventionnel ; NT : non labouré et NC : non cultivé)

Echantillons	Répartition (%) en RMN ^{13}C des différentes régions indiquées								Aliphatique (%)	Aromatique (%)
	0-45 (ppm)	45-65	65-90	90-110	110-143	143-160	160-188	188-230		
CT1	21	16	14	7	19	7	11	6	70	30
CT2	22	16	14	7	17	8	11	6	70	30
NT1	21	16	14	7	19	7	10	6	70	30
NT2	21	16	14	7	18	7	11	6	70	30
NT3	21	17	14	7	18	7	10	6	71	29
NC	26	16	15	7	14	6	11	5	76	24

Pour tous les modes d'occupation, l'intensité relative associée au carbone aliphatique (0-110 ppm) est plus élevée que celle déterminée dans la région 110-160 ppm correspondant au carbone aromatique, indiquant un plus grand caractère aliphatique des échantillons. Le signal des C-méthoxyl apparaît vers 56 ppm et chevauche celui des N-alkyl compris dans la région entre 46 et 67 ppm (KNICKER, 2000). Le degré d'aromaticité des échantillons est similaire pour pratiquement tous les échantillons (30%) malgré une légère diminution dans l'horizon non cultivé (pas de labourage).

VI-2. Pyrolyse-MS (Spectrométrie de Masse)

D'autres travaux utilisent la pyrolyse-GC/MS afin de caractériser les extraits de matière organique. On peut notamment présenter les travaux de SCHULTEN (1987) qui caractérise un échantillon d'acide humique extrait d'un horizon de surface. SCHULTEN (1987) montre que les pics m/z 60, 82, 96, 110 et 126 correspondent aux polysaccharides et que le pic m/z 92 est dû au toluène. Les composés azotés sont représentés par les pics m/z 79 correspondant à la pyridine, 92 correspondant au méthyle pyridine et 117 correspondant à l'indole. La présence de lignine dans

l'acide humique est indiquée par les pics m/z 212 correspondant à un monomère de la lignine et les pics m/z 302 et 344 à un dimère de la lignine. Les pics m/z 310 et 386 correspondent respectivement au méthoxyphénol et à l'alkyl-phénol.

Les travaux de NIEROP et BUURMAN, (1999) ont également utilisé des analyses en pyrolyse GC/MS pour compléter les analyses en RMN ^{13}C afin d'étudier l'influence de la végétation sur la matière organique soluble présente dans le sol. L'horizon considéré est l'horizon H. Les spectres des fractions hydrosolubles, sodiques et l'humine sont présentés dans la figure 1.13. Les résultats montrent une augmentation de l'abondance relative des polysaccharides de la fraction humine en passant par la fraction sodique et la fraction hydrosoluble. La figure 1.14 zoom sur la partie phénolique du spectre.

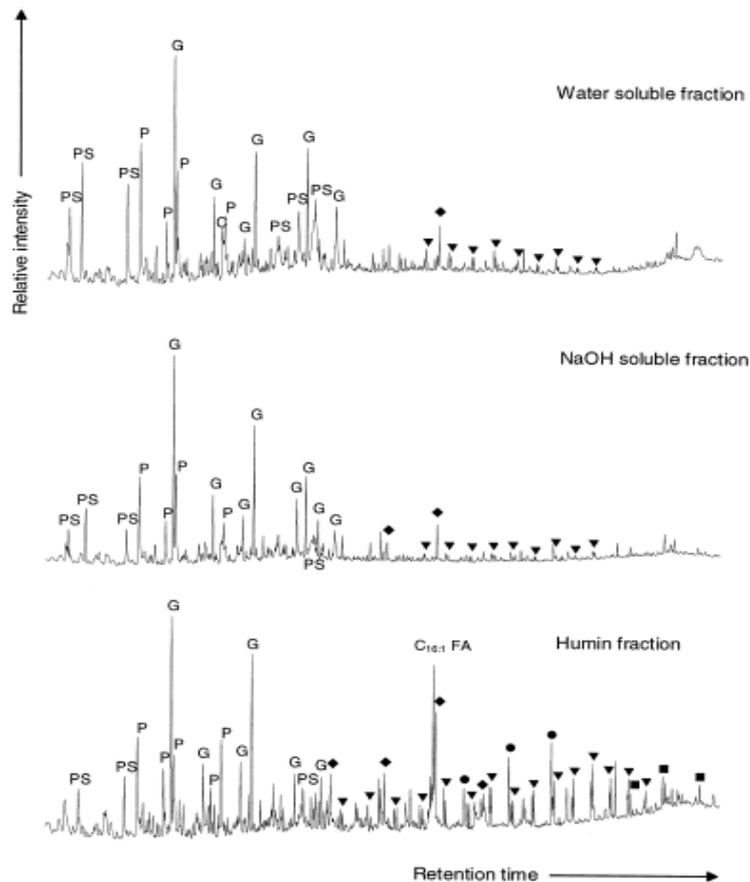


Figure 1.13 : Spectres partiels de pyrolyse-MS des trois fractions extraites du profil B (NIEROP et al. 1999). PS : polysaccharides ; P : alkylphenol ; G : guaiacol ; ◆ : méthylcétone ; ▼ : alcènes/alcane ; ● : alcools.

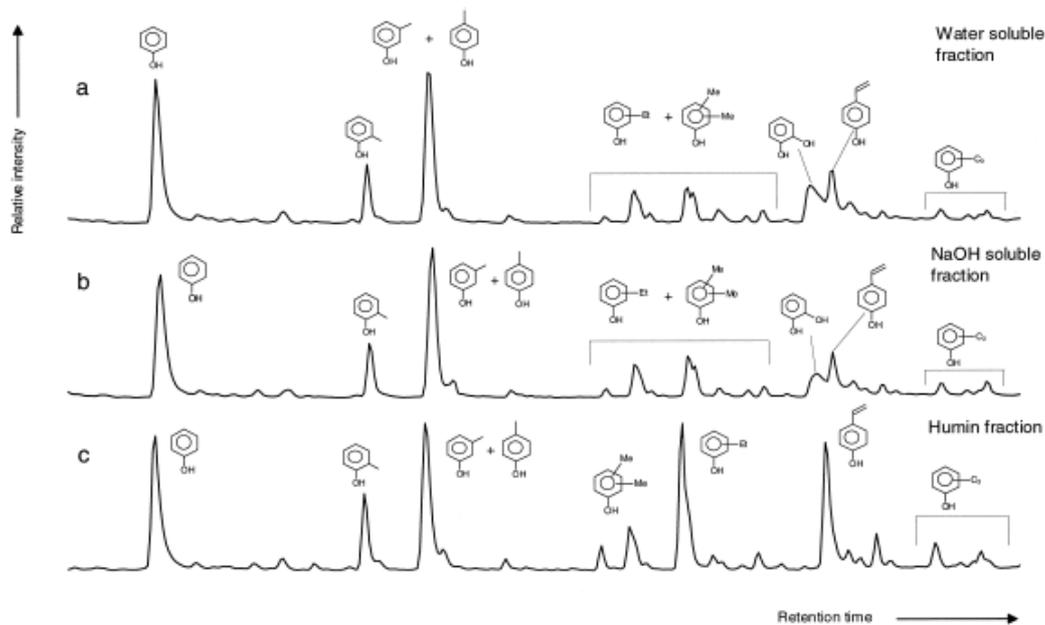


Figure 1.14 : Spectres partiels de pyrolyse-MS des trois fractions extraites du profil B (Zoom sur la partie alkylphénol) (NIEROP et al. 1999). (a) : fraction hydrosoluble ; (b) : fraction NaOH soluble ; (c) : fraction humine

Le phénol et les trois isomères du méthylphénol ortho, méta et para sont les composés les plus importants dans la fraction hydrosoluble. Les éthyl-, diméthyl- et vinyl- phénols sont beaucoup moins abondants et les carbones substitués sur le phénol sont très rares. Ces composés sont également présents dans la fraction sodique. La fraction Humine montre une distribution différente, les phénols C2 et C3 sont très abondants particulièrement l'éthylphénols et le vinylphénols. Les alkylphénols peuvent avoir plusieurs origines comme la lignine et les tannins (VAN DER HEIJDEN, 1994; TEGELAAR et al. 1995). Le spectre partiel des méthoxyphénols est représenté figure 1.15 pour les trois fractions.

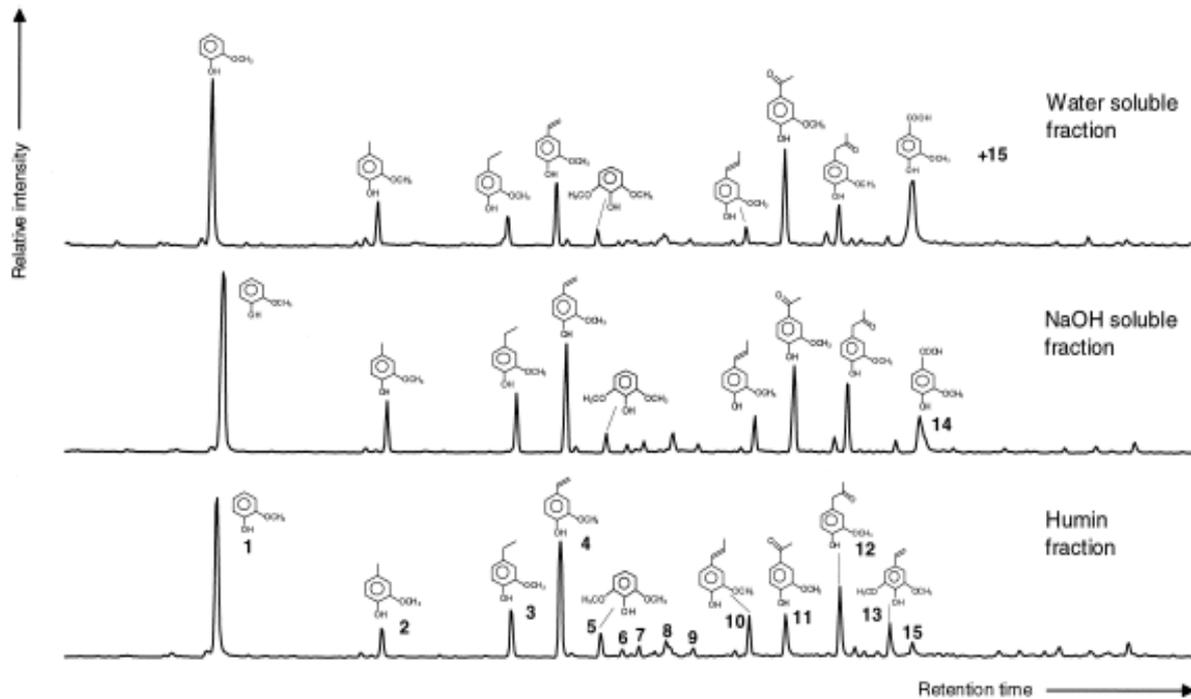


Figure 1.15 : Spectres partiels de pyrolyse-MS des trois fractions extraites du profil B (Zoom sur la partie méthoxyphénols) (NIEROP et al. 1999)

Dans les trois pyro-chromatogrammes, on voit apparaître des produits de la lignine. Dans la fraction soluble hydrosoluble, les pics prédominants sont : guaiacol (1) ; 4-methylguaiacol (2) ; 4-vinylguaiacol (4) ; 4-acetylguaiacol (11) ; 4-propan-2-oneguaiacol (12) ; acid vanillique (14) et 4-propan-1-oneguaiacol (15). Les composés mineurs présents sont : 4-ethylguaiacol (3) ; eugenol (6) ; 4-propylguaiacol (7) ; vanilline (8) ; cis (9) et trans isoeugenol (10) et des petites traces de syringol (5).

La fraction sodique contient plus de 4-vinylguaiacol ; 4-ethylguaiacol ; eugenol ; cis et trans isoeugenol et 4-propan-2-oneguaiacol que la fraction hydrosoluble mais moins de vanilline, d'acide vanillique, et de 4-acetylguaiacol.

Enfin, pour la fraction humine, tous les dérivés oxydés de guaiacol sont moins abondants que dans la fraction sodique, tandis que les composés 5 et 13 sont plus abondants. Par rapport aux alkylphénols, les méthoxyphénols sont plus abondants dans la fraction hydrosoluble puis dans la fraction sodique et enfin dans la fraction humine.

La biodégradation de la lignine conduit à l'oxydation et à la rupture des groupements propanoïdes, notamment des carbonés α et β (SAIZ-JIMENEZ et DE LEEUW, 1984). Si on observe le 4-acetylguaiacol, l'acide vanillique et le 4-propan-1-oneguaiacol, on peut suggérer que la fraction hydrosoluble a un degré d'humification plus élevé.

Les composés aliphatiques tels que les acides gras, les alcènes et les alcanes sont présents dans la fraction hydrosoluble dans des proportions très faibles. Dans la fraction sodique, l'abondance des composés aliphatiques est encore plus faible.

VI-3. Spectrofluorimétrie

Une large fraction des MO fluoresce : les matières humiques mais également les acides aminés aromatiques. Différents types de fluorophores peuvent être mis en évidence par la technique de fluorescence « synchrone », consistant à balayer simultanément les longueurs d'excitation et d'émission.

L'absorption d'un photon par une molécule entraîne une transition électronique de l'état fondamental à une énergie plus élevée (état excité). Cette transition s'accompagne de l'émission d'un photon moins énergétique. L'intensité du rayonnement fluoresçant est proportionnelle à la concentration en molécules dans l'échantillon (MAUCHIEN et al. 1990). Le spectre d'émission de fluorescence varie suivant la nature de la matière organique. En effet, une augmentation de la masse moléculaire entraîne un déplacement du maximum d'intensité vers des longueurs d'ondes élevées (vers le rouge). Ainsi les acides humiques à structure aromatique de haute masse moléculaire fluorescent plutôt dans les fortes longueurs d'onde alors que les acides hydrophiles à caractère aliphatique marqué fluorescent vers le bleu.

Plusieurs travaux caractérisent la matière organique par des techniques fluorimétriques. On peut relever les travaux de OHNO et al. (2004) qui déterminent l'indice d'humification (HIX) par analyse spectrofluorimétrique sur des échantillons de sol extraits à l'eau ultra pure. Cet indice d'humification (HIX) correspond au rapport de la somme des intensités de fluorescence entre 435 et 480 nm sur les intensités de fluorescence entre 300 et 345 nm. OHNO et al. (2004) obtiennent des valeurs de HIX variant entre 5 et 7. Une augmentation du degré d'humification montre un changement de la matière organique, avec une augmentation des groupements carboxyles et des fonctions contenant de l'azote.

Ensuite des études ont été menées par CORVASCE et al. (2006) sur la matière organique des horizons profonds et de surfaces extraits par CaCl_2 . L'indice d'humification et l'indice d'aromaticité diminuent en profondeur alors que le rapport 406/413 nm augmente. Ce résultat montre une diminution progressive de la taille des molécules et une augmentation de la complexité structurale en profondeur. Sur le spectre 3D de fluorescence, trois fluorophores sont visibles : (1) $250_{\text{ex}}/260\text{-}410_{\text{em}}$; (2) $300\text{-}320_{\text{ex}}/340\text{-}410_{\text{em}}$; (3) $270_{\text{ex}}/300_{\text{em}}$. Le (1) représente des composés

simples dérivés du matériau des protéines (BAKER et GENTY, 1999). Le (2) correspond à des structures simples du type phénolique, dérivés d'acide cinnamique, alcaloïdes comme l'hydroxyquinoline (SENESI et al. 1991). Enfin, le (3) est typique des amino-acides aromatiques (BLASER et al. 1999)

MICHEL et LUDWIG, (2005) ont proposé une étude sur la matière organique soluble de l'horizon Oa dans des sols forestiers situés. L'indice d'humification (HIX_{syn}) est calculé en divisant l'intensité de la plus grande longueur d'onde par celle de la plus courte longueur d'onde (KALBITZ et al. 1999). Puis, un indice d'humification d'émission est calculé (HIX_{em}) en divisant la zone de crête entre 435 et 480 nm et la zone entre 300 et 345 nm (ZSOLNAY et al. 1999). Les résultats obtenus pour les différents types de sols sont regroupés dans la figure 1.16.

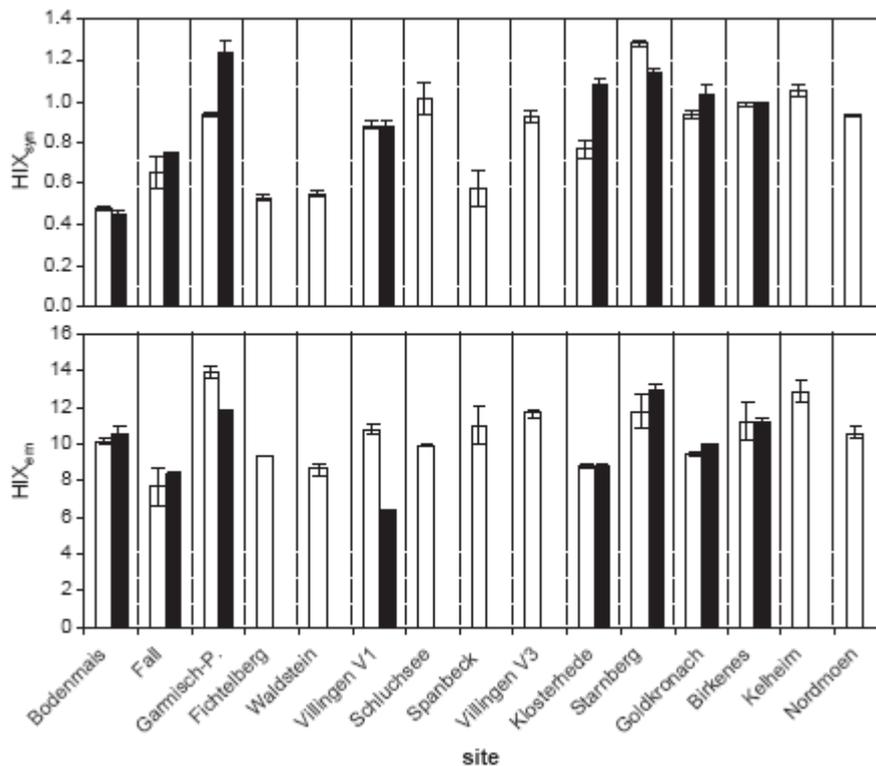


Figure 1.16 : Indices d'humification synchrone (HIX_{syn}) et d'émission (HIX_{em}) obtenus sur les différents sites (MICHEL et LUDWIG, 2005).

Tous les échantillons ont montré le même modèle de fluorescence que ce soit avec le spectre synchrone ou d'émission. Les indices d'humification synchrone et d'émission s'étendent respectivement entre 0.48 et 1.28 et entre 7.7 et 13.9. L'indice d'humification synchrone contrairement à celui d'émission, a tendance à augmenter avec la présence de carbone aromatique.

Ensuite on peut noter les travaux de BANAITIS et al. (2006) sur un sol forestier qui étudient par spectrofluorimétrie, la composition chimique de la matière organique ainsi que les adsorptions préférentielles des molécules de haute masse moléculaire issues de la matière organique sur les surfaces minérales. La matière organique des sols forestiers joue un rôle important dans la biodisponibilité des nutriments du sol ainsi que dans la solubilisation des métaux. JARDINE et al. (1989) ; WANG et al. (1995) ; CHOROVER et AMISTADI, (2001) ; HUR et SCHLAUTMAN, (2004) ont montré que les composés à haute masse moléculaire des substances humiques, de la matière organique naturelle et de la matière organique dissoute s'adsorbaient de préférence sur les oxy-hydroxydes métalliques. L'adsorption de la matière organique dissoute sur des surfaces minérales est un facteur important de la séquestration du carbone du sol. Le phénomène d'adsorption implique des interactions entre la surface des groupements métalliques et les fonctions acides de la matière organique dissoute. Cela suggère que l'adsorption est sensible aux propriétés chimiques de la matière organique dissoute ainsi qu'aux propriétés de la surface minérale (KAISER et GUGGENBERGER, 2000).

La matière organique soluble est extraite de l'horizon O, le profil étudié est recouvert de sapins, de pins et de chênes. L'étude du mécanisme d'adsorption de la matière organique hydrosoluble sur les minéraux est réalisée en présence de goethite et de gibbsite. Le pH de cette solution initiale est ajusté à 5.5. La concentration en carbone soluble est déterminée par mesure avec un analyseur de carbone et la quantité adsorbée est mesurée par différence.

L'indice d'humification est obtenu en divisant l'intensité de fluorescence entre 435-480 nm avec l'intensité entre 300-345 nm à une longueur d'onde d'excitation de 254 nm. Cet indice permet de déterminer le stade d'humification et l'aromaticité de la matière organique dissoute. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 1.15.

Tableau 1.15 : Poids moléculaire (MW) et indice d’humification (HIX) de la matière organique dissoute (BANAITIS et al. 2006). O-Hardwood : horizon O avec du bois durs (Chênes) ; O-Softwood : horizon O avec dur bois tendres (sapins et pins).

Traitements/Matériels	MW (g/mol)	HIX
Pré-sorption		
O-Hardwood	397	4,04
O-Softwood	421	3,69
Chêne	123	0,66
Pin	131	0,44
Sapin	72	0,48
Post-goethite		
O-Hardwood	156	0,80
O-Softwood	146	0,74
Chêne	108	0,29
Pin	100	0,24
Sapin	60	0,43
Post-gibbsite		
O-Hardwood	118	0,74
O-Softwood	115	0,73
Chêne	97	0,31
Pin	81	0,28
Sapin	46	0,44

Le poids moléculaire moyen trouvé pour l’horizon O est de 410g/mol, la valeur moyenne de l’indice d’humification pour l’horizon O est de 3,8. Cette valeur est similaire à celle obtenue dans un sol minéral. Les valeurs obtenues pour l’horizon O ainsi que pour les différents tissus végétaux non étudiés ici, montrent bien que la matière organique des sols est issue des tissus végétaux car elle est beaucoup plus humifiée que celle contenue dans les feuilles des arbres.

Le tableau 1.15 et la figure 1.17 montrent le phénomène d’adsorption de la matière organique dissoute sur la goethite et la gibbsite pour l’horizon O. Le phénomène de sorption dépend de la nature de la matière organique dissoute. En effet, pour la matière organique de l’horizon qui présente un poids moléculaire et un HIX plus élevés, la sorption est beaucoup plus importante que pour la matière organique issue des feuilles de sapins, de pins et de chênes. Les deux minéraux,

goethite et gibbsite ont une préférence d'adsorption pour les molécules ayant un poids moléculaire plus élevé.

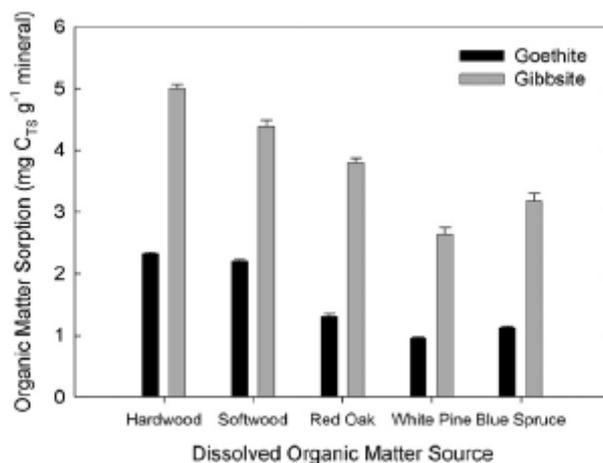


Figure 1.17 : Matière organique adsorbé sur la goethite et la gibbsite pour l'horizon O (Hardwood = chênes et softwood = pins et sapins) (BANAITIS et al. 2006).

Enfin, on peut citer les travaux de GONZALEZ PEREZ et al. (2004) qui complètent ces analyses en RMN ¹³C (V-1) par une étude en spectrofluorimétrie pour observer la corrélation entre l'aromaticité déterminée par RMN ¹³C et la réponse en fluorimétrie. Les analyses s'effectuent sur des solutions de concentration 200 mg/L en acides humiques. Les conditions d'utilisation sont les suivantes : longueur d'onde d'excitation 436 nm, région spectrale entre 450-650 nm, le degré d'humification est mesuré en calculant la surface totale sous le spectre centré à 520 nm (MILORI et al. 2002). Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 1.18.

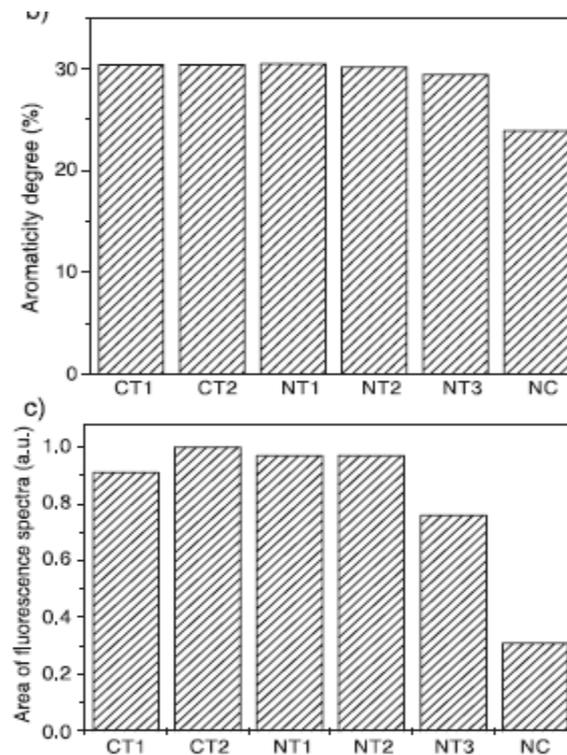


Figure 1.18 : Comparaison du degré d'aromaticité avec l'indice d'humification (GONZALES PEREZ et al. 2004).

Tous les spectres de fluorescence étaient semblables présentant une large bande entre 480 et 600 nm, les résultats obtenus montrent une corrélation importante entre le degré d'aromaticité et l'indice d'humification.

VI-4. Chromatographie d'exclusion haute performance (SEC)

Cette technique analytique est très peu utilisée dans le domaine des sols. Cependant pour caractériser la fraction hydrosoluble de la matière organique des sols, elle sera d'une aide précieuse. Une analogie avec les eaux naturelles sera donc faite pour caractériser le COD des horizons profonds.

Dans le domaine des eaux, les matières organiques dissoutes englobent des structures qui entrent dans une gamme de masses moléculaires très étendue. La chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC pour High Performance Size Exclusion Chromatography) est une méthode de fractionnement basée sur la taille des molécules. Le principe est simple, plus les molécules sont grosses plus elles sont exclues de la porosité du gel, plus leur temps de rétention est faible. Les travaux de HUBER et FRIMMEL (1991) ont conduit au développement d'un système analytique couplant à la technique de séparation HPSEC deux détecteurs en série : un photomètre UV et un

analyseur de carbone (couplage HPSEC/UV/COD). Comparativement à la méthode plus classiquement employée et utilisant un seul détecteur UV (CHIN et al. 1994), cette approche permet une analyse plus globale de la matrice organique puisque certaines structures n'incorporent pas de chromophores qui absorbent les rayonnements UV (i.e., polysaccharides, acides aminés non aromatiques, acides aliphatiques).

FRIMMEL et ABBT-BRAUN (1999) distinguent jusqu'à 6 fractions dans un chromatogramme d'eau naturelle (Figure 1.19). Ces fractions correspondent (i) aux substances humiques (molécules hydrophobes à caractère aromatique) qui représentent la fraction majoritaire des MON (fraction 1), (ii) aux acides organiques aliphatiques associés aux matières humiques (fraction 2), (iii) aux acides organiques aliphatiques de faibles masses moléculaires (fraction 3), (iv) aux composés neutres présentant une forte affinité avec la phase stationnaire de la colonne, soit des acides aminés, des sucres aminés et des protéines de faibles masses moléculaires (fraction 4), (v) aux composés de hautes masses moléculaires (faible temps de rétention) à fort caractère aliphatique (pas de réponse en UV), essentiellement des polysaccharides et des résidus de parois bactériennes (polymères de sucres aminés et protéines) (fraction 5), (vi) aux espèces inorganiques ne présentant aucune affinité avec le gel de la colonne, telles que des silicates ou des hydroxydes (fraction 6).

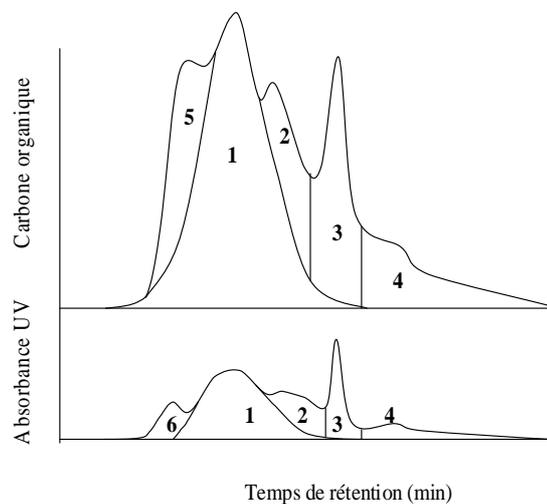


Figure 1.19 : Chromatogramme d'exclusion de taille

(D'après FRIMMEL et ABBT-BRAUN, 1999)

On peut également citer les travaux de ALBERTS et TAKACS en 2004 sur la caractérisation d'acides fulviques, humiques de sols et de matière organique naturelle de la rivière Suwannee à partir de la chromatographie d'exclusion de taille. Les échantillons étudiés sont des standards en acide fulviques et humiques isolé d'un sol de l'Illinois aux USA. Les analyses en

chromatographie d'exclusion de taille ont été effectuées avec une détection UV à 254 nm. Les résultats obtenus sont présentés figure 1.20.

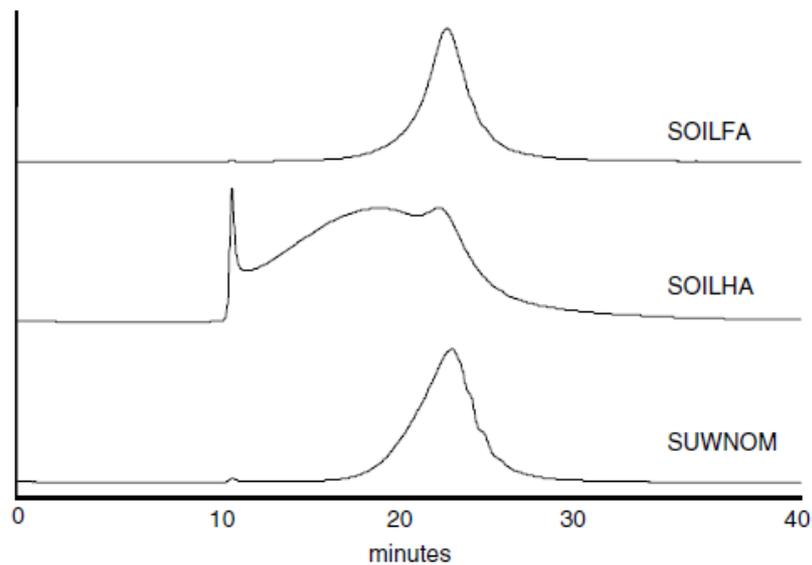


Figure 1.20 : Chromatogrammes HPSEC obtenus sur des échantillons d'acides fulviques et humiques de sol et de la rivière Suwannee (ALBERTS et TAKACS en 2004)

Les résultats en HPSEC obtenus par ALBERTS et TAKACS (2004) montrent que les échantillons d'acide fulvique (SOILFA) et de rivière (SUWNOM) sont de plus petite taille moléculaire que l'échantillon d'acide humique (SOILHA). De plus, l'échantillon SOILHA semble avoir une absorbance UV dans le domaine des molécules de haut poids moléculaire.

Des analyses complémentaires en fluorescence montrent que les échantillons SOILFA et SUWNOM possèdent des spectres 3D de fluorescence similaires avec deux fluorophores distincts (226/431 et 335/447 nm, et 224/432 et 335/443 nm) alors que l'échantillon SOILHA en possède trois (278/464, 278/505 et 459/513 nm)

VI-5. Spectrophotométrie (IR)

Dans le domaine des eaux, la spectrophotométrie infrarouge est utilisée pour identifier les groupes fonctionnels oxygénés et azotés de la matière organique naturelle (MON) (THURMAN 1985). Elle permet aussi la détection des espèces minérales et ainsi de contrôler la pureté des fractions de MON (CROUE et al. 1997). L'IR permet de montrer le caractère oxygéné des fractions transphiliques (XAD-4) et hydrophiles (bandes COOH, C-O) par rapport aux fractions hydrophobes (XAD-8). Ces dernières sont caractérisées par les bandes des groupements CH₂ et CH₃

respectivement 2940 et 2960 cm^{-1} . Les protéines peuvent également être identifiées par des bandes spécifiques des amides 1 et 2 à 1550 à 1660 cm^{-1} . La présence de sucre peut être visible grâce aux bandes des liaisons C-O (1000-1100 cm^{-1}) et OH (3300-3400 cm^{-1}). Les espèces inorganiques sont aussi repérables notamment les bicarbonates, les sulfates et les nitrates (1288, 1176 et 617 cm^{-1}) (CROUE et al. 1997). Cependant le spectre IR ne donne pas beaucoup d'information sur la structure chimique du noyau des substances humiques.

Ensuite, il semble intéressant de remarquer les travaux de HURRASS et SCHAUMANN (2005), sur un horizon de surface (10-20 cm). Pour caractériser la structure de la matière organique des sols, des spectres IR ont été enregistrés. Les résultats obtenus montrent des bandes situées entre 2800 et 3030 cm^{-1} attribuées aux vibrations symétriques et asymétriques des liaisons aliphatiques C-H des groupements méthyles. Egalement des bandes correspondantes aux fonctions C=O des groupements carboxyliques (1600-1640 cm^{-1}) et des groupements carboxyles (1710 et 1740 cm^{-1}).

En plus, des analyses RMN et spectrofluorimétrique, GONZALES PEREZ et al. (2004) réalisent une analyse spectrophotométrique sur les mêmes échantillons. La figure 1.21 présente les spectres obtenus.

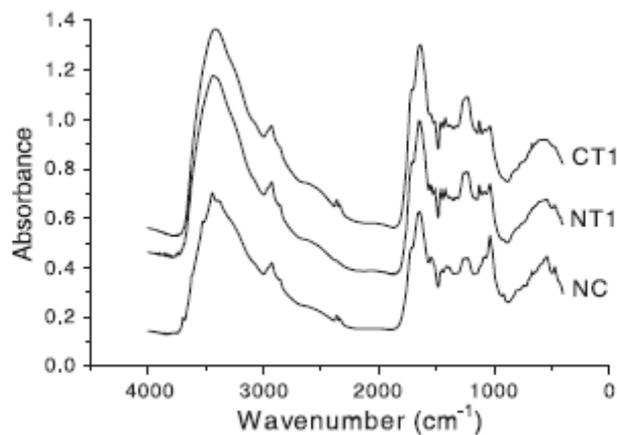


Figure 1.21 : Spectres IR d'acides humiques de trois échantillons isolés d'un sol tropical (GONZALES PEREZ et al, 2004).

L'interprétation des bandes d'absorption est basée sur les données de différents auteurs (BARANCIKOVA et al. 1997). La bande la plus importante, est celle située vers 3400 cm^{-1} associée aux groupements OH. La bande à 2933 cm^{-1} est due aux C-H aliphatiques, l'épaule à 1716 cm^{-1} est due à l'étirement de la liaison C=O des groupements COOH et cétones. Le pic à

1650 cm^{-1} est associé aux vibrations des liaisons C=C aromatiques, et à l'étirement antisymétrique du groupement COO-. Enfin la bande à 1230 cm^{-1} est due à l'étirement de la liaison C-O et à la fonction OH du groupement COOH. Les spectres des échantillons de sols avec et sans labourage conventionnel sont similaires. Pour l'échantillon non cultivé (NC), un pic pointu vers 1035 cm^{-1} est observable, attribuable aux vibrations de Si-O provenant des argiles. On remarque aussi la présence de petits pics vers 3697, 3662 et 3621 cm^{-1} , caractéristiques de la Kaolinite.

VI-6. Pyrolyse MSSV (Micro Scale Sealed Vessel)

La technique de pyrolyse MSSV est une méthode assez peu utilisée pour la caractérisation de la matière organique. Il existe cependant quelques études portant sur le sujet. On peut citer les travaux de BERWICK et al. en 2007 sur la libération thermique de l'azote organique de matière organique naturelle par pyrolyse MSSV.

Les échantillons étudiés sont constitués de différentes fractions de matière organique issue de plusieurs rivières (Gartempe, St Julien, Brittany), ainsi que quelques molécules modèles tels des peptides, des amino-sucres, des amino-acides et une bactérie (*Frateuria aurantia*).

Les fractions des rivières sont obtenues par percolation sur résine XAD et on obtient deux fractions principales HPO (hydrophobe) et TPH (transphillique) (CROUE et al. 1999). Pour la Gartempe la fraction HPO représente 53% du COD et la fraction TPH 16%.

Les résultats obtenus montrent que la pyrolyse MSSV de fractions de matières organiques naturelles donne une distribution complexe et variée de produit de pyrolyse qui comprend notamment des composés azotés organiques tels que les pyrroles, pyridines, pyrazines, indoles et carbazoles.

L'azote organique a été trouvé en plus grande proportion dans les fractions TPH et colloïdales de matières organiques naturelles. De plus la technique de pyrolyse MSSV a permis d'obtenir une plus grande abondance de composés organiques azotés par rapport à une pyrolyse flash.

On peut également citer des travaux de GREENWOOD et al. en 2006 qui étudient la libération de bio-marqueurs bactériens de matières organiques dissoutes par pyrolyse MSSV.

Ces travaux portent sur l'étude de fractions de matières organiques dissoutes issues de trois sources (lac, sol et rivière). Les résultats obtenus par GREENWOOD et al. en 2006, ont permis de mettre en évidence une bonne reproductibilité en pyrolyse MSSV avec des produits présentant une distribution similaire mais des qualités différentes ont été observées pour chacun des chromatogrammes. Les principaux produits observés sont des alkyl aromatiques de faible masse

moléculaire incluant les benzènes, des phénols, des naphthalènes et des phénanthrènes. Mais de nombreux autres produits sont mal résolus et restent difficiles à identifier.

VI-7. Analyse en C¹⁴ et δ C¹³

La datation au carbone 14 de la matière organique dans les sols a été utilisée pour étudier la chronologie de développement des sols (GOH et al. 1977 ; HAMMOND et al. 1991). Cependant, cette datation pose quelques problèmes car la matière organique des sols fait partie d'un processus en perpétuelle évolution (PERRIN et al. 1964 ; HAMMOND et al. 1991). En effet, l'âge apparent du pool de carbone organique des sols déduit par carbone 14 a été reconnu trop jeune en raison de la contamination apportée par l'introduction récente de carbone. De nombreux travaux existent sur la datation au carbone 14 de la matière organique des sols. Parmi ces travaux, on peut citer ceux de WANG et al. en 1995.

WANG et al. (1995) ont étudiés trois sols de différentes zones climatiques afin de révéler l'effet du climat sur la dynamique du carbone et sur l'âge au carbone 14 de la matière organique. Quelques propriétés de ces sols sont résumées dans le tableau 1.16.

Tableau 1.16 : Caractéristiques des sols étudiés par WANG et al. en 1995

Ecosystème du sol	Type de sol	Localisation	Végétation	Moyenne des températures annuelles (°C)	Moyenne des précipitations annuelles (°C)	Matériel parent	Age estimé
Forêt	Ultisol	Sierra Nevada, Californie	Conifères et forêt de feuillus	8,9	102,0	Granodiorite	
Prairie	Mollisol	Tama County Iowa	graminée	8,3	86,0	labouré	10000 ans
Désert	Aridisol	Barstow, Californie		19,4	12,7	Alluvion	Fin Pléistocène

Le tableau 1.17 montre les concentrations en carbone organique ainsi que les valeurs en carbone 14 obtenues par WANG et al. en 1995 sur différents horizons de leurs trois sols.

Tableau 1.17 : Concentrations en carbone organique et âge en ^{14}C des sols étudiés par WANG et al. en 1995

Type de sol	Localisation	Profondeur (cm)	C organique (10^{-4} moles/cm 3)	^{14}C (pMC)	Constante de stabilité k (10^{-4} an $^{-1}$)
Forêt	Sierra Nevada,	0-7,6	1,76	8,4	0,1148
	Californie	7,6-35,6	1,28	7,2	0,0963
Prairie	Tama County Iowa	0-16,5	37,08	87,5	8,7547
		16,5-27,9	21,92	82,1	5,6920
		27,9-41,9	19,25	65,3	2,3391
		41,9-50,8	10,50	60,8	1,9323
		50,8-63,5	8,33	51,2	1,3054
Désert	Barstow, Californie	63,5-73,7	5,00	45,8	1,0501
		0-23	14,67	95,3	25,0593
		23-51	6,42	88,7	9,7990
		51-69	5,08	76,1	3,9704

A partir des données du tableau 1.17 et des relations de STUIVER et POLACH en 1977, il a été possible pour WANG et al. de calculer l'âge de la matière organique des trois sols dans différents horizons, comme le montre la figure 1.24. Ces résultats montrent que (1) le pourcentage de carbone moderne diminue avec la profondeur, (2) l'âge de la matière organique du sol est toujours plus jeune que l'âge réel de la terre en raison d'un apport continu de matière organique fraîche, (3) l'état de stabilité qui est défini comme le temps minimum requis pour un horizon pour atteindre l'état d'équilibre augmente avec la profondeur. Une fois que l'horizon d'un sol est à l'état stable, l'âge du carbone 14 de la matière organique est constant et ne peut donc donner aucune indication de l'âge de la terre. L'âge de la matière organique varie beaucoup avec le climat, de moins de 5000 ans dans un milieu tempéré de la Californie à plus de 300000 ans dans un milieu aride du désert mais aussi avec la profondeur (figure 1.22). Le facteur le plus important sur la mesure de l'âge au carbone 14 de la matière organique des sols est le cycle de carbone organique dans les sols. Ce cycle est affecté par un nombre important de variables incluant le climat, les facteurs biologiques, des facteurs physiques et chimiques. Ces différents facteurs varient en fonction de la profondeur, de l'âge du sol et entre les différents écosystèmes (prairie, désert, forêt).

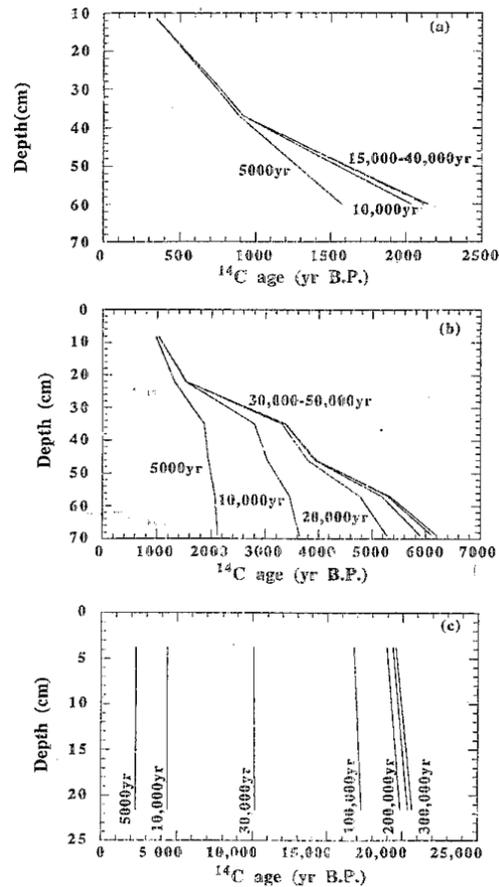


Figure 1.22 : Evolution de l'âge du carbone 14 de la matière organique des sols pour un sol forestier (a), une prairie (b) et un sol désertique (c).

VI-8. Analyse des monosaccharides

Les sucres représentent 50 % de la litière entrant dans le système sol (KOGEL-KNABNER, 2002). Ils sont des composés labiles qui sont généralement rapidement métabolisés par la biomasse microbienne des sols. Le dosage des sucres dans le sol s'effectue par hydrolyse acide suivi d'une dérivatisation des monosaccharides qui sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse.

L'hydrolyse des sucres non-cellulosiques dans les sols a été développée par SOWDEN et IVARSON, en 1962. A l'époque, ils utilisaient H_2SO_4 à froid. Plus récemment, l'hydrolyse des sucres non-cellulosiques a été proposée par de l'acide trifluoroacétique (TFA) à chaud (FENGEL et WEGENER, 1979). Les avantages du TFA sont que le rendement de ce procédé est supérieur à l'utilisation de H_2SO_4 et qu'il peut être évaporé directement (AMELUNG et al. 1996).

Les résultats obtenus en chromatographie en phase gazeuse permettent de déterminer l'origine des sucres présents dans l'échantillon. En effet, des travaux ont permis de mettre en place différents ratios, le ratio C_6/C_5 (mannose + galactose)/(xylose + arabinose) et le ratio déoxy/ C_5 (rhamnose + fucose)/(xylose + arabinose) (MURAYAMA, 1984 ; OADES, 1984). Des ratios inférieurs à 0,5 indiquent des hydrates de carbones dérivés de plantes alors que des ratios supérieurs à 2,0 indiquent une origine microbienne (GUGGENBERGER et ZECH, 1994).

Des travaux existent sur la détermination de l'origine des sucres dans les sols mais ils ne concernent que des sols forestiers du fait de leur importante concentration en carbone facilitant la recherche des sucres. Aucune donnée sur des sols agricoles pauvres en carbone n'est référencée. Parmi ces travaux sur les sols forestiers, on peut citer RUMPEL et DIGNAC en 2006 qui ont appliqué cette méthode de discrimination des sucres sur un sol forestier recouvert de feuillus. L'objectif de ces travaux est d'évaluer la méthode d'analyse sur des échantillons de sols contenant différentes concentrations en carbone, et de déterminer l'origine des sucres dans un sol de forêt. Le profil étudié est un cambisol dystrique composé de la litière (L et Of) de l'horizon humifié Oh et de plusieurs horizons minérales (Ah 0-5 cm ; Bv 5-24 cm ; SdBv1 24-50 cm ; SdBv2 50-80 cm et IIICv 85-115 cm). Les propriétés du sol étudiées sont répertoriées dans le tableau 1.18.

Tableau 1.18 : Caractéristiques des sols étudiés par RUMPEL et DIGNAC en 2006

Horizons	pH	C (g.kg ⁻¹)	N (g.kg ⁻¹)	Argile (g.kg ⁻¹)	Oxydes de fer totaux (g.kg ⁻¹)
L	4,7	444,5	18,1		
Of	4,5	412,1	27,6		
Oh	3,4	229,5	11,6		
Ah	3,2	82,6	4,4	140	1,6
Bv	3,7	9,8	5,4	120	2,9
SdBv1	4,0	3,0	2,3	110	1,6
SdBv2	4,0	1,4	0,1	100	1,2
IIICv	4,01	1,1	0,2	70	0,8

La plus forte concentration en sucre obtenue se situe autour de 110 g de sucre-C.kg⁻¹ C et a été trouvée dans la litière constituée de matériels végétales intacts. Cette concentration diminue

dans l'horizon humifié Oh. En accord avec la littérature (CHESHIRE, 1979 ; LARRE-LARROUY et FELLER, 1997 ; LARRE-LARROUY et al. 2004) le monomère le plus abondant est le glucose.

Dans la litière, on remarque une augmentation du ratio C6/C5 de L vers Oh indiquant la présence plus élevée dans l'horizon Oh de dérivés d'hydrates de carbone d'origine microbienne. Des résultats similaires ont été signalés par NIEROP et al. en 2001.

Dans les horizons du sol forestier, les concentrations en sucre variaient entre 58 et 102 g de sucre par kg de carbone. Cette concentration a augmenté avec un maximum pour l'horizon SdBv2. Des ratios plus élevés ont été trouvés dans le sol minéral par rapport à la couche de la litière. Or, plusieurs études ont montré que les dérivés des sucres d'origine microbienne pouvaient être stabilisés par les minéraux des sols (LARRE-LARROUY et al. 2003). Cette observation soutenue par les résultats de RUMPEL et DIGNAC (2006) indiquent une augmentation de la contribution microbienne dans l'origine des sucres dans un sol à horizon minérale, où le carbone organique a un long temps de séjour (RUMPEL et al. 2002). Le ratio C6/C5 diminue dans les horizons SdBv et IIICv par rapport à la surface indiquant l'augmentation de la contribution des plantes en profondeur, probablement du à des sucres dérivés des racines dans les horizons profonds.

Les sucres des sols forestiers peuvent donc par chromatographie en phase gaz, être correctement déterminés. De plus, l'origine des sucres par l'étude des différents ratios indique que la contribution microbienne sur les dérivés de sucre, augmente par rapport aux dérivés de plantes dans les sols minéraux avec un maximum dans l'horizon Bv.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

I. Contexte général et cadre du travail

L'étude discutée dans ce manuscrit a été réalisée dans le cadre de l'ORE - ACBB (Observatoire de Recherche Environnementale – Agroécosystème Cycle Biogéochimique et Biodiversité). Il s'agit d'un dispositif installé pour le long terme (>20 ans) afin de pouvoir capter les évolutions du système sol-végétation mais aussi les différentes rétro-actions qui les gouvernent. Deux sites expérimentaux ont été mis en place en 2005, à l'INRA de Lusignan et à l'INRA de Theix. Un troisième site est en cours d'installation à l'INRA de Mons en Chaussée. Cet ensemble, géré en réseau, permet d'analyser une gamme étendue de modes d'occupation des sols, depuis les prairies permanentes de semi altitude à Theix, jusqu'aux systèmes de cultures annuelles intensives du bassin parisien à Mons en Chaussée, en passant par les systèmes mixtes d'alternance prairies-cultures à Lusignan. L'objectif principal est centré sur la dynamique des matières organiques du sol (MOS) qui détermine l'évolution globale du système en tant que source principale d'énergie. Cette composante est caractérisée par une grande inertie, ce qui justifie d'autant les études sur le long terme. Il s'agit donc :

- De quantifier l'accumulation du carbone et sa séquestration dans le sol en fonction de différents modes de gestion.
- D'analyser la transformation, la translocation (le déplacement), et le temps de résidence des éléments dans les différentes composantes des MOS.
- De quantifier les flux internes de C et N entre les différents compartiments du système, MOS, plantes, microbes, faune du sol et leur couplage.
- De quantifier et modéliser les flux externes de C, N,... vers l'atmosphère et vers l'hydrosphère.
- D'évaluer la résilience du système sol-végétation en fonction de forçages appliqués sur le long terme.

L'originalité de cet ORE réside donc dans son cahier des charges qui permet de fournir à l'échelle de l'écosystème un nombre important de variables, couvrant ainsi les processus à court terme et à long terme. Cela permet également d'adopter une démarche intégrative combinant l'observation, l'expérimentation et la modélisation. Le caractère innovant de cet ORE au niveau national et international permettra de simuler l'évolution à long terme du système en interaction avec les scénarios de changement climatiques tels qu'ils peuvent être appréhendés aujourd'hui.

Les variables permettant de décrire les trajectoires d'évolution du système et d'aider à comprendre la dynamique des MOS implantées sur l'infrastructure de l'ORE ACBB sont :

- L'état hydrique du sol et la température qui conditionnent la dynamique des processus.
- L'état et les bilans minéraux du sol P, K, Ca, Mg...
- Les flux vers l'atmosphère (CO₂, H₂O, N₂O...), et vers l'hydrosphère (Nitrate, Carbone et Azote Organique Dissous, P, K, Ca, Mg et pesticides).
- La diversité floristique, microbienne et faunistique.
- La productivité primaire aérienne et souterraine.

Au total plus de 100 variables sont mesurées à des intervalles de temps allant de la minute au jour et de la saison à l'année.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont été réalisés sur le site de l'INRA de Lusignan situé au Sud-Ouest du département de la Vienne. Les prélèvements d'échantillons in situ et le suivi analytique ont été complétés par des expérimentations au laboratoire (Laboratoire de chimie et microbiologie de l'eau (LCME)).

I-1. Les Traitements expérimentaux du site de Lusignan

Pour faire évoluer de manière divergente les variables d'état du système, différentes modalités expérimentales ont été appliquées à partir du printemps 2005 sur des entités spatiales bien déterminées (parcelles expérimentales). Leur historique cultural a été suffisamment homogène et on a pu vérifier au cours de l'année 2003-2004 la variabilité spatiale initiale et sa structuration sur un certain nombre de variables du sol, de la végétation et de la microfaune. Les forçages anthropiques ont consisté à faire varier (Tableau 2.1):

Tableau 2.1 : Mode d’occupation des parcelles du site de l’ORE (rga : ray-grass)

1, 2, 3, 4, 5, 6 ... **années** → 20...

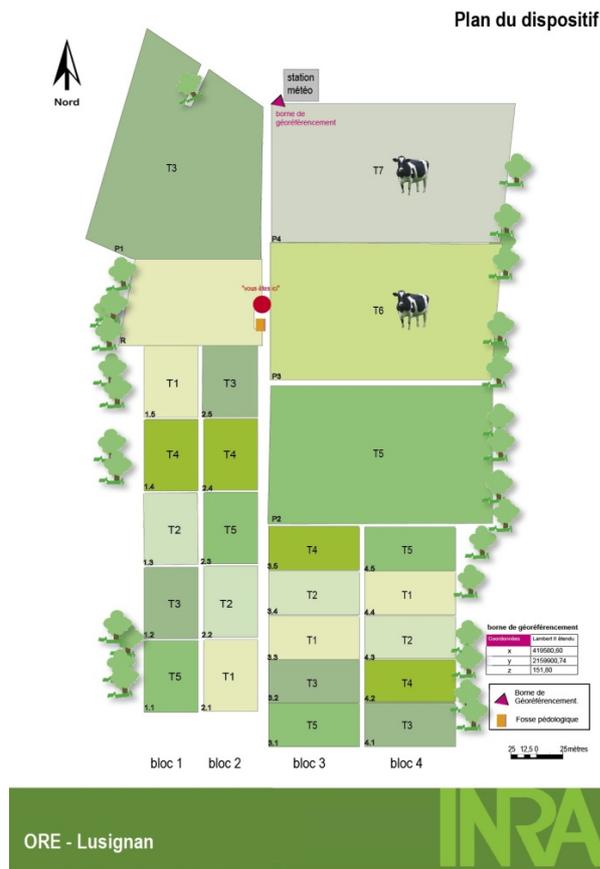
Dispositif petites parcelles

T1	culture	c1	c2	c3	c1															
T2	P 3ans N+ fauche	c1	c2	c3	1	2	3	c1	c2	c3	1	2	3	c1	c2	c3	1	2	3	c1
T3	P 6ans N+ fauche	1	2	3	4	5	6	c1	c2	c3	1	2	3	4	5	6	c1	c2	c3	1
T4	P 6ans N- fauche	1	2	3	4	5	6	c1	c2	c3	1	2	3	4	5	6	c1	c2	c3	1
T5	P 20ans N+ fauche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

c1 c2 c3 → **Séquence cultures: maïs – blé – orge**
1 2 3 ... → **Séquence prairies: fétuque élevée + dactyle + rga + (trèfle blanc)**

- (i) La durée de la séquence « prairie » par rapport à la séquence « culture annuelle » (3, 6 ou >20 ans) afin d’étudier la dynamique d’accumulation de C et N dans les sols notamment lors des phases de changement d’occupation du sol : dynamique d’installation d’une prairie sur un sol cultivé, et dynamique lors du retournement de la prairie et la remise en culture.
- (ii) Le niveau d’intensification de la production de la prairie en appliquant deux régimes de fertilisation azotée engendrant des différences dans le couplage C et N.
- (iii) Les modes d’exploitation de la prairie : pâturage vs fauche, pour engendrer des niveaux d’apport C et N et des niveaux d’exportation et de recyclage contrastés d’éléments minéraux.

Ces différents traitements sont disposés (i) dans des parcelles de 4000 m² avec 4 répétitions et (ii) pour certains d’entre eux les traitements sont répétés sur des grandes parcelles de 3 ha afin de mettre en œuvre les dispositifs de mesure des flux gazeux qui nécessitent de grandes surfaces homogènes (Figure 2.1). Les travaux de cette thèse ont été centrés principalement sur le rôle de la prairie vs culture, sur la dynamique du carbone hydrosoluble et concernent plus particulièrement les blocs 1 et 2 du dispositif expérimental (voir figure 2.1)



Les traitements expérimentaux

Dispositif en blocs (20 parcelles de 4000m²)

T1 : culture
 T2 : séquence prairie de 3 ans, N+, fauche
 T3 : séquence prairie de 6 ans, N+, fauche
 T4 : séquence prairie de 6 ans, N-, fauche
 T5 : prairie 20 ans, N+, fauche

Dispositif en grandes parcelles
 (4 parcelles de 3 ha)

T3 : séquence prairie de 6 ans, N+, fauche
 T6 : séquence prairie de 6 ans, légumineuse, pâture
 T5 : prairie 20 ans, N+, fauche
 T7 : prairie 20 ans, N+, légumineuse, pâture

Figure 2.1 : Plan et localisation des traitements sur le dispositif expérimental du site

I-2. Instrumentation du site

Le site de Lusignan a été instrumenté de manière à suivre sur le long terme les trajectoires des variables d'état du système, en fonction de forçages appliqués et pour répondre aux questions posées. En complément d'infrastructures d'analyse des flux vers l'atmosphère, le dispositif est également équipé d'infrastructures dédiées à l'analyse des flux vers l'hydrosphère. L'analyse des flux vers l'hydrosphère sur le site de Lusignan est capitale du fait de la coexistence spatiale et de la succession temporelle de systèmes de cultures annuelles et de prairies, qui déterminent fortement la composition de la solution du sol. Pour évaluer la composition de la solution du sol qui percole en dessous de la zone d'enracinement (1m de profondeur), deux systèmes complémentaires ont été mis en place durant l'année 2004 :

- I. Un système de 40 plaques lysimétriques (soit 8 plaques par traitement expérimental) permettant de récolter l'eau gravitaire qui sort du système en dessous de la zone d'enracinement : profondeur 105 cm.

- II. Un système de 60 bougies poreuses (soit 15 bougies par traitement) dont 12 sont dédiées pour suivre le devenir des pesticides dans le sol. Ces bougies sont insérées également à une profondeur de 105 cm.

Les informations sur la composition de l'eau obtenues par ces deux systèmes, seront complémentaires car elles ne concernent pas exactement les mêmes compartiments. Les bougies poreuses permettent d'avoir accès à la solution du sol en dehors des périodes de drainage. Les prélèvements d'eau seront effectués toutes les deux semaines, en routine, pendant les périodes de drainage. Ce dispositif extrêmement lourd a été implanté à l'aide d'un système de tranchées permettant l'installation des capteurs dans le sol non perturbé. Ils ont ainsi été reliés aux dispositifs de mesure, d'enregistrement et d'acquisition de données dans 5 fosses bétonnées étanches permettant alors d'avoir un accès permanent. Le dispositif est maintenant fonctionnel et il enregistre depuis Janvier 2005 les différentes variables qui ont constituées le point zéro du système avant la mise en place des traitements expérimentaux (mars 2005). En plus des plaques lysimétriques et des bougies poreuses, le site de l'ORE a été équipé de huit sondes TDR CS616 et de six sondes de température PT100 afin de suivre en continu l'état hydrique du sol.

I-3. Caractéristiques générales du sol étudié

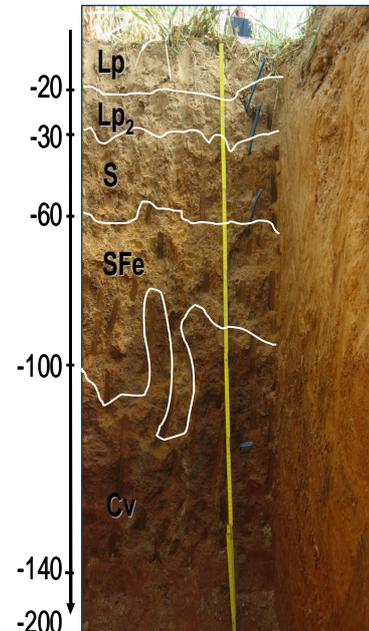
Le sol étudié est un Brunisol saturé avec les horizons Lp, S, Sfe, et C. Leur texture est de type limon moyen dans l'horizon Lp, limon argileux et argile dans l'horizon Sfe et argile lourd dans l'horizon C. En surface (0-60 cm), le processus de brunification est actif. En profondeur ces sols sont caractérisés par des tâches et concrétions ferro-manganiques (Tableau 2.2). Ces propriétés ont été acquises lors de leur pédogenèse pendant le Tertiaire, car il s'agit ici de paléosols qui se sont développés sous un climat tropical. La capacité d'échange est relativement faible (présence des argiles de type kaolinite), et le rapport C/N des MO diminue en fonction de la profondeur (MO plus humifiée). Certains horizons sont caractérisés par des hétérogénéités à petite échelle (Chabbi et al. 2009), indiquant une présence d'invaginations probablement dues à des zones d'écoulement préférentiel. Deux zones contrastées au plan morphologique et au plan de la distribution des MOS peuvent être observées avec l'hypothèse d'un fonctionnement différencié de ces zones au plan de la dynamique des MO :

- Matrice microporeuse où on soupçonne que les MO sont en majorité anciennes et l'activité microbienne est faible.

- Invagination avec des MOS jeunes et probablement labiles (présence des racines) favorisant une activité microbienne intense ou intermédiaire. Les teneurs en carbone relativement importantes par rapport à la matrice illustrent bien cette observation.

Tableau 2.2 : Caractéristiques et photographie des différents horizons du sol de Lusignan

Horizons	Lp	Lp ₂	S	SFe	C(I)	C (II)
Profondeur (cm)	0-20	20-30	30-60	60-100	100-140	140-200
pH (H ₂ O)	6,4	6,5	6,6	6,9	6,3	5,1
Sable (%)	11	13	9	13	12	28
Limon (%)	72	68	65	54	52	22
Argile (%)	17	19	26	34	36	50
CEC (mol/kg)	6,2	6,3	8,6	9,6	9,9	8,0
C total (g/kg)	10,3	8,9	3,7	2,8	2,0	1,0
N total (g/kg)	1,1	1,0	0,5	0,5	0,4	0,1
C/N	9,2	9,0	7,1	6,0	5,6	7,6



I-4. Les monolithes

En complément des systèmes de collecte par plaques lysimétriques et bougies poreuses mis en place sur les différentes parcelles, le site de l'ORE a été équipé en 2007 de trois monolithes installés sur le site. Chacun des trois monolithes est composé de onze sondes TDR CS616 câblées sur 30 m, de onze sondes de température Thermistance 107 câblées sur 30 m et de huit bougies poreuses Sdec 2100 HCH x 2 tubes x 30 m (480 m de tube). L'enregistrement des données se fait sur CR1000 et une liaison filaire vers un PC (bureau) est mise en place. La figure 2.2 présente quelques photos de l'installation ainsi qu'un schéma du dispositif final.

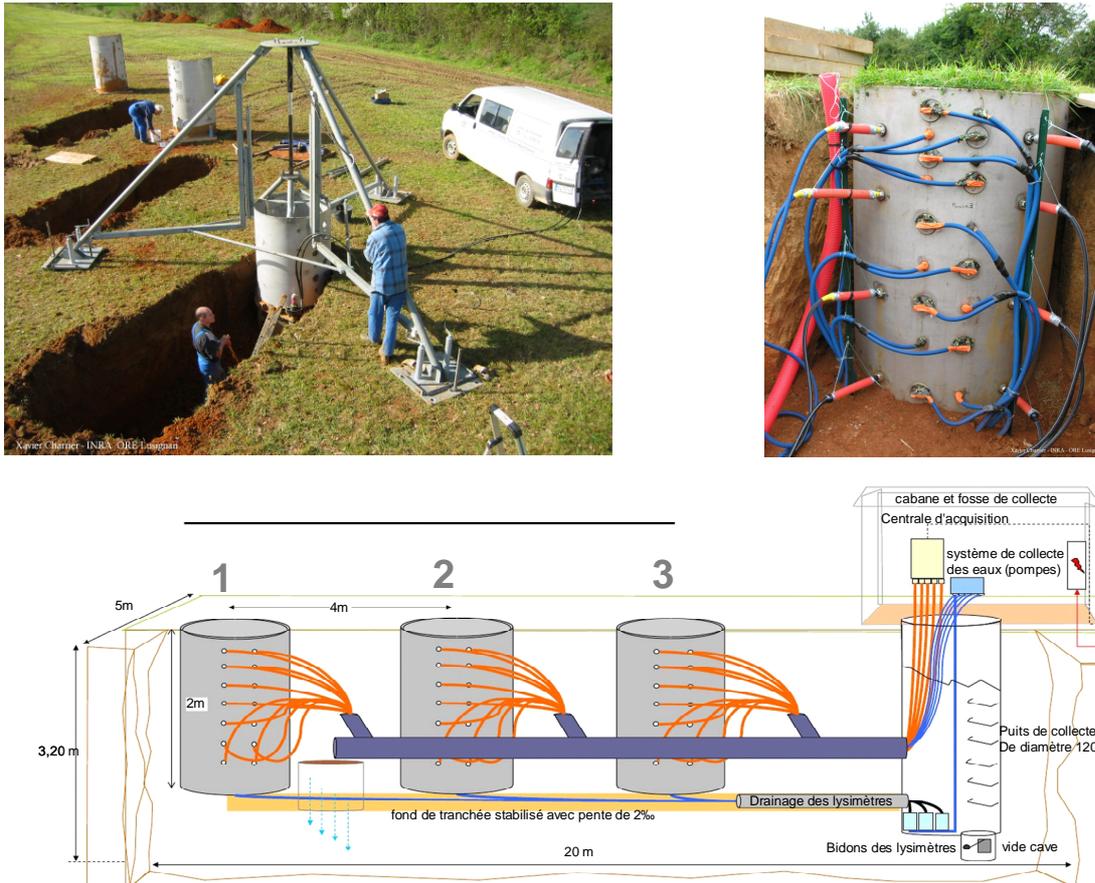


Figure 2.2 : Dispositif des monolithes sur le site de l'ORE

II. Suivi de la qualité des eaux collectées par plaques lysimétriques (PL) et bougies poreuses (BP)

II-1. Suivi temporel des eaux collectées à 105 cm au niveau des parcelles

L'étude de la qualité des eaux profondes est un travail qui s'est étalé sur 3 ans, impliquant 10 parcelles et 5 traitements. Le travail a consisté en la collecte et l'analyse des eaux au niveau des différentes parcelles par deux modes de prélèvement : les plaques lysimétriques et les bougies poreuses. Cette collecte est bien évidemment fonction de la pluviosité, et de manière générale seuls les premiers mois des années 2007, 2008 et 2009 ont permis de collecter des échantillons.

Les eaux sont récupérées au niveau d'un poste de prélèvement équipé de pompes et de flacons de récupération situés en contre bas à une profondeur de 205 cm. Les échantillons sont récupérés en continu dans des flacons de grande capacité, en fonction des conditions climatiques (pluviométrie) et du taux de saturation en eau du sol.

Les plaques lysimétriques sont inclinées d'une pente de 5° pour avoir un drainage naturel et des échantillons moyens 24 heures sont collectés. Les bougies poreuses sont mises sous dépression de 0,6 bar (pompe aspirante) et des échantillons moyens 48 heures sont préparés à partir des solutions collectées.

Une fois les échantillons prélevés dans des flacons d'un litre, en plastique, ils ont été stockés dans une chambre froide à 4°C après acidification avec HCl. Une étude préliminaire (Figure 2.3) a montré que le stockage en chambre froide n'engendre pas de modification de la concentration en COD des échantillons pendant une période de 4 mois.

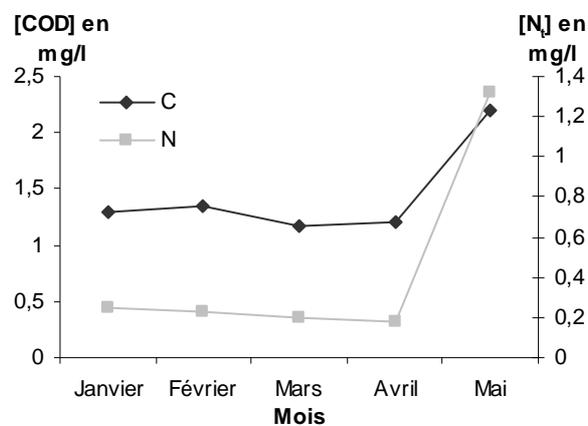


Figure 2.3 : Influence du stockage en chambre froide sur les concentrations en COD et N_t

Le suivi analytique mis en place sur les échantillons collectés comprend :

- Le Carbone Organique Total ou COT et l'azote total ou N_T
- L'absorbance UV et l'émission de fluorescence (spectre EEM)
- La chromatographie d'exclusion stérique (SEC pour Size Exclusion Chromatography) couplée le plus généralement à la détection UV et pour certains échantillons couplée à la mesure du COD.

En parallèle de la collecte des échantillons en fonction des conditions climatiques, un suivi de la pluviométrie et de la température du sol à 50 cm et à 1 m au niveau des plaques et des bougies a été effectué.

II-2. Prélèvements au niveau des monolithes

La collecte des eaux qui percole dans les trois monolithes a commencé au cours de l'année 2009 en collaboration avec une étudiante en Master 2 du laboratoire (Laure DRAMAS). Contrairement à la collecte des eaux sur les différentes parcelles qui permettait de suivre l'évolution de la matière organique soluble au fil des saisons, ce travail beaucoup plus restreint dans le temps et par le nombre de points prélevés, a permis de réaliser un suivi de la matière organique soluble en fonction de la profondeur.

Cette collecte a été réalisée à l'aide de bougies poreuses placées deux à deux à 20 cm, 50 cm, 100cm et 150cm de profondeur et d'un fond de cuve équipé pour fonctionner comme un lysimètre, à une profondeur de 200 cm. Le prélèvement des eaux de bougies poreuses se fait par vide d'air. La pompe est mise en marche lorsque le sol est saturé en eau et des échantillons moyens sur 48 heures sont alors préparés. Le fond de cuve est relié à une tranchée inclinée de 2 % qui permet un drainage naturel des échantillons.

III. Etude quantitative et structurale des matières organiques hydrosolubles des sols

III-1. Quantification des matières organiques hydrosolubles : préparation des solutions de sol

Ce travail s'est appuyé sur la mise au point d'un protocole d'extraction de la matière organique soluble à l'eau en faisant varier différents paramètres tels que le temps de contact, la vitesse de centrifugation, le mode et la puissance de sonication (bain ou sonde à ultrasons).

Pour permettre cette extraction, les échantillons des différents horizons du sol ont été prélevés directement sur le terrain dans une fosse à proximité des blocs 1 et 2 de plus de 2 mètres de profondeur ouverte à cet effet. Les horizons prélevés ont été séchés à l'air libre avec un brassage régulier afin de supprimer toute trace d'humidité, puis tamisés sur un tamis de mailles 2 mm (standard international afin de réduire l'hétérogénéité de l'échantillon) avant extraction de la solution.

Des échantillons de sol ont également été prélevés dans une fosse ouverte à proximité des monolithes pour conduire des essais portant sur l'impact des phases de séchage et de réhumidification sur le COD extractible à l'eau. Cette expérience est venue compléter les essais menés sur le terrain sur un des monolithes. Pour cela, les prélèvements de chacun des horizons de la fosse située à coté

des monolithes ont été divisés en trois. Le premier tiers est conservé dans un sac plastique hermétique, en chambre froide à 4°C et les deux derniers tiers sont séchés à l'air et à température ambiante afin de rester le plus proche des conditions naturelles.

La réhumidification d'échantillons préalablement séchés à l'air, a été réalisée sur des masses de 20 g de sol par vaporisation de la quantité d'eau équivalente à celle correspondant au taux d'humidité initialement mesuré. Des phases successives de séchage réhumidification ont été effectuées sur plusieurs jours consécutifs avec une réhumidification journalière. La qualité de ces échantillons a été comparée à celle d'échantillons fraîchement prélevés et conservés dans le premier tiers.

Pour notre projet nous avons choisi de développer un protocole d'extraction à partir d'eau pure (eau ultra-pure produite par un système MilliQ). L'efficacité de l'eau pure pour l'extraction de la MOS a été comparée avec des approches plus classiques mises en œuvre pour ces milieux (soude diluée et solution de chlorure de calcium).

L'optimisation du protocole a été réalisée à partir d'un rapport massique eau sur sol sec de 10, soit 10 g de sol pour 100 ml d'eau ou plus généralement 20 g sol pour 200 mL d'eau. L'importance de quelques paramètres sur le rendement d'extraction en matière organique a été appréciée :

- Le temps d'agitation par retournement
- La température : ambiante ou 80 °C
- La mise sous ultrasons : durée, puissance et type d'équipement (sonde ou bain)
- La vitesse de centrifugation pour la séparation liquide/solide

Ces différents essais ont été développés individuellement ou en combinaison en associant plusieurs étapes d'extraction successives. Tous les échantillons ont subi une phase finale de filtration sur membrane de porosité 0,45 µm en acétate de cellulose.

L'extraction d'échantillons de sol avec NaOH et CaCl₂ a été réalisée en suivant les protocoles de USSIRI et JOHNSON (2002) et CORVASCE et al. (2006)/ ZSOLNAY et al. (2003), respectivement. Les étapes de ces protocoles sont les suivantes :

USSIRI et JOHNSON (2002) :

Ratio sol/NaOH : 1g/20ml ou 1g/10ml (NaOH : 0.1M)

Agiter pendant 30 minutes

Suspension laissée au repos pendant 18h puis centrifugée

Suspension acidifiée à pH 2 avec HCl 1M puis centrifugée

Filtration du surnageant sur 0,45µm

CORVASCE et al. (2006)/ ZSOLNAY et al. (2003)

Mélanger 0.01 M CaCl₂ avec le sol ratio massique sol/CaCl₂ : ½

Agiter pendant 10 min à température ambiante

Centrifuger la suspension à 1500g pendant 10 min

Filtrer sur 0,45µm

III-2. Extraction des matières organiques dissoutes par résines XAD

Les eaux collectées en profondeur tout au long de notre projet nous ont permis de mettre en place deux campagnes d'extraction de la matière organique soluble des sols : la première fin 2007 regroupant l'hiver 2006/2007 et les premiers mois de 2007, la seconde en 2008 regroupant l'hiver 2007/2008 et les premiers mois de 2008. Les volumes collectés au niveau des différents traitements et modes de prélèvement sont regroupés dans le tableau 2.3 ci-dessous.

Tableau 2.3 : Volume (ml) d'eau collecté sur les différents traitements au niveau des PL et des BP au cours des années 2007, 2008 et 2009

Traitements (Parcelles)	Volume collecté (ml)		Volume collecté (ml)		Volume collecté (ml)	
	hiver 2006/2007 et début 2007		hiver 2007/2008 et début 2008		hiver 2008/2009 et début 2009	
	PL	BP	PL	BP	PL	BP
T1 (1.5 et 2.1)	50000	23735	80010	14485	19065	1810
T2 (1.3 et 2.2)	58475	24861	86270	10375	15515	1830
T3 (1.2 et 2.5)	43130	20375	48865	7535	14760	2065
T4 (1.4 et 2.4)	32150	19185	50860	4110	12580	1505
T5 (1.1 et 2.3)	39990	24820	53720	6175	14100	2025

Au vu des grandes quantités d'eau nécessaires pour la campagne d'extraction, elle a été réalisée sur les eaux des PL mais aussi sur des solutions de sol préparées spécifiquement, notamment l'horizon de surface 0-30 cm et l'horizon correspondant aux PL 100-140 cm. Les échantillons servant pour l'extraction étant conservés pendant plus de 4 mois, ils ont été légèrement acidifiés avec de l'acide chlorhydrique pour limiter le développement microbien.

Afin d'extraire la matière organique soluble, les eaux collectées au niveau des parcelles ont été mélangées par traitement puis concentrées par évaporation rotative sous vide. Le concentrât a ensuite été percolé sur résine XAD afin d'extraire la matière organique soluble. Le protocole détaillé de l'extraction est présenté dans la partie méthode analytique de ce chapitre.

III-2-1. Fractions Hydrophobe (HPO) et Transphilique (TPH)

Le protocole d'isolation des MOD mis en œuvre est sensiblement identique à celui proposé par AIKEN et LEENHEER (1993). L'extraction consiste à faire percoler un échantillon préalablement filtré sur membrane de porosité 0,45 μm et acidifié à $\text{pH} = 2$, sur deux colonnes en série de 250 ml de résine XAD-8 et XAD-4 à un débit de 3 L/h (figure 2.4).

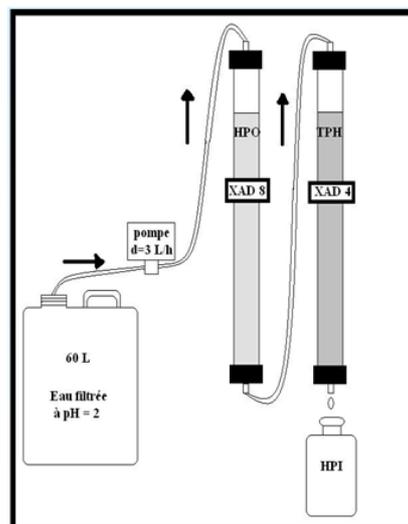


Figure 2.4 : Schéma du dispositif permettant d'extraire les MOD sur résine XAD

Avant utilisation, les résines XAD-8 (résine acrylique) et XAD-4 (résine styrénique) commercialisées par la société ROHM et HASS ont fait l'objet d'une phase de purification détaillée par MARTIN (1995) et LABOUYRIE (1997). Cette phase consiste à laver les résines au soxhlet

avec divers solvants afin de les débarrasser des impuretés qu'elles peuvent contenir (monomères de constitution, agents conservateurs). Une série de rinçages par des solutions d'HCl 0,1 mol/L, de soude 0,1 mol/L et d'eau MilliQ (jusqu'à obtention d'une teneur en COD en sortie de colonne inférieure à 0,5 mgC/L) parfait leur préparation.

L'étape de filtration terminée, les matières organiques dissoutes HPO et TPH respectivement adsorbées sur les résines XAD-8 et XAD-4 sont désorbées par un mélange acétonitrile/eau (75%/25% - V/V), après rinçage des résines avec une solution d'acide formique (pH 2) jusqu'à obtention d'une conductivité équivalente en entrée en en sortie de colonnes.

Les éluât HPO et TPH sont alors concentrés par évaporation sous vide réduit à 40°C, afin d'éliminer l'acide formique et l'acétonitrile. Les échantillons sont finalement lyophilisés et conservés à l'abri de la lumière pour des analyses ultérieures.

III-2-2. Fractions Hydrophiles (HPI)

L'extraction et la purification de la fraction HPI (la plus hydrophile) se heurtent aux difficultés liées à la séparation des composés organiques et minéraux (sels) contenus dans l'effluent de la résine XAD-4. Une partie des sels est éliminée par simple concentration réalisée par évaporation sous vide réduit qui engendre par saturation leur précipitation. Les sels résiduels sont ensuite séparés de la fraction organique par plusieurs opérations successives :

La distillation zéotrophique (AIKEN et LEENHEER 1993) consiste à ajouter à l'effluent de la résine XAD-4 un volume équivalent d'acide acétique glacial pur (99-100%) puis à évaporer sous vide réduit. Les sels peu solubles dans l'acide acétique précipitent, le surnageant contenant les MO hydrophiles est alors filtré sur membrane GF/C (Whatman). Plusieurs opérations successives sont nécessaires afin d'éliminer les sels présents en majorité des chlorures.

Les ions sulfate partiellement éliminés par distillation zéotrophique sont séparés des composés organiques par centrifugation après les avoir fait précipiter à pH acide sous forme de sulfate de baryum en ajoutant du formate de baryum. Cette étape est suivie d'une filtration sur résine cationique régénérée sous forme H⁺ afin d'éliminer les cations (dont l'excédent de baryum). Cette étape engendre le fractionnement des substances hydrophiles en composés hydrophiles acides et neutres (HPIA+N) et composés hydrophiles basiques (HPIB). Ces derniers sont retenus sur la résine et élués avec une solution de NH₄OH puis évaporés à sec et lyophilisés. La fraction des hydrophiles acides et neutres contenue dans l'effluent de la résine est successivement évaporée en présence d'acétonitrile (élimination des acides chlorhydrique, borique et partiellement d'acide

nitrique), d'acide formique (élimination du reste des nitrates sous forme de dioxyde d'azote) et enfin de méthanol (pour éliminer le résiduel d'acide formique).

Une étape de dialyse contre de l'eau pure effectuée avec une membrane de porosité 100Da permet d'éliminer les dernières traces de solvant employé tout au long de la purification.

Enfin, l'échantillon est lyophilisé (la présence de sel résiduel est souvent observé malgré ces étapes de purification).

On obtient ainsi pour chaque traitement 4 fractions :

La fraction hydrophobe HPO (absorbée sur XAD-8).

La fraction transphillique TPH (absorbée sur XAD-4).

Et deux fractions hydrophiles HPIA+N et HPIB (contenue dans l'effluent de XAD-4).

III-2-3. Fractionnement analytique sur résine XAD

Une variante de protocole d'extraction présentée dans le paragraphe ci-dessus (absence d'étapes d'élution par solvant) permet d'établir la distribution des principales fractions du COD telle que nous venons de la définir. Les résines sont préparées avec le même protocole détaillé ci-dessus. Ce fractionnement analytique consiste à filtrer un volume de 100 ml d'échantillon acidifié à pH 2 sur deux mini-colonnes disposées en série et contenant chacune 4 ml de résine. En fin de filtration les filtrats sont récupérés en sortie des XAD-8 et XAD-4 pour déterminer leur teneur respective en COD.

A partir de ces mesures de COD et de celle effectuée sur l'eau initiale (avant filtration), la distribution du COD représentée par les pourcentages des différentes fractions HPO, TPH et d'HPI de l'échantillon peut être déterminée de la manière suivante :

$$\text{Substances hydrophobes (HPO) en \%} = 100 * [(\text{COD}_i - \text{COD}_{(\text{filtrat XAD-8})}) / \text{COD}_i]$$

$$\text{Substances transphilliques (TPH) en \%} = 100 * [(\text{COD}_{(\text{filtrat XAD-8})} - \text{COD}_{(\text{filtrat XAD-4})}) / \text{COD}_i]$$

$$\text{Substances Hydrophiles (HPI) non absorbées en \%} = 100 * [\text{COD}_{(\text{filtrat XAD-4})} / \text{COD}_i]$$

IV. Expérimentation sur les monolithes : Cycle séchage-réhumidification

Pour compléter les essais de laboratoire par une expérience sur le terrain, le monolithe 3 a été couvert à l'aide d'une bâche transparente placée à 80 cm au dessus de la surface (afin que la respiration de la terre ne soit pas affectée). La couverture a été réalisée le 25 Mars 2009.

La phase de réhumidification a été conduite sur une durée de 5 jours par un arrosage abondant i.e. 300 litres (simulation de fortes pluies d'orage) de la surface du monolithe avec de l'eau osmosée à partir du 1er Juillet 2009. Pendant toute la période de couverture (un peu plus de 3 mois), la température et l'hygrométrie du sol ont été suivies aux différentes profondeurs ; les valeurs ont été comparées à celles des deux monolithes 1 et 2 non couverts. Le protocole de réhumidification est décrit ci-dessous :

Jour 1 (1^{er} Juillet 2009) : Entre 10h -16h,

A raison de 10 L toutes les heures d'eau ultra-pure, versé en 10 minutes **(70 L)**

Jour 2 : Entre 10h – 16h

Même démarche que le jour 1 **(70 L)**

Jour 3 : Entre 9h – 12h30

A raison de 10 L toutes les 30 min **(80 L)**

Jour 5 : Réhumidification préventive pour ne pas faire fonctionner les bougies poreuses dans un environnement sec.

Entre 9h – 12h30

Même démarche que le jour 5 **(80 L)**

V. Matériel et méthodes analytiques

V-1. Bain/Sonde à ultrasons

Deux dispositifs à ultrasons ont été utilisés au cours de ces travaux pour extraire la matière organique soluble des sols, un bain à US Bioblock de type T490DH (H/I/L 240 x 137 x 100 mm) de 40kHz installé au laboratoire de chimie et microbiologie de l'eau à Poitiers et une sonde à US installée au laboratoire BioEMCO de Grignon. Des travaux préliminaires ont permis de montrer une

meilleure répétabilité pour le bain à US. C'est donc ce dernier qui sera utilisé lors de la totalité des phases d'extraction de la matière organique soluble.

V-2. Dosage du carbone organique dissous (COD) et de l'azote total (N_t)

Les analyses en COD et N_t sont effectuées avec un analyseur de carbone SHIMADZU TOC-VCSH disposant d'un module TNM-1 et d'un passeur automatique 64 voies ASI-V. La mesure du carbone et de l'azote est faite par oxydation thermique (réacteur en quartz : 680°C) avec détection infrarouge pour le premier et détection par chimiluminescence pour le second (NO formés réagissent avec l'ozone pour donner des NO_2 excités, le retour à l'état fondamental permet la détection). L'échantillon est introduit par le passeur automatique et acidifié par de l'acide chlorhydrique (2 mol/L) pour éliminer les carbonates. Le seuil de détection est de l'ordre de 0,1 mg C/L. Avant chaque utilisation de l'analyseur de carbone et d'azote, un échantillon d'eau ultra-pure a été injecté afin de rincer l'appareil et un échantillon de référence (5mg C/L) a été analysé afin de s'assurer que la réponse de l'analyseur est correcte. Un étalonnage régulier (tout les mois) est effectué, pour cela des solutions d'acétanilide ($C_6H_5NH(COCH_3)$) sont préparées afin de calibrer simultanément le carbone et l'azote.

V-3. Analyse UV-visible et détermination du SUVA

Les mesures d'absorbance UV-visible ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre SAFAS Monaco 190 double faisceaux. Des cuves de 1 cm ou 5 cm en quartz ont été utilisées avec un balayage de longueur d'onde entre 200 et 500 nm. A partir de cette mesure d'absorbance UV et de la concentration en COD, le paramètre SUVA (« Specific UV Absorbance ») correspondant au rapport de l'absorbance UV à 254 nm sur la teneur en COD a pu être calculé. Il s'exprime en $mg^{-1}.m^{-1}.L$. De nombreux travaux ont montré que le paramètre SUVA permet d'apprécier le degré d'aromaticité des fractions de matière organique (CROUE et al. 2000).

V-4. Analyse spectrofluorimétrique

Pour cette analyse, un spectrofluorimètre « Jobin Yvon-Spex FluoroMAX-2 » équipé d'une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique a été utilisé. L'intensité de fluorescence de nos échantillons est mesurée en effectuant un balayage dans la gamme de longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 200 à 450 nm et 300 à 550 nm par pas de 5 nm. Ce balayage permet d'obtenir une Matrice d'Emission-Excitation de Fluorescence (MEEF).

Toutes les matrices ainsi obtenues ont été soustraites à la réponse de l'eau MilliQ (blanc) afin d'éliminer les effets des diffusions de Rayleigh et Raman causés par le solvant (MAUCHIEN et al. 1990). Les échantillons étudiés ont été ajustés à la même concentration en COD (5 mg C/L) pour certains et la même absorbance à 310 nm pour d'autres.

Ces spectres permettent d'identifier les principaux fluorophores présents dans la structure de la matrice organique et d'apprécier les abondances relatives. Nous avons décidé par la suite d'intégrer le volume sous chaque fluorophore. Pour cela nous avons fait appel à Monsieur Laurent Signac maître de conférence au laboratoire d'automatique et d'informatique industrielle (ESIP) qui a développé un programme permettant de calculer ce volume. Ce programme tourne sous le logiciel MATLAB et fonctionne sur différentes approximations mathématiques assez compliquées (méthodes des trapèzes, du prisme approximation par des matrices), non détaillées dans ce manuscrit.

V-5. Chromatographie d'exclusion stérique haute performance

Nous avons également caractérisé la MO soluble par plusieurs méthodes en chromatographie d'exclusion stérique. Ces méthodes ont été appliquées sur des eaux naturelles collectées au niveau des plaques lysimétriques et des bougies poreuses mais aussi sur des solutions de MO à partir d'extraits secs remis en solution, ces solutions ont été préparées à partir d'eau MilliQ.

V-5-1. HPSEC/UV(254)/Fluo

Le mode de séparation (tampon acétate) est basé sur la méthode décrite par VARTIAINEN et al. (1987). Les analyses ont été menées sur une colonne BioSep SEC-2000 de chez AIT (dimension : 7,8 x 300 mm, taille de particule : 5 μ m) à un débit de 1 ml/min. La phase mobile est une solution d'acétate de sodium 10 mmol/L ajustée à pH = 7 avec de l'acide acétique puis filtrée sur une membrane de porosité 0,45 μ m.

La chaîne analytique est constituée d'un passeur MERCK AS-400, d'une pompe Waters 600 et de deux détecteurs en série :

Un détecteur UV Merck L-400 mesurant l'absorbance à 254 nm.

Un détecteur Fluorimétrique Waters 474 mesurant l'intensité de fluorescence à 310 nm pour une longueur d'onde d'excitation de 278 nm.

V-5-2. HPSEC/UV(254)/N_t

Les analyses en chromatographie d'exclusion de taille (même mode de séparation que la partie V-5-1) avec détection UV et Azote ont été réalisées avec un matériel classique de chromatographie constitué d'un passeur d'échantillons (AS100 Thermo separation products), d'une pompe à gradient (GP40 Dionex). La détection UV utilise un détecteur (486 de chez Waters). Le détecteur d'azote utilisé est le détecteur pour HPLC 8060 d'Antek commercialisé par la société Alytech. La phase mobile est nébulisée en continu, sous l'action d'un mélange air/hélium dans un four tubulaire (1100°C). La combustion des composés azotés (organiques et minéraux) conduit à la formation de monoxyde d'azote détecté par chimiluminescence.

L'utilisation du détecteur d'azote en ligne nécessite la mise en place d'une dérivation en « Peek » en sortie de colonne afin de limiter le débit de phase mobile de 0,2 ml/min dans le détecteur d'azote. Le débit a été réglé en jouant sur les longueurs de tuyaux « Peek » (diamètre interne de 0,13 mm) connecté après un Té mélangeur vers le détecteur (119 cm) et vers la « poubelle » (50 cm). Le volume d'injection est de 500 µL et la limite de détection est de 9 µg N/L soit 4,5 ng N. L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés à l'aide du logiciel Millennium version 3.05.01 (Waters).

La calibration des temps de rétention a été réalisée par l'injection de composés azotés organiques et inorganiques. Les solutions en composés azotés ont été préparées et injectées à une concentration de 1 mg N/ L à pH libre. Le tableau 2.4 montre les différents temps de rétention obtenus

Tableau 2.4 : Temps de rétention et masse moléculaire de quelques composés azotés obtenus en HPSEC/Nt

Composés	Masse moléculaire (g/mol)	Poids moléculaires	
		apparents en Dalton (MM _H)	Temps de rétention (min)
BSA (Bovine Serum Albumine)	~ 60000	~ 60000	5,3
Ion ammonium	18,0	17,8	14,6
Nitrite	46,0	45,6	10,4
Urée	60,0	60,1	13,7
Nitrate	62,0	61,5	10,9
Glycine	75,1	74,5	14,3
Sérine	105,1	104,3	14,3
Acide aspartique	133,1	132,0	14,3
Acétanilide	135,2	134,0	18,0
Tyrosine	181,2	59,6	12,6
Tryptophane	204,2	203,0	13,0
Atrazine	215,7	214	15,3

D'après les données du tableau 2.2, pour les faibles masses moléculaires (< 200 Daltons), le temps de rétention ne peut être corrélé directement à la taille des molécules. La présence de charges positives ou négatives influe sur le comportement des molécules à travers le gel de perméation.

L'étalonnage de l'analyseur d'azote Antek a été réalisé avec des solutions de nitrate de potassium entre 0,12 et 2mg N/L. Les résultats obtenus figure 2.5 montrent que la réponse est linéaire pour la gamme de concentrations utilisées

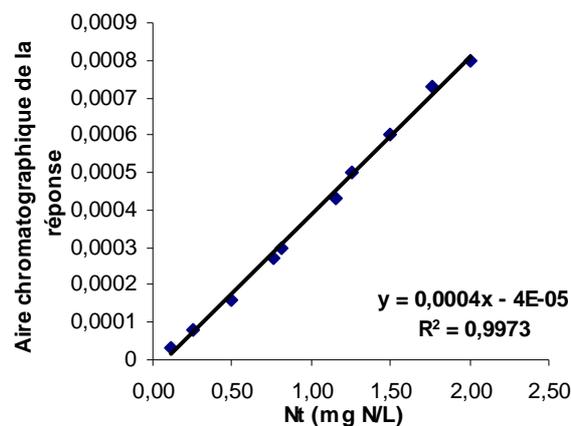


Figure 2.5 : Droite d'étalonnage de l'azote par couplage HPSEC/Nt (nitrate de potassium)

Enfin, une droite de calibration a été déterminée afin de référencer les pics chromatographiques identifiés par rapport à leur temps de rétention et par rapport à leur masse moléculaire. La figure 2.6 présente la droite obtenue à partir de 4 étalons de masses moléculaires différentes de 400 à 13000 Daltons, une bonne linéarité a été obtenue.

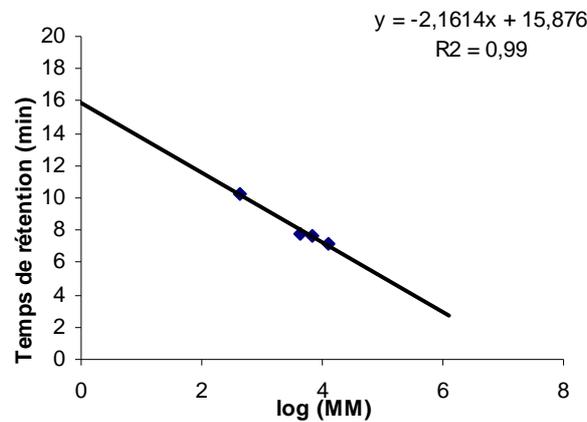


Figure 2.6 : Droite de calibration entre le temps de rétention et la masse moléculaire en HPSEC/Nt

V-5-3. HPSEC/UV(254)/COD

Des analyses HPSEC/UV/COD ont pu être réalisées ponctuellement en envoyant des échantillons au Centre d'Anjou Recherche à Maisons-Laffitte. Le centre dispose en effet d'un système de chromatographie liquide avec détection du carbone organique, développé par DOC-Labor (Karlsruhe, Allemagne). D'autres analyses en particulier pour les résultats obtenus sur les monolithes ont été effectuées directement dans le laboratoire d'analyse ayant créé la méthode (DOC-Labor à Karlsruhe, Allemagne). Cette méthode utilise une colonne TSK-HW50S (dimensions: 250 mm x 20 mm, gamme de poids moléculaires : 100 – 80 000 Da, taille des particules : 20 -40 μm) et un tampon phosphate (20 mM, pH 6,58). La description détaillée de cette méthode est proposée dans les travaux de HUBER et FRIMMEL en 1991.

Cet outil analytique qui existe seulement en quelques exemplaires dans le monde permet d'obtenir deux profils chromatographiques, par mesure du COD et de l'UV. La figure 2.7 montre un profil chromatographique type obtenu en détection COD et permet de distinguer plusieurs régions quantifiables par intégration.

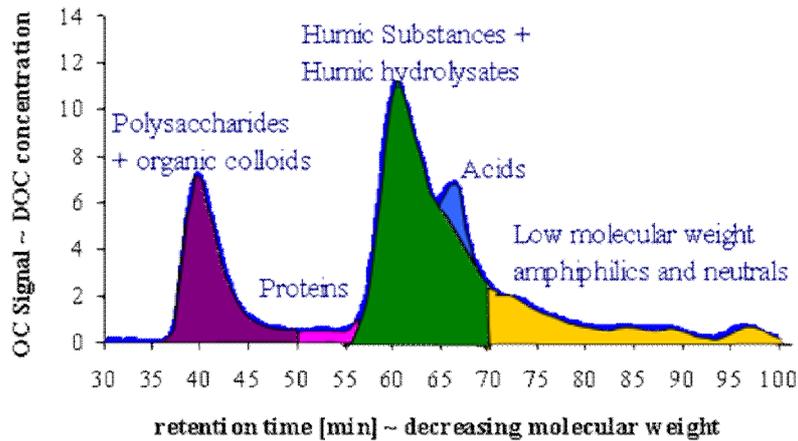


Figure 2.7 : Profil chromatographique type obtenu en détection COD

V-6. Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire (C, H, N et O) effectuée sur les extraits secs de MO (environ 2 mg) a été réalisée au service commun de chimie de l'Université de Poitiers. Elle repose sur une combustion (avec apport d'oxygène) et consiste à dégrader l'échantillon en gaz élémentaire porté par un gaz vecteur : l'hélium. Cette analyse par combustion met en œuvre successivement deux réactions.

Tout d'abord, une réaction d'oxydation dégrade l'échantillon grâce à une température élevée (1020°C) et un apport d'oxygène en excès. Ensuite, une réaction de réduction remplit le double rôle de piège de l'oxygène en excès et de réduction de certains gaz en gaz élémentaire (les oxydes d'azote en N₂ par exemple).

Généralement l'analyse élémentaire par combustion utilise deux tubes installés en série dans une enceinte calorifugée (1^{er} tube réaction d'oxydation, 2^{ème} tube réaction de réduction).

Pour s'affranchir des problèmes de fractionnement isotopique, il faut que la combustion soit totale. Plusieurs précautions sont donc prises en ce sens, tout d'abord un excès d'oxygène est apporté lors de la chute de l'échantillon dans le tube de combustion. Ensuite, l'échantillon est pesé avec précision, et conditionné dans une capsule en étain qui a la propriété d'augmenter rapidement la température de 300°C (phénomène de combustion flash). Enfin, le tube est rempli de composés facilitant la combustion (oxyde de tungstène et des filaments de cuivre) de façon à ce que l'échantillon tombe dans la zone la plus chaude du tube.

Les gaz, après réduction, entrent dans une colonne chromatographique remplie, qui sépare les différents gaz élémentaires. La détection d'effectue par infrarouge pour le carbone, l'oxygène et l'hydrogène et par conductimétrie pour l'azote.

V-7. Analyse en spectroscopie infrarouge

Les analyses infrarouges ont été réalisées au service commun de chimie de l'Université de Poitiers. Elles sont effectuées à partir de pastilles de 16 mm confectionnées à l'aide d'une presse hydraulique en mélangeant quelques mg d'échantillon de matière organique lyophilisés à du KBr. Les spectres sont enregistrés à température ambiante dans la gamme de longueurs 400-4000 cm^{-1} avec un spectrophotomètre THERMO NICOLET série Nexus 5700 à transformée de Fourier avec une résolution de 2 cm^{-1} .

Cette méthode spectrale basée sur la détection de vibrations des molécules (rotations, étirements), permet la détection qualitative des groupements fonctionnels oxygénés et azotés des matières organiques naturelles. L'interprétation des spectres IR d'extraits lyophilisés de MON est rendue difficile à cause de l'abondance des bandes d'absorption. Mais paradoxalement, la complexité des MON simplifie l'interprétation de ces spectres puisque les bandes majoritaires peuvent être attribuées aux structures chimiques prédominantes des MON. Le tableau 2.5 recense les fréquences des bandes IR caractéristiques de molécules organiques complexes présentes dans les extraits de MON.

Tableau 2.5 : Fréquence des bandes IR des structures organiques constituant les extraits de MON (THURMAN, 1985)

Structures organiques	Fréquences des bandes (cm^{-1}) et structure
Sucres	3400-3300 (O-H), 1100-1000 (C-O)
Acides fulviques	3400-3300 (O-H), 2700-2500 (COOH), 1760 (COOR), 1720 (COOH), 1660-1630 (ϕ -C=O), 1280-1150 (ϕ -O, COOH)
Carbones hydrogénés	2960 (CH_3), 2940 (CH_2), 1460 (CH_2), 1380 (CH_3)
Protéines	1660 (bande amide 1, N-C=O), 1550 (bande amide 2, N-C=O)

Cette technique permet la caractérisation des protéines, plus difficile par RMN ^{13}C et de situer la nature hydrophobe ou hydrophile de l'extrait étudié dans la mesure où celui-ci a été purifié au préalable, les sels inorganiques étant à l'origine de fortes interférences (THURMAN, 1985).

V-8. Analyse en Résonance Magnétique Nucléaire ^{13}C (RMN ^{13}C)

Les analyses en résonance magnétique nucléaire (RMN) du ^{13}C sont effectuées en collaboration avec le laboratoire « Lehrstuhl für bodenkunde, Technische Universität München. Freising » en Allemagne. Les analyses sont réalisées sur quelques mg d'extraits secs des fractions HPO et TPH. Les échantillons sont analysés par CP/MAS (Cross polarization/magic angle spinning) (SCHAEFER et STEJSKAL, 1976) avec un spectromètre Bruker DSX-200 de fréquence 6,8 kHz et un temps de contact de 1 ms. Les déplacements chimiques ont été référencés à partir du tétraméthysilane. Le signal RMN a été enregistré par FID (Free Induction Decay) et le spectre a été obtenu par transformée de Fourier. Un temps de contact de 1 ms a été utilisé et le délai d'impulsions était de 400 ms.

La RMN ^{13}C conduite sur quelques centaines de mg d'extrait sec lyophilisé est une procédure non destructrice de la matrice organique et assure la caractérisation structurale du carbone organique très utilisée pour l'analyse des substances humiques et hydrophiles. Elle permet de distinguer nettement les extraits isolés de rivière, du milieu marin, ou du sol (MALCOLM, 1989). Les spectres de RMN ^{13}C du solide des différents extraits de MON se répartissent en plusieurs bandes répertoriées dans le tableau 2.6. Il faut noter la superposition de certaines bandes rendant la quantification des différentes structures difficile et subjective.

Tableau 2.6 : Bandes structurales observées sur les spectres RMN ¹³C du solide d'extraits de MON (MALCOLM, 1989)

Groupements chimiques	Types de composés	Bandes (ppm)
C-H	carbone aliphatique	0 - 55
C-N	amines, amides, protéines	40 - 55
O-CH ₃	groupes méthoxy des lignines et tannins	55 - 60
C-O	alcools aliphatiques, éthers, esters	60 - 90
O-C-O	carbone anomérique des sucres, lactols	90 - 110
ϕ	carbone aromatique	95 - 165
ϕ-O	esters aromatiques, éthers, phénols	135 - 165
O=C-O ; O=C-N	acides carboxyliques, esters, amides	160 - 190
O=C-C=C	flavones, quinones	170 - 200
O=C-C	cétones aliphatiques et aromatiques	190 - 220

V-9. Analyse ¹⁴C

Les analyses de l'activité ¹⁴C du bulk et des fractions des extraits HPO et TPH ont été réalisées au laboratoire «Leibnitz-labor, Universität Kiel, Allemagne en utilisant l'accélérateur de spectrométrie de masse (AMS). Pour ces mesures, le CO₂ obtenu par la combustion des échantillons à 900°C est réduit au graphite avec H₂ puis concomitamment analysé par l'AMS (NADEAU et al. 1998). Le ratio ¹³C/¹²C des échantillons a été enregistré simultanément avec le ratio ¹⁴C/¹²C par le système AMS. L'activité ¹⁴C est corrigée pour le fractionnement des isotopes et donné en pourcentage de carbone moderne (PMC). L'âge conventionnel ¹⁴C avant 1950 (BP) est calculé d'après STUIVER et POLACH, 1977. La précision analytique des mesures AMS est de 0,3% pour les échantillons modernes de carbone (i.e, δ¹⁴C = 3‰).

V-10. Pyrolyse-CG/SM et Thermochemiolyse TMAH

Plusieurs techniques de pyrolyse sont utilisées de nos jours pour l'étude de la structure et des constituants des matières organiques : la pyrolyse GC/MS couplée à la chromatographie gazeuse et

à la spectrométrie de masse, mais aussi la thermochemiolyse couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse.

V-10-1. Pyrolyse CG/SM

Par définition, la pyrolyse est une méthode de dégradation thermique à petite échelle ne nécessitant ni dégradation préalable, ni fractionnement, ni purification de l'échantillon et permettant la caractérisation chimique de matériaux à partir de leurs produits de pyrolyse (SAIZ-JIMENEZ, 1995). La pyrolyse conduit au clivage et au réarrangement de certaines liaisons tout en laissant par ailleurs certains fragments intacts (les fragments aromatiques par exemple), et libère des fragments volatiles caractéristiques qui sont séparés sur une colonne de chromatographie gazeuse sous gradient de température, et donne une empreinte du matériel organique de départ (BRUCHET et al. 1990). La détection est réalisée par spectrométrie de masse et l'identification des produits par comparaison avec des banques de données et les données de la littérature.

Les différents types de biopolymères constitutifs des matières organiques naturelles que sont les polysaccharides, les protéines, les aminosucres et les composés polyhydroxyaromatiques, produisent des fragments de pyrolyse caractéristiques (BRUCHET et al. 1990 ; GRAY et McAULIFFE, 1991 ; BIBER et al. 1996).

BRUCHET et al. (1990) ont mis au point une méthode de calcul, reconnue et appliquée par la communauté scientifique, permettant de quantifier chacune des classes de biopolymères à partir de l'aire des fragments de pyrolyse. La proportion variable des fragments caractéristiques en fonction de la structure du biopolymère, fait de la pyrolyse une méthode considérée comme semi-quantitative.

Le tableau 2.7 résume l'origine des biopolymères et la nature des fragments de pyrolyse qu'ils engendrent.

Tableau 2.7 : Origine des biopolymères et leurs fragments caractéristiques (GADEL et BRUCHET, 1987 ; BRUCHET et al. 1990 ; BIBER et al. 1996)

Biopolymères	Origine	Fragments de pyrolyse caractéristiques
Polysaccharides		
- de réserve : i.e. amidon facilement hydrolysable	- aquagénique : algues et bactéries	unités d'hexoses et de pentoses :
- de structure : i.e. cellulose très résistante à la biodégradation	- pédogénique : résidus de plantes	furanne, furfural, lévoglucosénone
		pyridines, pyrroles, indoles, nitriles
Protéines		
	- aquagénique : algues et phytoplancton	Tyrosine : phénol, p crésol (quantité égale)
		Phénylalanine : toluène, styrène, phényl-acétonitrile
		Tryptophane : indole
Aminosucre		
	- paroi des cellules bactériennes et fongiques	acétamide
Polyhydroxyaromatiques (PHA)		
	- plante : lignine	composés phénoliques dont
	- aquatique : algues, diatomées, animaux	méthoxy-phenols (caractéristiques de la lignine)

Le matériel utilisé pour ces travaux est constitué d'un chromatographe à phase gaz HP G1800A GCD System équipé d'un pyrolyseur Pyroprobe 2000 (Chemical Data Systems) couplé à un spectromètre de masse. La séparation est assurée par une colonne capillaire polaire BD-WAX de dimension 30 m x 0,25 mm et un débit de gaz vecteur, hélium 6 Messer, de 1 ml/min.

L'échantillon présenté dans un tube en quartz, est inséré dans le pyrolyseur chauffé à 650°C avec une rampe de température de 20°C/ms et un palier final de 20s. Pendant l'analyse, un gradient de température est appliqué au niveau de la colonne, variant de 50 à 250°C à une vitesse de 4°C/min

suivi d'un palier à 250°C pendant 2 minutes. La détection à ionisation de flamme détecte les masses appartenant à une gamme allant de 40 à 425 m/z.

Les pyrochromatogrammes issus de l'analyse des MOD sont retraités ultérieurement avec le classement des fragments de pyrolyse par groupements fonctionnels. Chaque chromatogramme est traité séparément avec le logiciel HPCHEM qui permet d'intégrer chaque pic. Chaque pic est ensuite regroupé par groupements fonctionnels, l'ensemble représentant la totalité du spectre. Puis la distribution de chacun des groupements fonctionnels est calculée à partir de la formule suivante :

$$Classe_i(\%) = \frac{(\sum Aire\ pics\ classe_i) \times 100}{\sum Aire\ pics\ totaux}$$

V-10-2. Thermochimiolyse CG/SM

La pyrolyse conventionnelle ayant montré quelques limites notamment avec les composés de type carboxyliques et dans la détection des composés polaires, de nouvelles approches pyrolytiques en utilisant des agents alkylés ont été développées au cours des quinze dernières années. Parmi ces techniques, la thermochimiolyse TMAH (Hydroxyde de TétraMéthylAmmonium) permet d'améliorer ces limites. La plupart des résultats publiés avec cette technique se réfèrent à des substances humiques. La thermochimiolyse des MON aquatiques permet d'isoler des phénols, des alkylphénols, des acides carboxyliques, des esters (LEHTONEN et al. 2000) permettant de fournir des informations sur les marqueurs de la lignine. Il est important de souligner qu'il y a un inconvénient à la thermochimiolyse TMAH, elle ne permet pas la différenciation des esters méthyliques naturels et ceux formés par le TMAH. L'utilisation de l'Hydroxyde de TétraMéthylAmmonium permet de résoudre ce problème. D'une façon générale, la thermochimiolyse TMAH donne des informations complémentaires sur la structure de la matière organique par rapport à la pyrolyse CG/SM.

Cette méthode nécessite une étape au préalable qui permet de méthyler les groupements carboxyles et consiste à faire réagir 100µl d'Hydroxyde de TétraMéthylAmmonium (TMAH), solution 50% massique préparée dans du méthanol avec 2-3 mg de matière organique pendant une nuit à 70°C (LEHTONEN et al. 2000 ; FILLEY et al. 1999). L'échantillon est ensuite introduit dans le tube en quartz et pyrolysé. Le matériel utilisé pour la thermochimiolyse est constitué du même système chromatographique, pyrolyseur et spectromètre que la pyrolyse conventionnelle. La séparation est réalisée sur une colonne apolaire DB-5 MS de 30 mètres. La programmation de température utilisée est légèrement différente qu'en pyrolyse conventionnelle, le pyrolyseur est

chauffé à 450°C avec une rampe de 20°C/ms et un palier final de 20s. Pendant l'analyse, un gradient de température est appliqué au niveau de la colonne variant de 60 à 300°C avec une rampe de 5°C/min.

V-11. Pyrolyse MSSV (Micro Scale Sealed Vessel)

La pyrolyse MSSV est effectuée en collaboration avec un laboratoire situé à l'Université de Curtin (Curtin Water Quality Research Center) à Perth – Australie. Cette technique consiste à chauffer de petites quantités (0,1 - 1 mg) d'extrait (HPO et TPH) dans des petits tubes en verre scellés (5 cm de long x 5 mm). Des perles de verre sont ajoutées au-dessus et dessous de l'échantillon pour combler le volume mort. Les tubes sont ensuite chauffés à 300°C dans une étuve pendant 72 heures. Ils sont ensuite insérés dans l'injecteur à une température de 300 à 540°C avec une rampe de 40°C/min. Un piège à azote liquide au début de la colonne a été utilisé pour piéger les composés volatiles libérés. L'analyse CG/SM est réalisée par un chromatographe Hewlett Packard (HP) 5890 Series II et un spectromètre de masse Autospec UltimaQ. La séparation utilise une colonne capillaire DB5 (25mx0,32mmx0,52µm) et un débit de gaz vecteur, helium (55kPa) de 2,0 mL/min. La figure 2.8 montre la configuration du dispositif de pyrolyse MSSV utilisé.

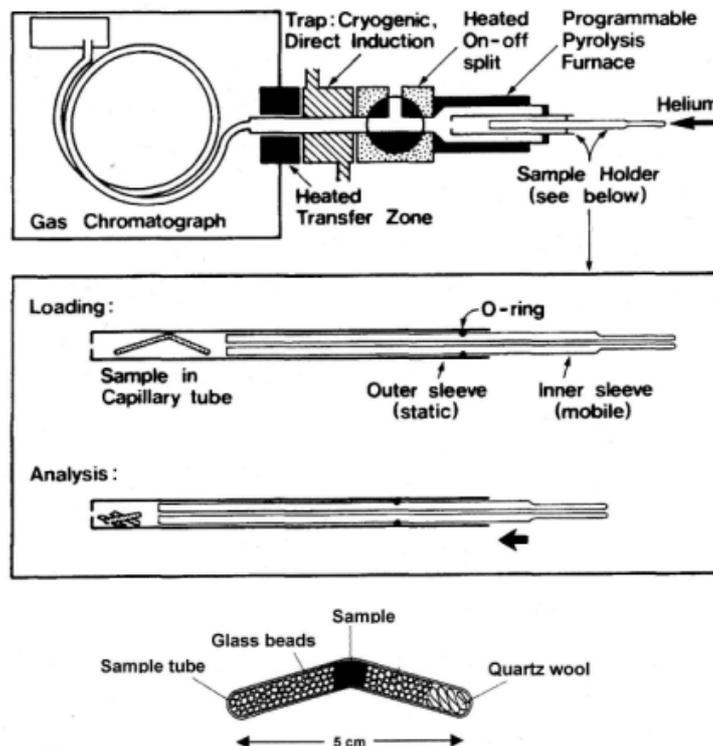


Figure 2.8 : Schéma du pyrolyseur MSSV

La pyrolyse MSSV offre un potentiel important pour la caractérisation moléculaire de la matière organique dissoute des milieux aquatiques mais aussi des sols. En effet, contrairement à la fragmentation généralisée associée à des méthodes de pyrolyse flash, les énergies thermiques plus faibles de la pyrolyse MSSV peuvent fournir un contrôle sur le processus de fragmentation. Cela permet de faciliter la libération pyrolytique douce de produits d'hydrocarbures permettant alors la préservation des informations structurelles des précurseurs

CHAPITRE 3 : EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT ANALYTIQUE DE LA MO SOLUBLE A L'EAU

I. Introduction

Une étude préliminaire consistant à extraire la matière organique soluble des différents horizons par 3 extractions successives ou Protocole 1 (eau froide - température ambiante) ; eau chaude - 80 °C et ultrasons) a été réalisée. Après chaque étape, les phases liquide et solide ont été séparées par centrifugation (11000g). La phase liquide a été filtrée sur une membrane de porosité 0,45 µm et la phase solide a été récupérée pour subir la phase d'extraction suivante. En parallèle et sur des extraits de sol de même provenance une simple extraction par ultrasons ou Protocole 2 a été mise en œuvre suivie des mêmes opérations décrites ci-dessus (e.g. de séparation liquide/solide).

Les deux protocoles mis en place dans ce manuscrit sont présentés ci-dessous dans la figure 3.1 et 3.2. Ils ont fait l'objet d'une optimisation sur des paramètres tels que le temps et la puissance de sonication, la vitesse de centrifugation et l'agitation.

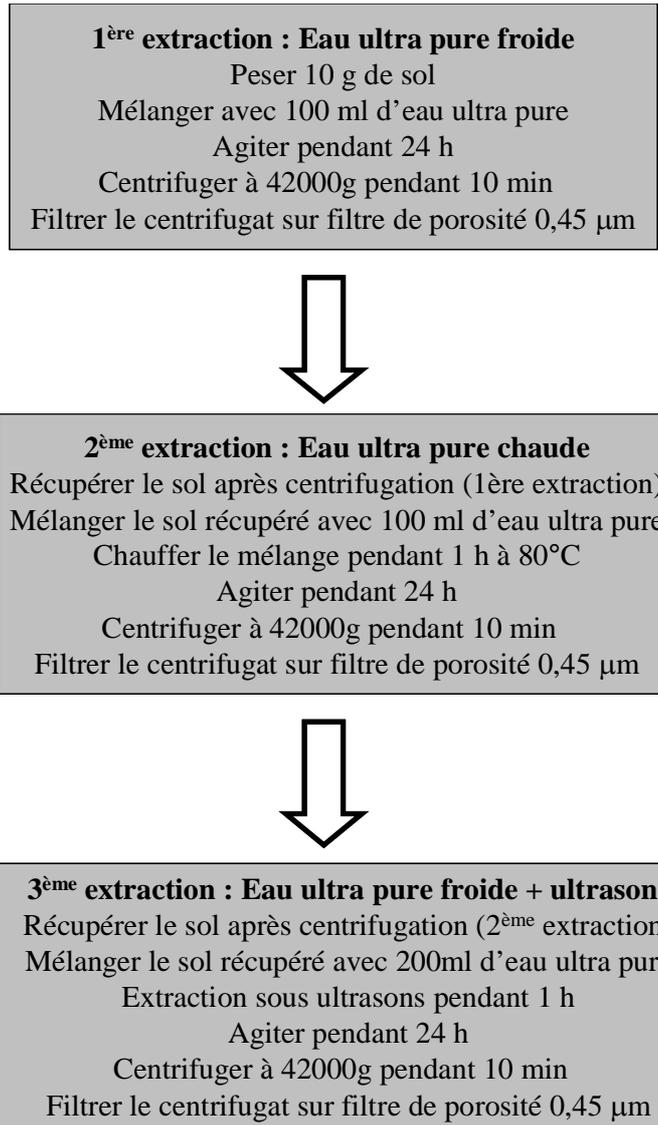


Figure 3.1 : Protocole n°1 extraction multi-étape de la matière organique soluble

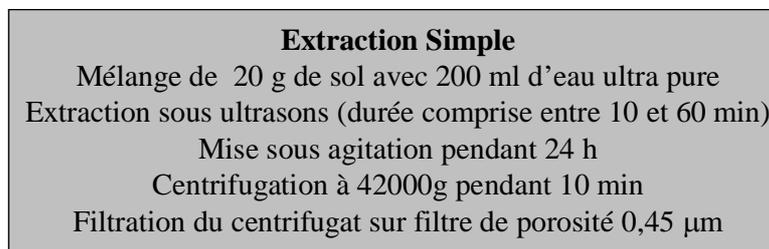


Figure 3.2 : Protocole n°2 extraction simple de la matière organique soluble

II. Extraction de la MO soluble aux ultrasons (US)

II-1. Extraction multi-étape versus extraction simple

Les figures 3.3 et 3.4 comparent les résultats obtenus par ces deux approches expérimentales.

On relèvera dans un premier temps, quelle que soit la méthode utilisée, que la teneur en MO soluble du sol décroît avec la profondeur des horizons. Elle est 10 à 20 fois plus importante dans les horizons de surface (0 – 30 cm) comparativement aux horizons profonds (100 – 200 cm). Les résultats de la figure 1 montrent que chaque phase d'extraction, et ceci quel que soit l'horizon, permet d'isoler des teneurs comparables en COD. La dernière phase aux ultrasons contribue proportionnellement un peu plus au bilan global d'extraction comparativement aux deux autres. On notera enfin que le Protocole 2 qui consiste en une phase unique de mise sous ultrasons, permet d'atteindre des rendements d'extraction semblables au rendement global du Protocole 1. Les travaux développés par la suite ont alors consisté à rechercher les meilleures conditions expérimentales à mettre en œuvre pour optimiser l'extraction des MOS solubles à partir d'un simple contact aux ultrasons.

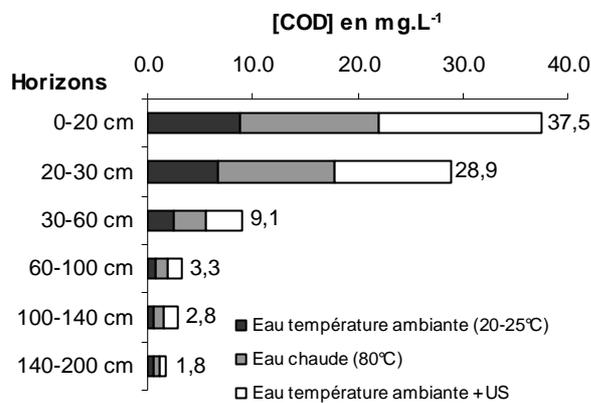


Figure 3.3 : Extraction séquentielle du carbone organique dissous (11000g, Bain à US, 100%)

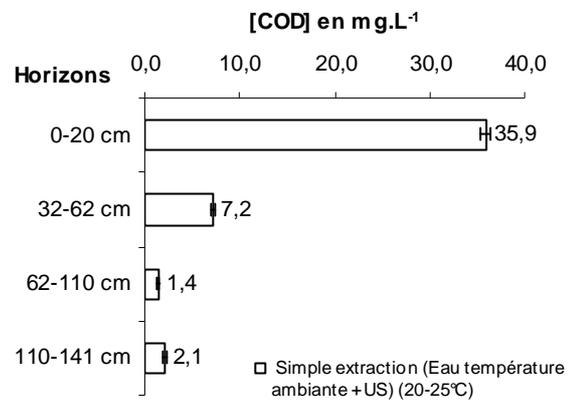


Figure 3.4 : Extraction simple du carbone organique dissous (11000g, Bain à US, 100%)

II-2. Optimisation des conditions d'extraction sous ultrasons

II-2-1. Importance de la phase de séparation par centrifugation

Après tamisage (< 2 mm) et séchage à l'air libre, les différents horizons de sols présentent une texture très fine (microparticules). Leur mise en contact avec l'eau permet l'obtention d'une suspension homogène. La phase d'extraction en est probablement favorisée, toutefois, cette suspension de microparticules particulièrement stable ne permet pas d'opérer une séparation liquide/solide par simple décantation. Des essais de filtration directe sur membrane de porosité 1 µm ou 0,45 µm ont montré les limites de cette méthode liées aux phénomènes de colmatage presque immédiat. La centrifugation a donc été retenue.

Les solutions de sols des différents horizons préparées par extraction aux ultrasons (bain ultrasons, puissance acoustique 100 %, agitation 24 heures après ultrasons) ont été soumises à une phase de centrifugation (10 minutes) suivie par une filtration sur membrane de porosité 0,45 µm. La figure 3.5 donne les teneurs en COD des différentes solutions préparées en fonction de la vitesse de centrifugation utilisée. La vitesse maximale possible avec les équipements disponibles n'a pas excédé 42000g.

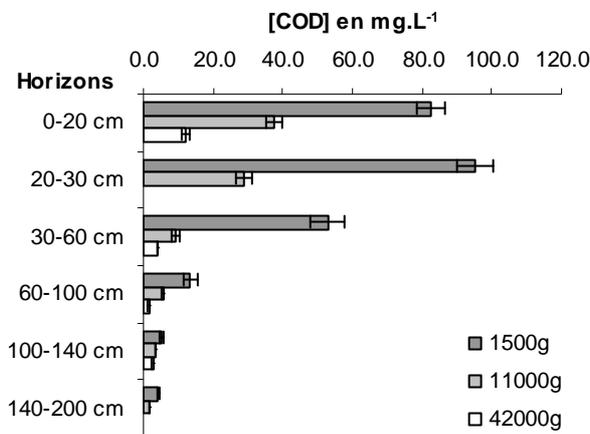


Figure 3.5 : Influence de la vitesse de centrifugation sur l'extraction de la MOS soluble des horizons (Bain à US, 100%, 20 g de sol/200 ml d'eau ultra pure)

La vitesse de centrifugation joue un rôle important sur la concentration en COD des solutions préparées. On relève une diminution très importante des teneurs en COD avec

l'augmentation de la vitesse de centrifugation pour les horizons allant jusqu'à une profondeur de 100 cm. L'impact semble plus modéré pour les horizons les plus profonds (> 100 cm). Ce phénomène étant beaucoup plus marqué en surface il peut s'expliquer par une perte de matière organique adsorbée sur les colloïdes.

Les culots de centrifugation récupérés pour les essais conduits à 42000g on fait l'objet d'une analyse par infrarouge et de la mesure de la teneur en carbone organique. Les teneurs en carbone des dépôts récupérés pour les horizons profonds 62-110 cm et 110-140 cm sont respectivement de 5,6 mg C/g et 5,1 mg C/g. Pour l'horizon de surface elle est beaucoup plus importante comme attendu soit 76,3 mg C/g. Ces teneurs sont plus importantes que celles relevées pour les horizons de sol correspondants démontrant que les microparticules extraites du sol sont des sites d'adsorption préférentiels pour la MOS. Les spectres infrarouges sont présentés sur la figure 3.6. Ces spectres présentent des pics majoritaires attribuables à de la silice (pics aux voisinages de 1000 cm^{-1} et 470 cm^{-1}) démontrant que ces microparticules récupérées au niveau des culots de centrifugation sont des complexes de type argilo-organique pour ne pas dire argilo-humiques. Les substances humiques étant plutôt présentes au niveau des horizons de surface.

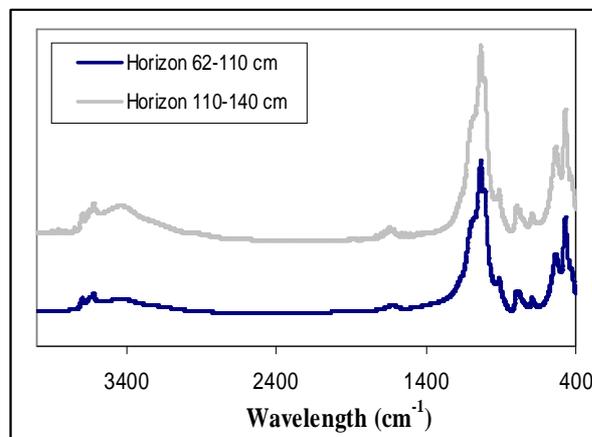


Figure 3.6 : Spectres Infrarouge des culots de centrifugation après 42000 g

II-2-2. Importance du mode et de la durée de mise sous ultrasons

Deux types de générateurs d'ultrasons ont été testés. Le premier est un bain à ultrasons de type Bioblock 86480 (Hautes fréquences 40 kHz) et le second une sonde à ultrasons (Branson B30, sonde de 12,5 mm de diamètre). Pour ces essais le temps de contact a été fixé à 10 minutes. Le bain à ultrasons a été utilisé au maximum de sa puissance, deux puissances (30 % et 100 %) ont été choisies pour la sonde à ultrasons. Les différents résultats obtenus sont regroupés dans la figure 3.7.

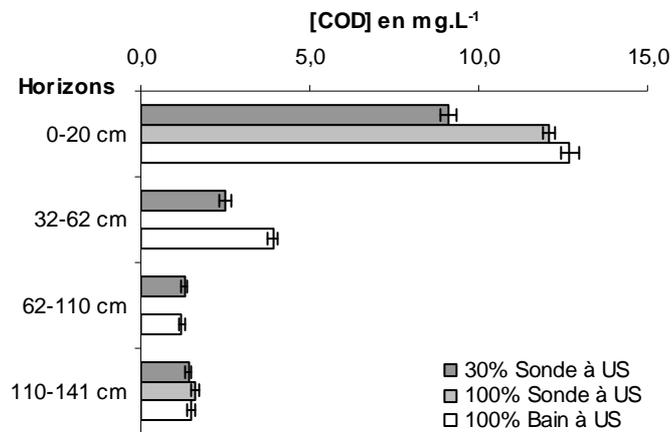


Figure 3.7 : Influence du matériel utilisé sur l'extraction de la MOS soluble des horizons (Temps de contact 10 min, 42000g)

Ces résultats montrent que lorsqu'ils sont utilisés à leur puissance maximale, les deux matériels utilisés (sonde ou bain à US) permettent d'atteindre des rendements d'extraction comparables en MOS solubles pour les différents horizons. Concernant la puissance de travail, les essais réalisés avec la sonde pour deux horizons montrent qu'elle est sans impact vis-à-vis de l'extraction des MO de l'horizon le plus profond (110-140 cm), et présente un effet notable mais peu important pour l'horizon de surface (0-20 cm).

Plusieurs extractions (bain ultrasons, 100 % de la puissance) des différents horizons de sol ont été effectuées afin de déterminer le temps optimal de contact aux ultrasons pour l'extraction des MO solubles. Les résultats sont regroupés sur la figure 3.8.

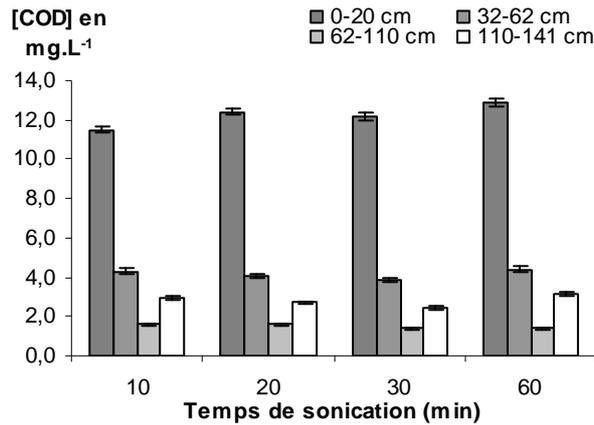


Figure 3.8 : Influence du temps de sonication sur l'extraction de la MOS soluble de différents horizons (Bain à US, 100%, 42000g, 20 g de sol/200 ml d'eau ultra pure)

La quantité de COD extractible pour les quatre horizons semble indépendante du temps de contact (au-delà de 10 minutes, durée minimale retenue pour nos essais). On relèvera toutefois une très légère augmentation de la teneur en COD de la solution de sol de l'horizon 0-20 cm avec l'augmentation de la durée de mise sous ultrasons. Notons que l'horizon 0-20 cm est celui qui est le plus riche en matières organiques et qui possède le plus de colloïdes, ces colloïdes permettant l'adsorption d'une certaine quantité de matière organique. Un temps de contact plus long aux ultrasons permet donc d'attaquer les molécules réfractaires d'où la légère augmentation pour l'horizon 0-20 cm.

II-2-3. Agitation post-US

Quelques essais complémentaires ont eu pour objectif de vérifier la nécessité ou non de compléter l'extraction aux ultrasons par une mise sous agitation prolongée (24 heures) de l'échantillon par retournement. Les résultats obtenus pour l'horizon 0-20 cm et l'horizon 62-110 cm (figure 3.9) montrent qu'une agitation de 24 heures est sans incidence notable sur la quantité de MO solubles extraites. C'est pourquoi, dans le domaine des sols, il est courant d'utiliser des billes de verre pour casser les agrégats. Des résultats comparables ont été obtenus avec les autres horizons de sol. Cette agitation ne semble donc pas avoir d'intérêt au niveau du protocole expérimental.

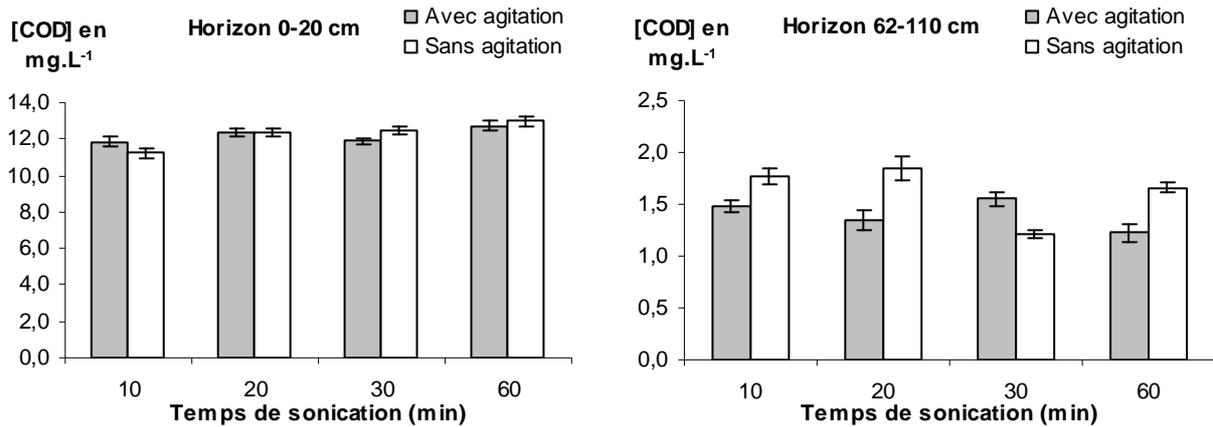


Figure 3.9 : Influence de l'agitation post-Ultrasons sur l'extraction des MOS solubles (Bain à US, 42000g, 100%, 20 g de sol/200 ml d'eau ultra pure)

II-2-4. Bilan

La figure 3.10 fait le bilan des quelques séries d'extractions réalisées sur les différents horizons de sol à partir de la même procédure expérimentale (20 g sol/200 mL d'eau MilliQ ; Bain ultrasons puissance 100 % ; centrifugation 42000 g). Les barres d'erreur montrent que le protocole d'extraction est reproductible. Ces résultats confirment la très forte diminution des MOS solubles avec la profondeur. Elle est environ 10 fois plus faible à 1 mètre de profondeur comparativement aux premiers centimètres. La figure 3.11 donne les valeurs d'azote total pour les différents horizons. Les teneurs en azote diminuent également avec la profondeur. La présence de nitrates à l'état de trace a été détectée pour tous les horizons. La détermination des teneurs en azote organique par différence reste toutefois trop entachée d'erreur pour être tentée. Peu de travaux existent concernant l'extraction de la matière organique soluble à l'eau. Si l'on compare ces résultats à quelques résultats existants dans la littérature (DELPRAT et al. 1997 ; MICHALZIK et MATZNER, 1999), on remarque que la diminution de la matière organique soluble avec la profondeur des horizons observée dans nos résultats est en accord avec celle observée dans la littérature.

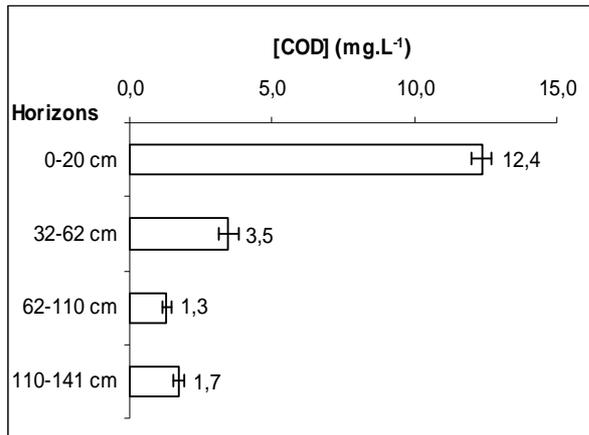


Figure 3.10 : Concentration moyenne en COD extrait par ultrasons (42000 g, bain à US, 100%, 20 g/200 ml)

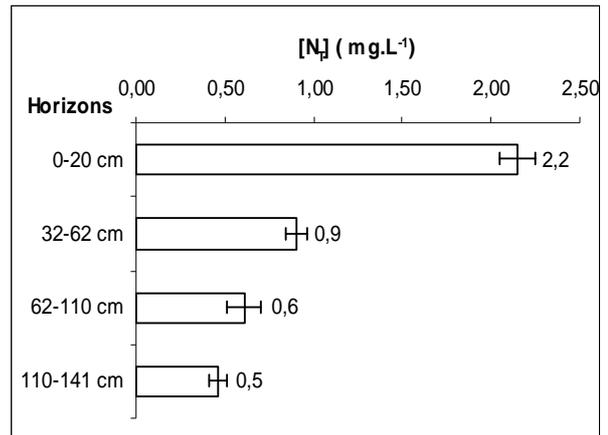


Figure 3.11 : Concentration moyenne en N_T extrait par ultrasons (42000 g, bain à US, 100%, 20 g/200 ml)

A l'appui des teneurs en carbone organique total des différents horizons déterminées par analyse élémentaire (INRA), le tableau 3.1 donne les pourcentages en carbone organique soluble des différents horizons du sol étudié. Les données obtenues montrent que la fraction de MOS solubles à l'eau pure représente environ 1 % du carbone organique total des différents horizons.

Tableau 3.1 : Pourcentage du carbone représenté par le COD extrait

Horizons	Carbone organique total en mg/g de sol	Carbone organique soluble en mg/g de sol	Carbone organique soluble en %
0-20 cm	9,62	0,124	1,3
32-62 cm	3,48	0,035	1,0
62-110 cm	2,74	0,013	0,5
110-141 cm	1,83	0,018	1,0

II-2-5. Comparaison des concentrations en carbone obtenues par extraction eau + US versus méthodes traditionnelles (NaOH et CaCl₂)

L'efficacité du protocole optimisé a été comparée à celle de protocoles d'extraction plus traditionnellement utilisés dans l'étude des sols : l'extraction à la soude (USSIRI et

JOHNSON, 2002) et l'extraction au chlorure de sodium (CORVASCE et al. 2006, ZSOLNAY, 2003)

Les résultats des analyses COD et SUVA (SUVA=Absorbance UV254 nm/COD pour un trajet optique de 1 mètre) des différentes solutions sont regroupés dans les figures 3.12 et 3.13.

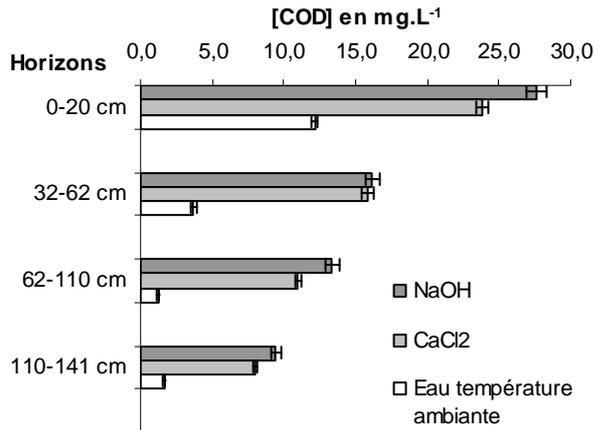


Figure 3.12 : Concentration en carbone des différents horizons obtenus pour les 3 extractions

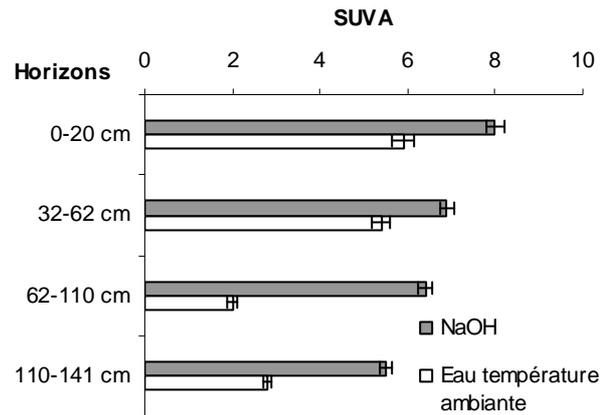


Figure 3.13 : SUVA (L.mg⁻¹.m⁻¹) des différents horizons pour les extractions NaOH et à l'eau

Comparativement à l'eau pure (pH voisin de la neutralité) et comme attendu, les techniques d'extraction avec NaOH et CaCl₂ permettent d'extraire des quantités de MO plus importantes (et comparables) quel que soit l'horizon retenu. Dans l'horizon de surface, la fraction de MO solubles dans l'eau pure représente environ la moitié (44%) du carbone organique extractible à la soude, cette contribution chute à 10-20 % pour les horizons profonds. La quantité de MO soluble décroît avec la profondeur du profil. Cette MO soluble présente un caractère aromatique moins marqué que celle isolée en milieu sodique comme l'atteste les plus faibles valeurs de SUVA.

Le protocole d'extraction utilisé joue donc un rôle important dans la quantité de matière organique soluble extraite. La soude permet d'extraire plus de COD que l'eau à température ambiante, ces résultats sont confirmés par les travaux de USSIRI et JOHNSON en 2002. Cependant, l'utilisation de la soude peut être risquée et altérer la structure chimique du COD.

III. Caractérisation des solutions de sol

III-1. Fractionnement analytique sur résines XAD

Le fractionnement analytique du COD des échantillons issus des plaques lysimétriques et des bougies poreuses a été réalisé par filtrations successives sur résines XAD-8/XAD-4. Les figures 3.14 et 3.15 donnent les proportions relatives des différentes fractions HPO, TPH et HPI.

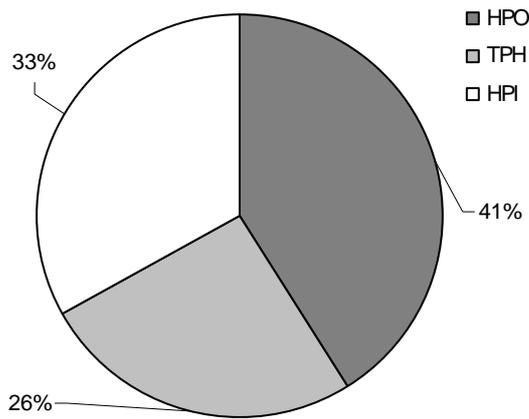


Figure 3.14 : fractionnement sur résines XAD d'eau collectée au niveau de plaques lysimétriques situé à une profondeur de 105 cm (2.0 mg.L^{-1} COD)

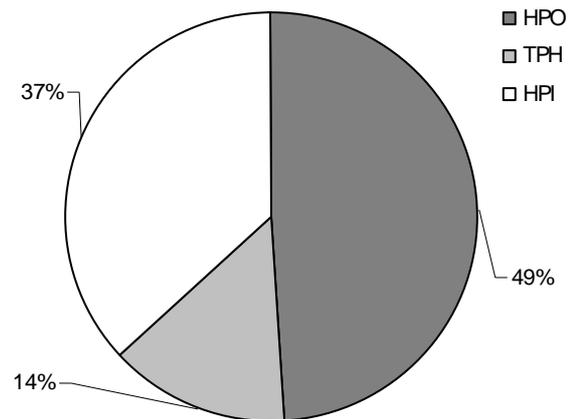


Figure 3.15 : fractionnement sur résines XAD d'eau collectée au niveau de bougies poreuses situé à une profondeur de 105 cm (2.2 mg.L^{-1} COD)

Les distributions du COD établies pour les eaux des plaques lysimétriques et pour les bougies poreuses sont relativement comparables et similaires à celles retrouvées pour les eaux naturelles (CROUE, 2004). La bonne répétabilité de la méthode (pour les plaques HPO : 48% et 41 % ; TPH : 22 et 26 % ; HPI : 30 et 33 %) nous permet de considérer que les eaux des plaques sont proportionnellement un peu plus riches en substances non humiques (i.e. fractions TPH + HPI). Ces résultats démontrent une prédominance de la fraction HPO (40 à 50 %) pour les deux types d'eau. Les fractions plus hydrophiles sont représentées par une prédominance de la fraction HPI, caractéristiques retrouvées pour les eaux souterraines comparativement aux eaux de surface qui vérifient une teneur plus importante en fraction TPH généralement (MALCOLM et MACCARTHY, 1992).

Le même fractionnement a été opéré sur une solution de l'horizon de sol 110-141 cm extraite aux ultrasons (figure 3.16). Cette solution a été concentrée par évaporation rotative sous pression réduite avant centrifugation afin de minimiser le temps de cette opération compte tenu du volume important préparé. Cette phase de concentration s'est accompagnée d'une perte en COD importante par co-précipitation avec les microparticules de sol. Cette perte en COD est probablement à l'origine de la distribution obtenue qui montre une large prédominance de la fraction HPI (adsorption et perte préférentielle de substances les plus hydrophobes).

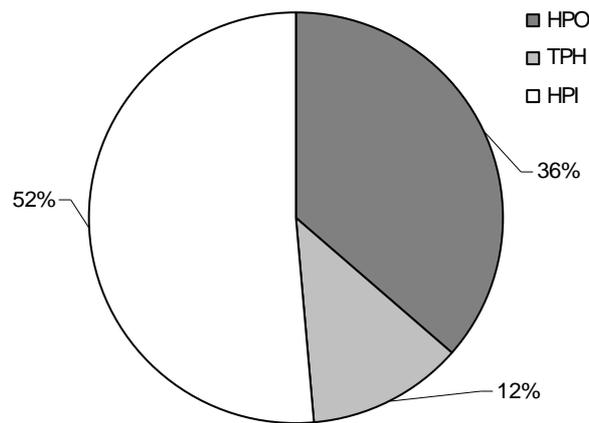


Figure 3.16 : Fractionnement sur résines XAD de la solution de sol extraite par ultrasons (horizon 110-141 cm, 42000g, bain à US, 20 g/200 ml)

III-2. Analyse en chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion haute performance (HPSEC) est une méthode de plus en plus utilisée pour caractériser les eaux naturelles et les eaux en cours de traitement. Le couplage avec une détection COD permet d'obtenir une empreinte chromatographique de la matrice organique qui tient compte de la distribution de taille des molécules constitutives. La double détection UV/COD permet de préciser le caractère aromatique de certaines fractions du profil chromatographique. On rappellera qu'avec la HPSEC les molécules de grosses tailles (hautes masses moléculaires) sont chromatographiées en premier car exclues de la porosité du gel. Le temps de rétention est inversement proportionnel à la taille moléculaire.

III-2-1. Matières organiques solubles isolées des horizons de sols par ultrasons

La figure 3.17 compare les profils HPSEC/COD des solutions de sols (extraction par ultrasons) des différents horizons. Des chromatogrammes similaires ont été obtenus avec une détection UV, seule l'intensité des bandes chromatographiques a varié. Pour une meilleure comparaison et compte tenu des écarts importants des teneurs en COD des différentes solutions de, les chromatogrammes sol ont été normalisés sur le pic voisin de 40 minutes (quelques milliers de daltons). Cette bande large centrée au voisinage de 40 minutes correspond aux substances humiques, fraction qui semblent présenter une masse moléculaire moyenne légèrement plus importante (domaine de temps de rétention plus faibles) pour les horizons 0-20 cm et 20-30 cm que pour les horizons plus profonds.

Quelle que soit la solution analysée on remarquera que le profil chromatographique s'étale sur le même domaine de temps de rétentions i.e. même domaine de masse moléculaire. Le résultat le plus marquant est l'augmentation proportionnelle des molécules de plus petites tailles moléculaires avec la profondeur de l'horizon considéré. Comparativement aux horizons supérieurs riches en substances humiques les horizons profonds 60-100 cm et surtout 100-140 cm se caractérisent par une proportion importante de molécules de plus petites tailles i.e. masses moléculaires. Selon HUBER et FRIMMEL (1991) les pics centrés sur 50 minutes et au-delà pourraient correspondre à des structures polaires de types diacides. On notera que le pic voisin de 30 minutes de temps de rétention (plusieurs dizaines de milliers de daltons) est présent quel que soit l'horizon, pic attribué au mélange de structures de types polysaccharides et protéines.

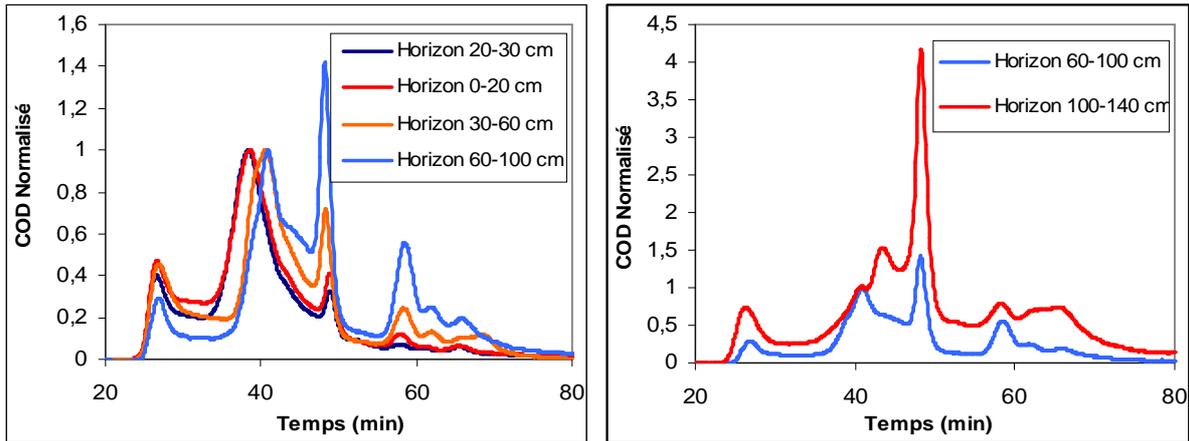


Figure 3.17 : Chromatogrammes HPSEC/COD des solutions de sols obtenues par extraction aux ultrasons (20 g de sol, 200 ml d'eau MilliQ, bain ultrasons puissance 100 %, séparation liquide/solide par centrifugation 42000g, filtration finale sur membrane 0,45 μm)

III-2-2. Comparaison avec les matières organiques solubles isolées des plaques lysimétriques et des bougies poreuses

Les chromatogrammes HPSEC/COD des eaux collectées au niveau des plaques lysimétriques et bougies poreuses à une profondeur de 105 cm sont présentés figure 3.18. Ces chromatogrammes montrent des profils relativement similaires avec une bande prédominante centrée vers les 50 minutes correspondant à des structures de faibles masses moléculaires (<400-500 g/mol). Les MO solubles des bougies semblent proportionnellement plus riches en structures à caractères humiques (masses moléculaires intermédiaires), résultats pouvant provenir d'un mode de collecte par succion favorisant l'entraînement de structures de MM plus élevées.

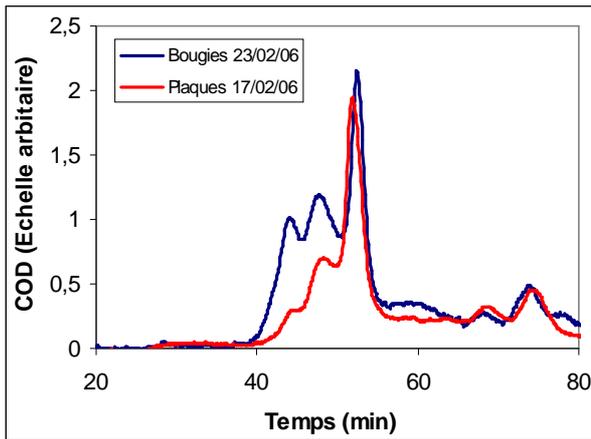


Figure 3.18 : Chromatogramme HPSEC/COD des eaux provenant des plaques lysimétriques et bougies poreuses du site ORE de Lusignan

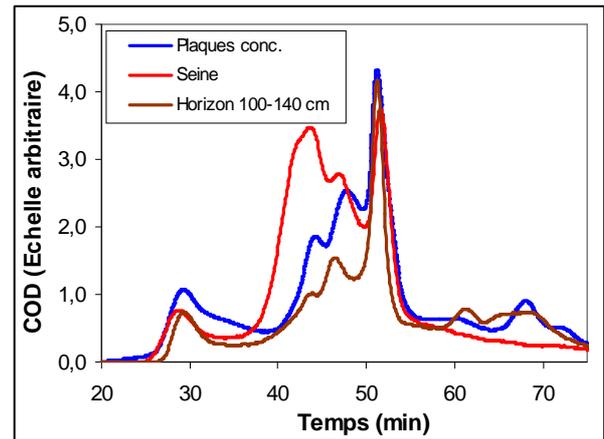


Figure 3.19 : Chromatogramme HPSEC/COD des eaux provenant des plaques lysimétriques, de la solution de sol horizon 100-140 cm (extraction ultrasons) et de la Seine (amont de Paris)

La figure 3.19 compare les profils HPSEC/COD des eaux de plaques lysimétriques (profondeur 105 cm) avec celle de la solution de sol de l'horizon 100-140 (extraction ultrasons) et la Seine prélevée en amont de Paris. Les eaux des plaques ont été concentrées par évaporation rotative sous vide réduit de manière à augmenter artificiellement la teneur en COD de la solution pour une meilleure comparaison.

Le profil enregistré pour les eaux de plaques est similaire à celui obtenu pour la solution de sol horizon 100 -140 cm avec toutefois une proportion un peu plus importante de structures de moyennes et hautes masses moléculaires. Le profil de la Seine (exemple d'eau de surface) montre la présence des structures de type substances humiques absentes des profils des eaux issues d'horizons profonds de sol. Encore une fois, il est aussi important de noter pour toutes ces eaux, la présence de protéines et polysaccharides de hautes masses moléculaires dont l'origine, pour les eaux de surface, est attribuée à une activité microbienne (résidus microbiens). La disparition des structures de type humique de plus haute masse moléculaire dans les horizons profonds peut s'expliquer par des phénomènes d'adsorption des substances humiques sur la phase minérale/argiles (KALBITZ et al. 2005) située dans les horizons intermédiaires ou par des phénomènes de dégradation préférentielle des substances humiques par les microorganismes. On peut notamment citer les travaux de GRINHUT et al. 2007 sur l'étude de la dégradation des substances humiques par les champignons, qui montre que les couches supérieures sont composées d'une plus grande proportion de champignons

capables de dégrader les substances réfractaires dont font parti entre autre, les substances humiques (MACCARTHY, 2001) des horizons de surface.

IV. Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis dans un premier temps d'élaborer un protocole d'extraction à l'eau de la MO. Ce protocole joue un rôle important dans la quantité de MO extraite. En effet, la comparaison des concentrations obtenues à l'eau avec celles obtenues par des méthodes d'extraction classique (NaOH et CaCl₂) montre que ces méthodes permettent d'extraire environ 50 % de carbone en plus en surface et de l'ordre en 10 à 20 % en profondeur par rapport à l'eau. Cette fraction soluble dans l'eau (COD) représente une proportion très faible du carbone total des sols (environ 1%).

Dans un second temps, la caractérisation de la matière organique extraite à l'eau montre une distribution proche de celle observée dans les eaux naturelles (CROUE, 2004). Les horizons profonds sont cependant proportionnellement un peu plus riches en substances non humiques (i.e. fractions TPH + HPI). La MO des horizons profonds possède également un caractère aromatique plus faible (SUVA faible) et une proportion de composés de faibles masses moléculaires plus importante.

CHAPITRE 4 : DYNAMIQUE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE SOLUBLE DANS LES HORIZONS PROFONDS

I. Introduction

L'élément central est la matière organique (MO) du sol qui, au travers de sa dynamique détermine notamment les flux de carbone et d'azote. Le but de ces travaux est d'étudier l'impact des modes de gestion des surfaces prairiales sur les matières organiques des sols en particulier sur les flux de carbone et d'azote dans les horizons profonds. A ce jour, les matières organiques hydrosolubles n'ont que rarement été prises en considération, or elles représentent une proportion non négligeable de carbone tout au long du profil compte tenu de l'épaisseur des différents horizons.

Les parcelles étudiées sont équipées de plaques lysimétriques et de bougies poreuses permettant de prélever les eaux à une profondeur de 105 cm. En parallèle, des mesures de températures et d'humidité du sol sont réalisées. Le site est également équipé des trois monolithes proches des parcelles sur lesquels nous avons faits quelques prélèvements d'eau à différentes profondeurs. Les travaux ont porté majoritairement sur le suivi des teneurs en matières organiques dissoutes (COD) au niveau des eaux collectées par bougies poreuses et plaques lysimétriques à 1 mètre de profondeur. L'objectif étant d'apprécier un éventuel impact des saisons, des modes de gestion sur les teneurs en COD mais aussi d'étudier l'évolution du COD en fonction de la profondeur grâce aux monolithes.

En complément quelques analyses directes (spectrofluorimétrie, spectrophotométrie et chromatographique d'exclusion de taille) ont été réalisées sur des échantillons particuliers pour tenter d'apporter également une réponse structurale à ce suivi quantitatif.

Dans un premier temps, nous aborderons le suivi quantitatif et qualitatif des eaux au niveau des parcelles. Nous étudierons pour cela la quantité du COD, de l'azote total et l'impact des conditions climatiques, du mode de gestion ainsi que du mode de prélèvement. Puis, dans un second temps nous parlerons de la caractérisation des eaux collectées à différentes profondeurs au niveau des monolithes. Enfin nous étudierons l'impact de la sécheresse sur la quantité et la qualité de la matière organique soluble.

II. Les matières organiques des eaux du sol : approche quantitative

II-1. Suivi du COD en fonction de la profondeur

Les monolithes ont permis de suivre la dynamique du COD en fonction de la profondeur. Sur les trois monolithes mis en place sur le terrain dans le courant de l'année 2008 (opérationnels début 2009), de l'eau est collectée aux différentes profondeurs par l'intermédiaire des bougies poreuses. Cette collecte dépend des conditions d'humidité du sol et ne peut être faite qu'à saturation en eau du sol. D'où le peu de données récoltées au cours de l'année 2009. Les résultats moyens en COD obtenus sur ces échantillons sont présentés dans la figure 4.1.

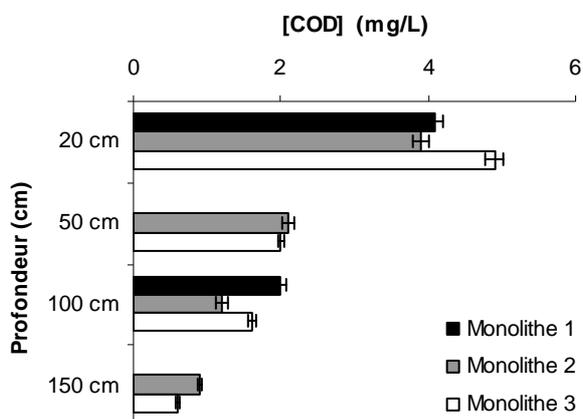


Figure 4.1 : Evolution moyenne du carbone organique dissous entre novembre 2008 et juin 2009 des eaux collectées aux différentes profondeurs sur les trois monolithes.

Le COD diminue considérablement avec la profondeur pour les trois monolithes. Dans les horizons supérieurs (0-30 cm), il varie entre 3,5 et 5mg/L et diminue jusqu'à atteindre des valeurs comprises entre 0,5 et 1,2 mg/L. Les eaux des plaques situées à 2 mètres de profondeur présentent un COD moyen de 0,6 mg/L (moyenne faite sur 4 mois : entre 13/11/2008 et le 13/03/2009).

Ces résultats sont en accord avec les quelques données de la littérature (TRAVERSA et al. 2008 ; DELPRAT et al. 1997 ; EMBACHER et al. 2007) et avec celles présentées dans le chapitre précédent relatif au carbone organique extractible à l'eau pour les différents

horizons du sol (chapitre 3) correspondant à une diminution du carbone organique soluble avec la profondeur. Cette observation est également en accord avec la diminution progressive des teneurs en carbone organique avec la profondeur.

II-2. Suivi du COD et de l'azote total (N_T) des eaux collectées au niveau des horizons profonds

L'essentiel des résultats présentés dans ce paragraphe proviennent des échantillons collectés au niveau des parcelles cultures/prairies par plaques lysimétriques (PL) et bougies poreuses (BP) placées à 105 cm de profondeur. Quelques analyses réalisées sur une période beaucoup plus courte sur les eaux collectées à 2 mètres de profondeur au niveau des monolithes viennent compléter le suivi sur les parcelles.

D'un point de vue général, nous avons décidé de nous focaliser principalement sur les valeurs de COD, l'azote total englobant une large proportion d'azote minéral. De plus, nous avons choisi de nous arrêter pour l'essentiel sur les résultats obtenus à partir des échantillons collectés par les plaques lysimétriques et ceci pour différentes raisons. Tout d'abord, la collecte d'échantillons par les plaques s'opère dans des conditions d'écoulement naturel, contrairement aux bougies poreuses qui nécessitent une succion pouvant exacerber l'entraînement du carbone organique en solution. Enfin les plaques lysimétriques nous apportent un plus grand nombre de données analytiques que les bougies poreuses, dont la mise en service est limitée par leur mode de fonctionnement qui nécessite un taux de saturation en eau du sol suffisant.

Toutefois, nous présentons une comparaison des résultats plaques/bougies pour la parcelle T1. Les autres résultats présentés par la suite concernent les parcelles T2, T3 avec apport d'azote et T4 sans apport d'azote.

L'ensemble des résultats obtenus sur les échantillons prélevés en 2007 et 2008 ainsi que l'évolution de la température du sol à 1m de profondeur à proximité des points de collecte est présenté dans les figures 4.2, 4.4, 4.5 et 4.6. Les données de la température à 1m ont été remplacées par le suivi de la pluviométrie cumulée dans la figure 4.3. Ces résultats correspondent à la moyenne des données obtenues pour les bougies et les plaques échantillonnées sur la même parcelle avec 3 analyses effectuées par échantillon.

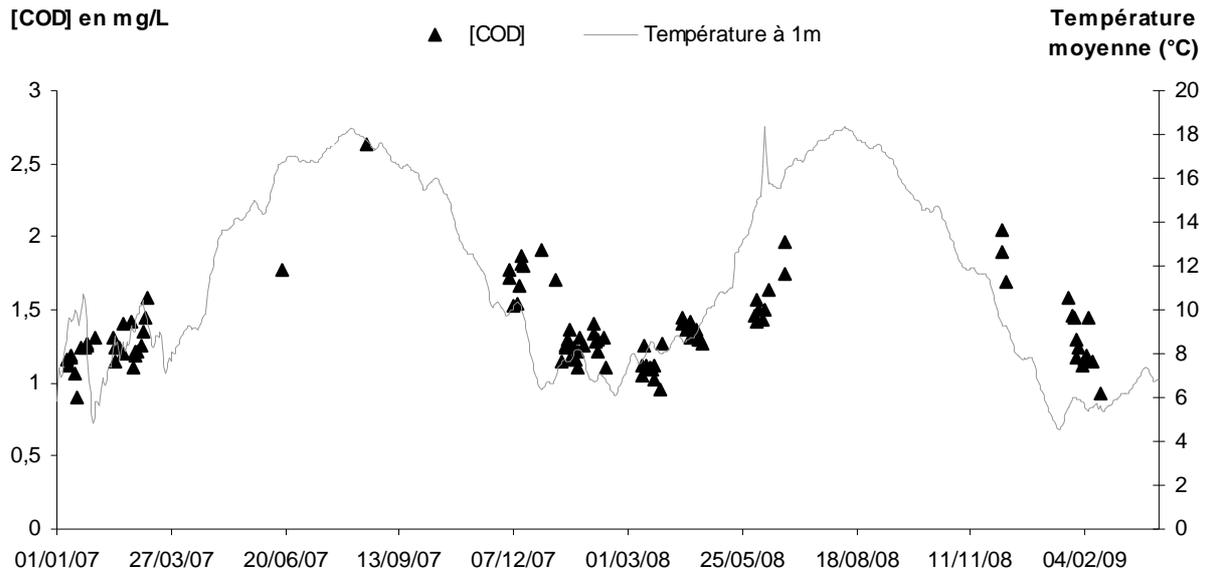


Figure 4.2 : Dynamique du carbone dans les eaux collectées au niveau des plaques lysimétriques du traitement T1 (avec azote)

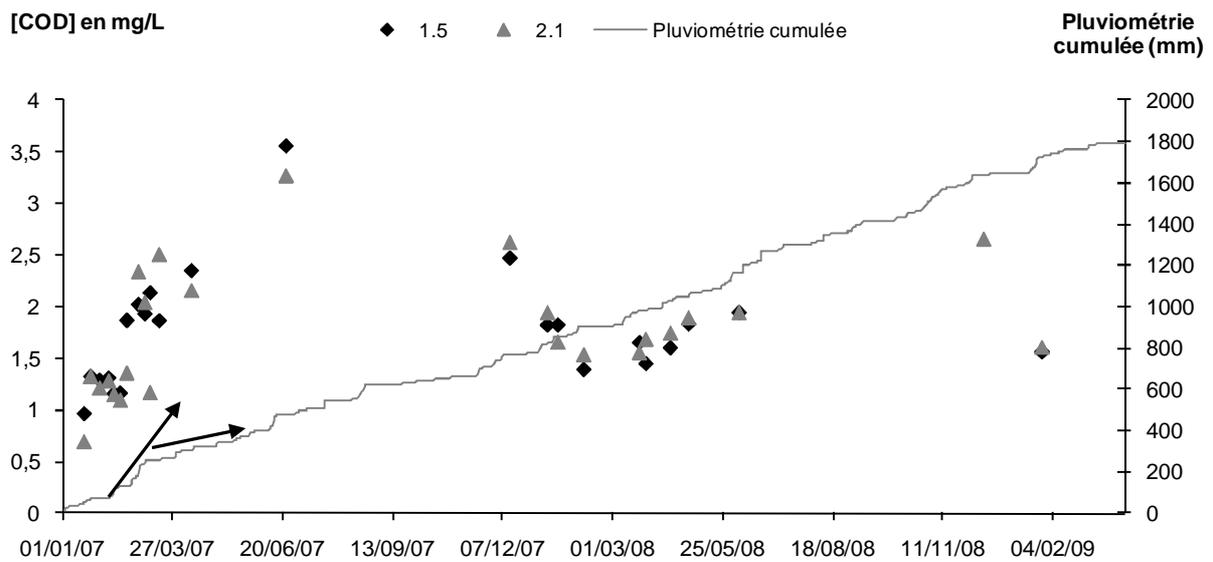


Figure 4.3 : Dynamique du carbone dans les eaux collectées au niveau des bougies poreuses du traitement T1 (avec azote) (Parcelles 1.5 et 2.1)

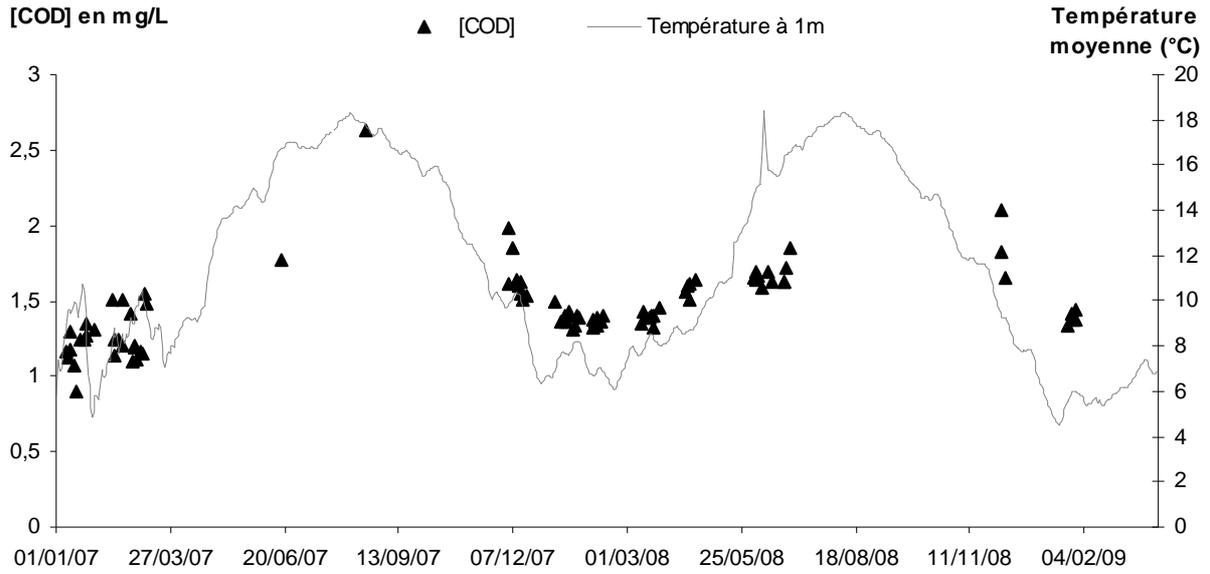


Figure 4.4 : Dynamique du carbone dans les eaux collectées au niveau des plaques lysimétriques du traitement T2 (avec azote)

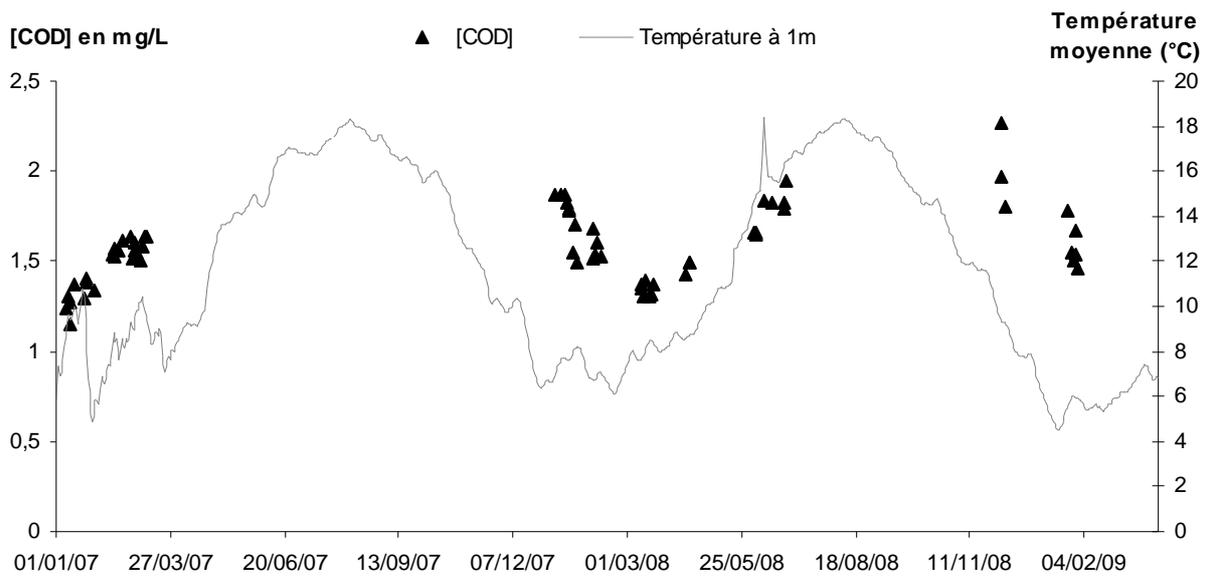


Figure 4.5 : Dynamique du carbone dans les eaux collectées au niveau des plaques lysimétriques du traitement T3 (avec azote)

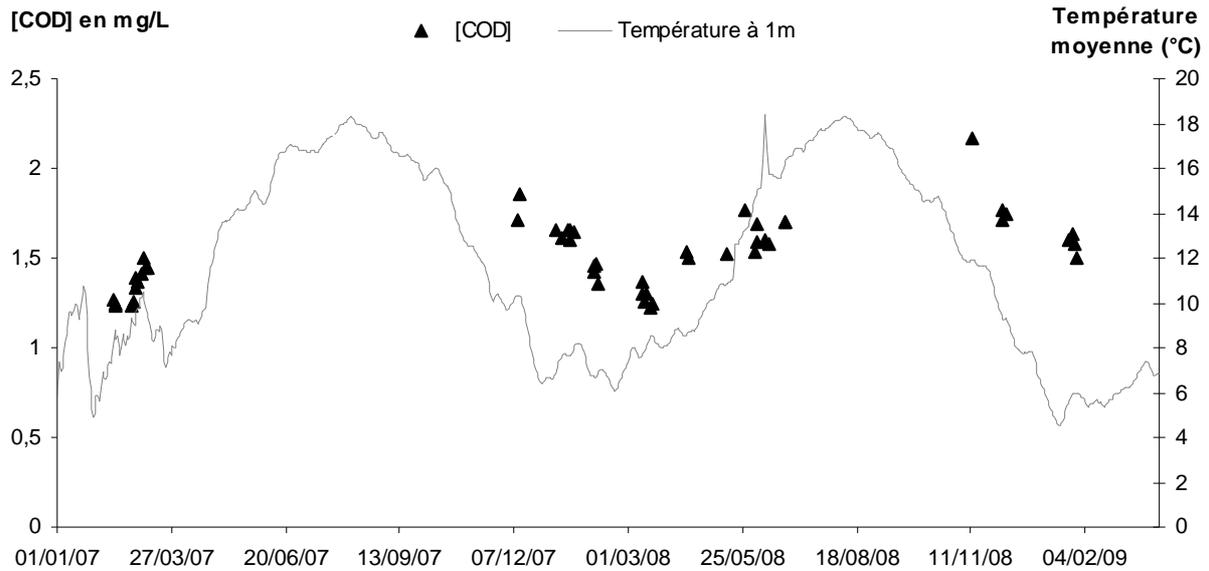


Figure 4.6 : Dynamique du carbone dans les eaux collectées au niveau des plaques lysimétriques du traitement T4 (sans azote)

II-2-1. Influence des conditions climatiques : température, pluviométrie

L'observation des figures 4.1 à 4.6 permet de mettre en évidence une augmentation de la concentration en COD en période estivale puis une diminution en période hivernale. Cette évolution est observée au cours des trois années d'expérimentation.

Si on regarde plus en détail, on note pendant la période qui va de janvier 2007 à avril 2007 une augmentation de la teneur en COD, quelles que soit les parcelles, de 1 à 2.5 mg/L de COD entre l'hiver et le milieu du printemps, le COD a pratiquement doublé. En ce qui concerne le point particulier (juin, juillet ou août en fonction des parcelles), après plusieurs mois d'absence d'échantillons, on observe une augmentation très importante du COD jusqu'à 3-4 mg/L de COD. Puis, l'automne 2007 n'ayant pas permis d'échantillonner, les dernières valeurs observées en 2007 ont été obtenues au cours du mois de décembre. Elle montre une diminution de la concentration en carbone organique dissous et un retour aux valeurs initialement observées au début de l'année 2007.

Les mêmes observations ont été mises en avant au cours de l'année 2008 avec une augmentation du COD dans les premiers mois puis une diminution en fin d'année 2008 pour revenir à nouveau aux concentrations initiales.

Les observations faites pendant les années 2007 et 2008 ont donc mis en évidence un schéma probable de la dynamique temporelle du COD, avec dans un premier temps en début d'année, une augmentation de la concentration en COD puis dans un second temps une diminution de cette concentration en fin d'année.

Les prélèvements réalisés à 2 mètres de profondeurs par le lysimètre situé à la base des monolithes, confirment sur une période allant de Novembre 2008 et Mai 2009, l'augmentation progressive du COD avec l'élévation de la température du sol (figures 4.7 et 4.8). Les trois monolithes ont montré les mêmes tendances.

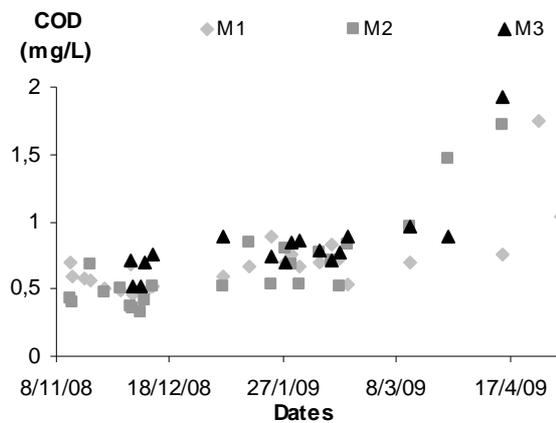


Figure 4.7 : Suivi du COD à 2 m de profondeur en fonction du temps des trois monolithes (M1, M2 et M3)

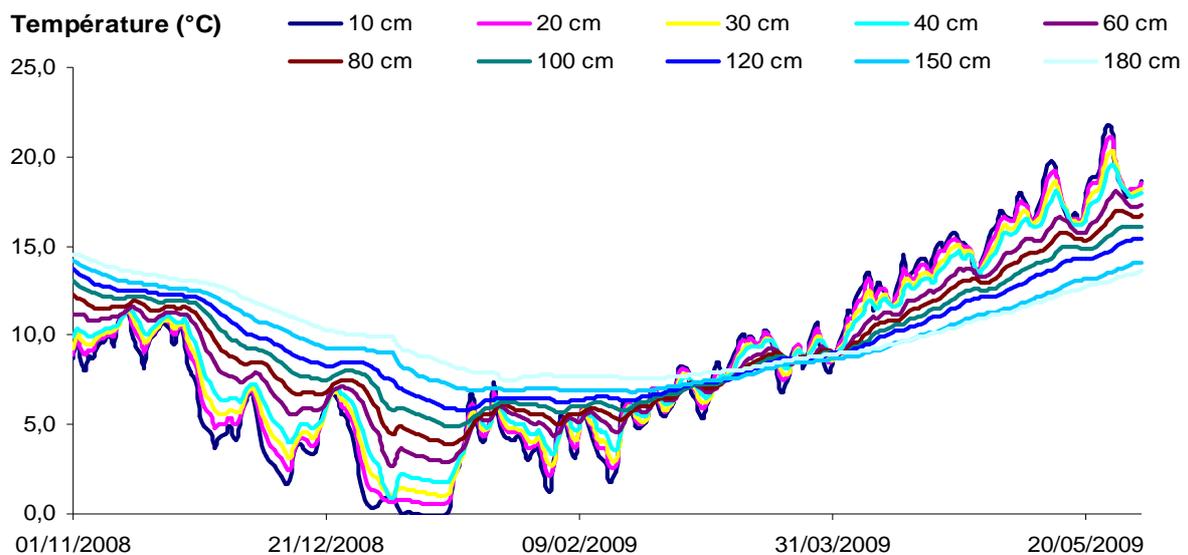


Figure 4.8 : Suivi de la température sur le monolithe 1

En début de période hivernale, le COD semble constant, proche de 0,5 mg/L en moyenne puis augmente légèrement approchant 0,8 mg/L à la fin du mois de Janvier 2009. Au mois de Mars, on observe une augmentation significative de la quantité de matière organique dissoute. De la même manière que pour les eaux collectées à 105 cm, si l'on regarde le profil de température des monolithes (figure 4.8), on remarque que cette augmentation est accompagnée d'une élévation de température.

Le réchauffement du sol entraîne vraisemblablement une augmentation de l'activité biologique qui pourrait donc induire une élévation de la teneur en COD des eaux profondes. Une température plus élevée pourrait également favoriser la mise en solution des matières organiques.

L'allure générale de cette évolution du COD en profondeur en fonction du temps, quelle que soit la parcelle étudiée, est à rapprocher de celle de la température du sol. Celle-ci présente une amplitude de variation significative entre l'été et l'hiver puisqu'elle passe de 8 à 18 °C. L'impact de la pluviosité est moins démonstratif, toutefois il est à noter une augmentation du COD dans les eaux qui s'écoulent au niveau des horizons profonds lors d'évènement pluvieux. Ce phénomène faisant suite à des périodes de sécheresse ou faible pluviosité prolongées (printemps-été) ou de pluies modérées (période automnale) (figure 4.3). L'abondance de pluie devant être suffisante pour assurer un écoulement en profondeur.

La forte corrélation observée entre température du sol et teneur en COD dans les eaux collectées en profondeur est associée :

A une augmentation probable de l'activité microbiologique dans le sol favorisant la libération du carbone soluble (exsudats et lyses cellulaires, processus de transformation, de dégradation enzymatique). Plusieurs travaux appuient cette hypothèse, on peut citer les travaux menés par FREEMAN et al. (2001) qui ont montré que l'étape cinétiquement limitante de la décomposition de la matière organique est l'hydrolyse enzymatique des composés organiques de hautes masses moléculaires en plus petites molécules utilisables par les microorganismes. Cette décomposition est due à des enzymes, (la phénoloxydase par exemple), qui sont sensibles aux conditions climatiques. Plus la température est élevée, plus l'enzyme est stimulée. Mais également ceux de MATLOU et al. (2006) qui suggèrent que l'effet de la température affecte la production de COD indirectement, c'est-à-dire que plus la

température est haute, plus la saison de croissance est longue et donc plus il y aura de déchets biologiques qui est la première source de COD.

A une augmentation de la solubilité des matières organiques du sol. Quelques travaux appuient cette hypothèse. On peut citer, TIPPING et al. (1999), en Angleterre qui avait équipé ses trois sites d'étude de lysimètres placés à 28 cm de profondeur. Sur l'un des trois sites, il avait étudié l'influence de la température en chauffant un lysimètre. A une profondeur de 0,8 cm, la température du sol était plus élevée de 2,8 °C que les autres lysimètres du même site. Il a remarqué une augmentation de la solubilité donc de la concentration du COD dans les premiers temps mais l'augmentation est restée transitoire avec un retour aux valeurs initiales. Les travaux de TIPPING et al. (1999) montrent comme dans ce manuscrit, une dynamique cyclique du COD avec une augmentation puis une diminution. Les travaux de EVANS et al. (2005) ont montré une augmentation de 0,75°C entre la période 1988-2002. Cette augmentation s'est accompagnée d'une augmentation moyenne de COD de 91% relative à la période 1988- 1993 dans les onze lacs et onze rivières qui constituent le site d'étude. Cependant des travaux sont en opposition avec cette observation par exemple WILSON et WILLIAMS (2006) qui ont chauffé le sol grâce à des conduites chauffantes insérées dans le sol. Ils n'ont pas relevé d'influence de la température sur la concentration en COD.

II-2-2. Comparaison plaques/bougies

On remarque dans un second temps une évolution des teneurs en COD similaire pour les plaques lysimétriques et les bougies poreuses, montrant ainsi que le mode de collecte des eaux n'intervient pas dans la dynamique du carbone organique dissous. Les autres traitements étudiés confirment cette évolution. Cependant, même si le mode de prélèvement ne semble pas influencer la dynamique temporelle du COD, il est quand même bon de noter que les concentrations en COD observées sont plus importantes pour les bougies poreuses. Ceci peut s'expliquer par le mode de collecte par succion des bougies qui doit entraîner plus de composés carbonés que lors d'un drainage naturel avec les plaques lysimétriques.

II-2-3. Impact du mode d'occupation : cultures/prairies

L'impact du mode d'occupation des différentes parcelles a aussi pu être étudié. L'observation des résultats présentés dans les figures 4.1 à 4.5 permet de mettre en évidence que l'alternance culture/prairie ne semble pas avoir d'influence significative sur la dynamique temporelle du COD. En effet, la même évolution est observée pour les différents traitements avec une augmentation en période estivale puis une diminution en hiver. Cette tendance est plus ou moins marquée suivant les traitements, cependant elle ne peut être expliquée par la simple alternance culture/prairie mais plus par l'hétérogénéité des sols.

II-2-4. Influence de l'apport d'azote sur les parcelles

La dynamique de l'azote total dans le sol a aussi été étudiée. La figure 4.9 présente les résultats obtenus pour deux parcelles : une parcelle avec apport d'azote, l'autre sans apport. La première observation est la grande différence de concentration entre les traitements T2 et T4, différence logique à cause de l'apport d'engrais azoté.

De plus, il est à noter que l'azote organique ne représente qu'une faible proportion de la matière organique, de l'ordre de 2 à 5 % en moyenne. Compte tenu des teneurs en carbone relevées, nous nous attendions à avoir des teneurs en azote organique de l'ordre de 0,1 – 0,2 mg NOD/L (2 mg/L COD), ce qui n'est pas le cas ni dans la parcelle avec apport d'azote ni dans celle sans apport (concentrations supérieures observées). Il est donc difficile de distinguer l'évolution de l'azote organique dans l'azote total.

Enfin, on observe que l'augmentation en Nt se produit plutôt en hiver, alors que l'augmentation de MO est observée en été. L'augmentation observée en hiver pour les parcelles non traitées par ajout d'engrais azotés est sûrement associée à de l'azote minéral provenant d'amendement plus ancien (Longue persistance de l'azote inorganique dans les sols i.e. nitrates).

L'observation de ces résultats n'a pas permis d'aboutir à des conclusions très originales. En effet, la dynamique temporelle de l'azote ne semble pas suivre une logique particulière en fonction de la température ou de la pluviométrie comme le carbone. De plus les résultats obtenus pour les deux parcelles qui ont subi un apport d'engrais azoté sont assez différents, phénomène que l'on doit probablement attribuer à l'hétérogénéité des sols.

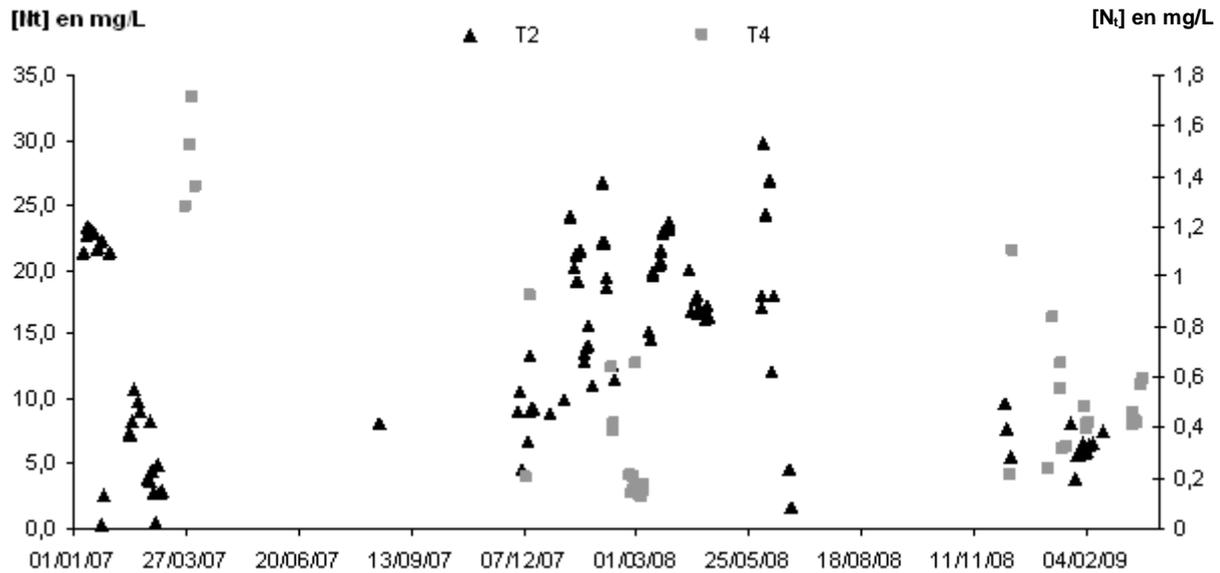


Figure 4.9 : Dynamique de l'azote dans les traitements T2 (avec azote) et T4 (sans azote)

II-3. Bilan sur le flux de COD à 1 m de profondeur

La concentration moyenne du COD des eaux collectées au niveau des plaques lysimétriques au cours de l'année 2008 est de 1,5 mgC/L. A partir de cette donnée ainsi que du volume total d'eau collectée au niveau des plaques présentées dans le chapitre 2, il est possible d'estimer le flux de carbone en COD à 1 mètre de profondeur. Sur chacune des plaques, percolent environ 4 litres d'eau ce qui correspond à un apport de carbone de $1,5 \times 4 = 6,0$ mgC par plaque. La dimension d'une plaque est de 40 cm x 30 cm soit une superficie de 1200 cm². Pour recouvrir un hectare il faudrait 83334 plaques lysimétriques. On peut ainsi estimer le flux de COD par hectare. Le flux de COD obtenu est de $6,0 \times 83334 = 500000$ mgC/ha soit 0,5 kgC/ha à un mètre de profondeur. Cette valeur n'est qu'une estimation car dans un premier temps le volume d'eau collectée au niveau des plaques, varie de manière importante d'une parcelle à l'autre. Dans un second temps, les phénomènes à proximité des plaques du à l'introduction de ce dispositif dans le sol ne sont pas connus. Enfin l'hétérogénéité des sols peut faire varier ce flux COD de manière importante entre les parcelles.

On peut également estimer la concentration en carbone introduit dans le sol par l'eau de pluie. La pluviométrie totale au cours de l'année 2008 est de l'ordre de 860 mm ce qui correspond à 860 L/m² soit 8600000 L/ha. La concentration moyenne du COD de l'eau de pluie qui tombe sur le site de l'ORE est de l'ordre de 1,9 mgC/L au cours de l'année 2008, ce

qui correspond à un apport de carbone de $8600000 \times 1,9 = 16,4 \text{ kgC/ha}$. L'eau de pluie apporte au sol $16,4 \text{ kgC/ha}$.

Si l'on fait le bilan du COD entre l'eau qui rentre dans le sol (eau de pluie - $16,4 \text{ kgC/ha}$) et l'eau collectée à 1m de profondeur ($0,5 \text{ kgC/ha}$), on constate une perte importante d'environ 16 kgC/ha . Cette perte de COD pourrait être due à des phénomènes d'adsorption au travers des différents horizons traversés par l'eau qui percole dans le sol.

III. Analyse qualitative directe des matières organiques solubles des horizons profonds

Le suivi quantitatif effectué lors de la première année d'étude a conclu à une augmentation significative du COD en période chaude au niveau des eaux collectées en profondeur. Cette observation nous a incités à compléter les analyses en COD par une approche qualitative afin de mieux apprécier cette variation. Cela a ainsi permis de déterminer si l'augmentation du COD observée en période estivale s'accompagnait d'un changement de la qualité de cette matière organique. Nous avons abordé cette question en utilisant des outils d'analyse directe : spectrofluorimétrie, spectrophotométrie UV. Mais aussi chromatographie d'exclusion de taille sur certains prélèvements effectués au cours de l'année 2008 au niveau des différentes parcelles, ainsi que sur quelques données supplémentaires obtenues par les monolithes au cours de l'année 2009.

II-1. Analyses spectrophotométriques UV

L'analyse spectrophotométrique UV-Visible d'échantillons d'eaux naturelles conduit à l'obtention de profils montrant une décroissance monotone (absence de bandes spécifiques d'absorbance) de l'intensité du signal des hautes longueurs d'onde vers les fortes longueurs d'onde. Les eaux collectées en profondeur du sol étudié ne dérogent pas à ce constat (figure 4.10). L'absence de couleur dans ces eaux limite par ailleurs l'intérêt de ces outils aux domaines des faibles longueurs d'onde (domaine UV).

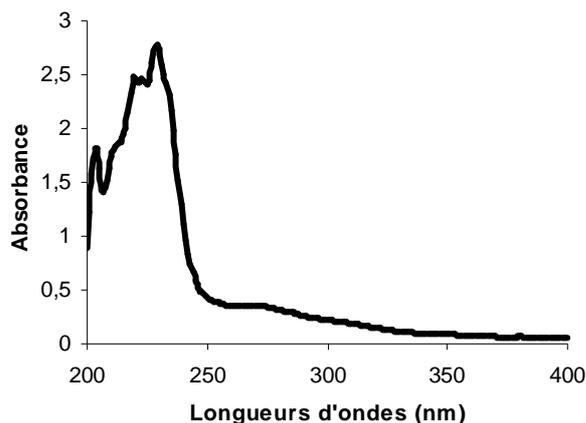


Figure 4.10 : Spectre UV-visible des échantillons d'horizon profonds

Les travaux conduits dans ce domaine ont montré que l'absorbance UV à 254 nm d'une eau naturelle filtrée sur membrane de $0,45 \mu\text{m}$ rapportée à l'unité de COD, correspondant au paramètre SUVA (Absorbance UV spécifique), permet d'apprécier le degré d'aromaticité de la matrice organique soluble. En général, les eaux présentant un $\text{SUVA} > 5$ sont considérées comme des eaux à caractère humique, les eaux de $\text{SUVA} < 2-2,5$ sont dites à caractère non humique (EDZWALD, 1993). La figure 4.11 montre l'évolution du SUVA au cours de l'année 2008 pour les échantillons T1 et T3 des plaques et des bougies, les autres étant présentés.

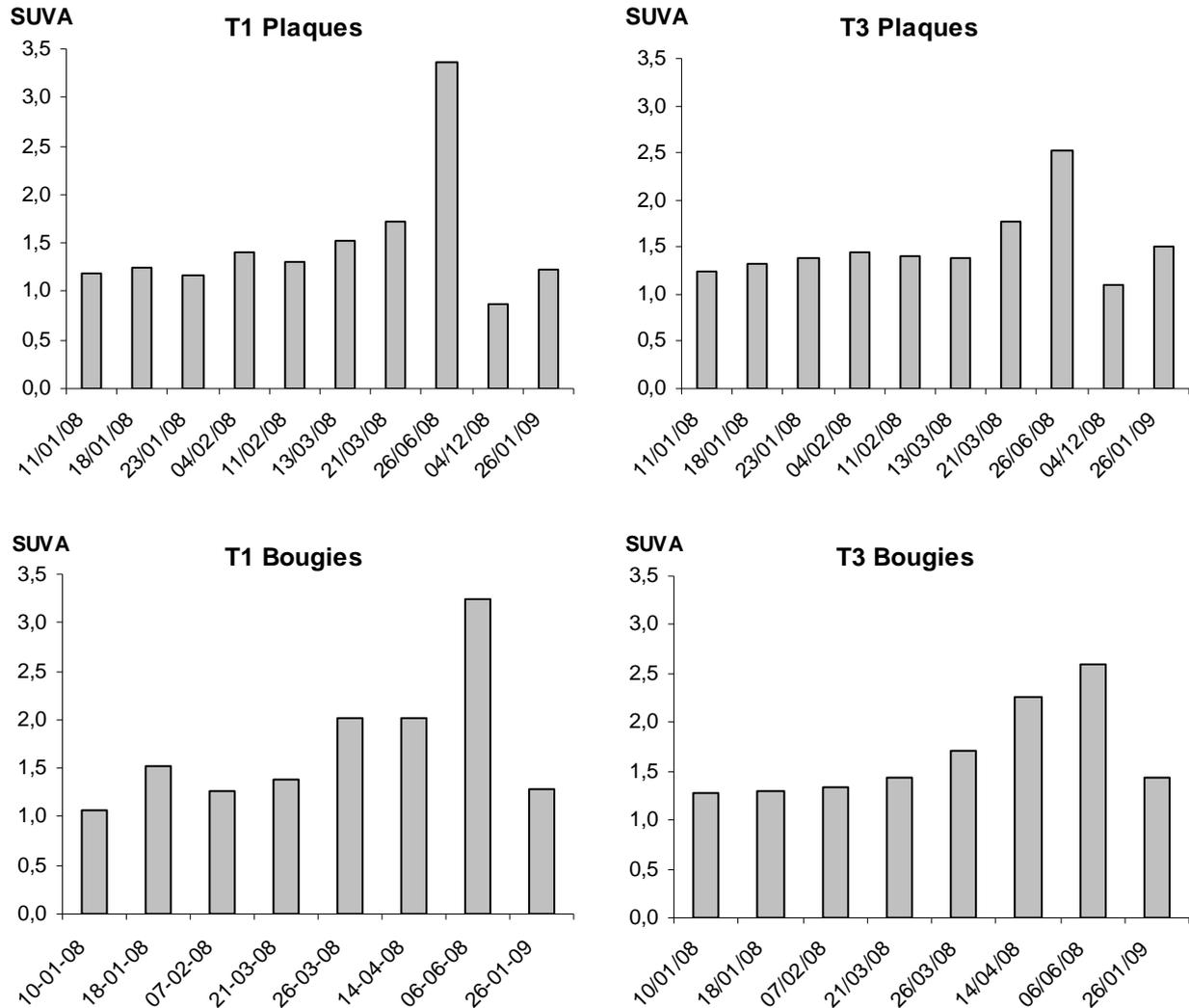


Figure 4.11 : Evolution du paramètre SUVA au cours de l'année 2008 pour quelques échantillons collectés au niveau des plaques lysimétriques et des bougies poreuses pour les traitements T1 et T3

Les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation progressive du SUVA au cours de l'année 2008 quels que soit les traitements mis en place. Les valeurs obtenues pendant les premiers mois de l'année sont comprises entre 1 et 1,5 $L.mgC^{-1}.m^{-1}$, valeurs qui soulignent le caractère non humique de la matière organique en solution. Les eaux collectées en période estivale montrent une augmentation significative de ce paramètre i.e. $SUVA = 3-4 L.mgC^{-1}.m^{-1}$, ce qui démontre un changement important du caractère de la matrice organique avec une augmentation significative de son degré d'aromaticité. L'augmentation de la concentration en COD des eaux profondes s'accompagne d'un enrichissement en structures à caractère humique.

II-2. Analyse fluorimétrique

L'analyse spectrofluorimétrique permet de compléter l'information apportée par la spectrophotométrie UV. La représentation graphique des matrices excitation-émission de fluorescence (EEM : excitation-emission matrix) sous forme de spectres en trois dimensions met en évidence la présence des deux principaux fluorophores (Fluorophores A - $E_x = 260$ nm ; $E_m = 380-460$ nm et Fluorophore C - $E_x = 320$ nm ; $E_m = 420-480$ nm) décrit par COBLE, 1996 ; KLINKHAMMER et al. 1997 ; HUGUET et al. 2009 généralement identifiés dans les eaux naturelles. Selon CHEN et al. (2003) le chromophore A serait situé dans la zone des acides fulviques et le chromophore C dans la zone des acides humiques. D'autres auteurs (COBLE, 1996) considèrent des zones différentes en attribuant le chromophore A à la zone des acides humiques récents et le C à la zone des acides humiques. Leur intensité respective est plus forte dans l'échantillon d'été que dans celui d'hiver (figures 4.12 et 4.13), résultat attendu compte tenu de sa plus forte absorbance UV.

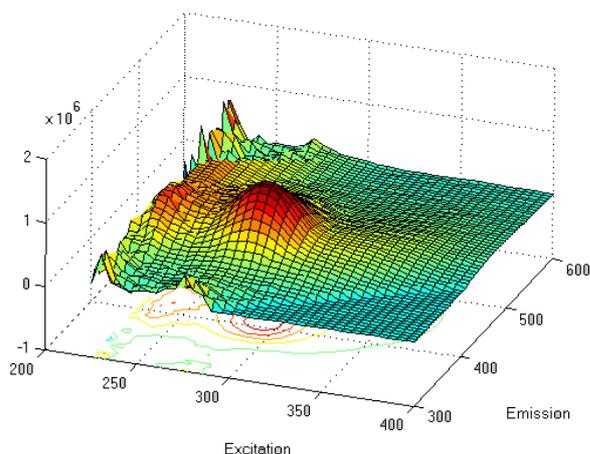


Figure 4.12 : Spectre 3D de fluorescence d'un échantillon d'hiver (11/02/08) de plaques lysimétriques du traitement T1

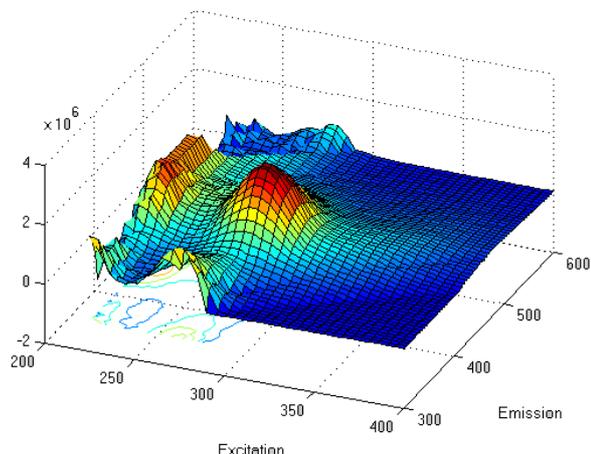


Figure 4.13 : Spectre 3D de fluorescence d'un échantillon d'été (26/06/08) de plaques lysimétriques du traitement T1

Le tableau 4.1 présente la localisation et le rapport des intensités des fluorophores A et C obtenus sur nos échantillons et par les travaux de COBLE en 1996 sur des eaux de surface.

Tableau 4.1 : Localisation et rapport A/C des fluorophores d'échantillons de sol et d'eau de surface

Echantillons	Localisation du fluorophore A (Ex/Em nm)	Localisation du fluorophore C (Ex/Em nm)	Rapport A/C des intensités des fluorophores	
Echantillon (11/02/08)	215/475	260/470	0,86	
Echantillon (26/06/08)	220/475	265/470	0,54	Nos travaux
Echantillon d'eau de surface (Gartempe)	265/455	330/450	1,10	
Echantillon d'eau de surface-Mississippi	262/442	345/439	1,05	
Echantillon d'eau de surface-Columbia	265/445	337/442	1,12	COBLE. 1996
Echantillon d'eau de surface-Amazone	270/460	330/452	1,08	

Que se soit dans les échantillons de sols ou les eaux de surface, on obtient des spectres similaires avec la présence des deux fluorophores A et C. Cependant, des différences apparaissent dans leur localisation ainsi que dans le ratio de leur intensité (A/C). Tout d'abord, on remarque un décalage vers les plus faibles longueurs d'ondes pour les fluorophores A et C dans les échantillons d'eau obtenus sur les horizons profonds par rapport à ceux d'eau de surface montrant la présence de composés de plus faible masse moléculaire dans les horizons profonds. Enfin, le ratio A/C des intensités est plus petit dans les eaux des horizons profonds indiquant une proportion plus importante de fluorophore C caractéristique selon CHEN et al. 2003 mais aussi COBLE (1996) de la zone des acides humiques.

Si la fluorescence EEM permet une représentation complète des chromophores présents, la représentation en deux dimensions offre un outil de comparaison plus facile à utiliser. Les données de la bibliographie ont montré que les spectres d'émission (balayage de l'émission pour une longueur d'onde d'excitation fixe) constituaient un outil de caractérisation intéressant. La figure 4.14 présente les spectres d'émission normalisés en

intensité pour une longueur d'onde d'excitation de 275 nm pour les échantillons collectés au niveau de la parcelle T5.

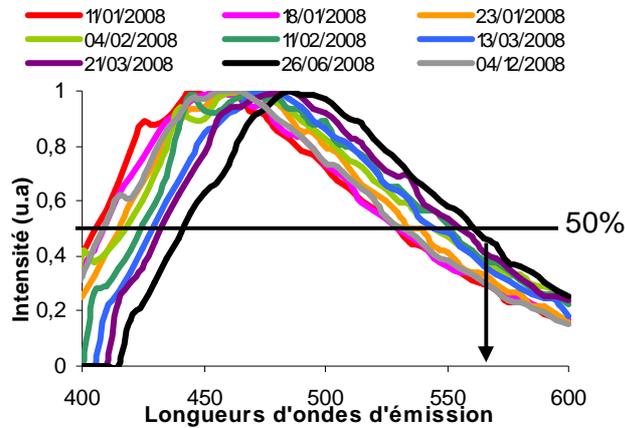


Figure 4.14 : Spectre d'émission de fluorescence normalisé du suivi des échantillons du traitement T5 collectés par plaques lysimétriques (Excitation = 275 nm)

Tous les spectres montrent une bande large d'émission, toutefois la position de cette bande varie selon l'échantillon analysé. Pour une meilleure comparaison de la position de la bande d'émission, nous avons choisi de déterminer à partir de la figure 4.14, la longueur d'onde d'émission correspondant à 50 % d'intensité relative ($\lambda_{em50\%}$) à la longueur d'onde d'excitation utilisée. Nous avons retenu arbitrairement les valeurs obtenues pour la partie décroissante de la bande d'émission. La figure 4.15 donne les $\lambda_{em50\%}$ obtenues pour les échantillons collectés au niveau des plaques lysimétriques et des bougies poreuses pendant l'année 2008 pour les traitements T1 et T3.

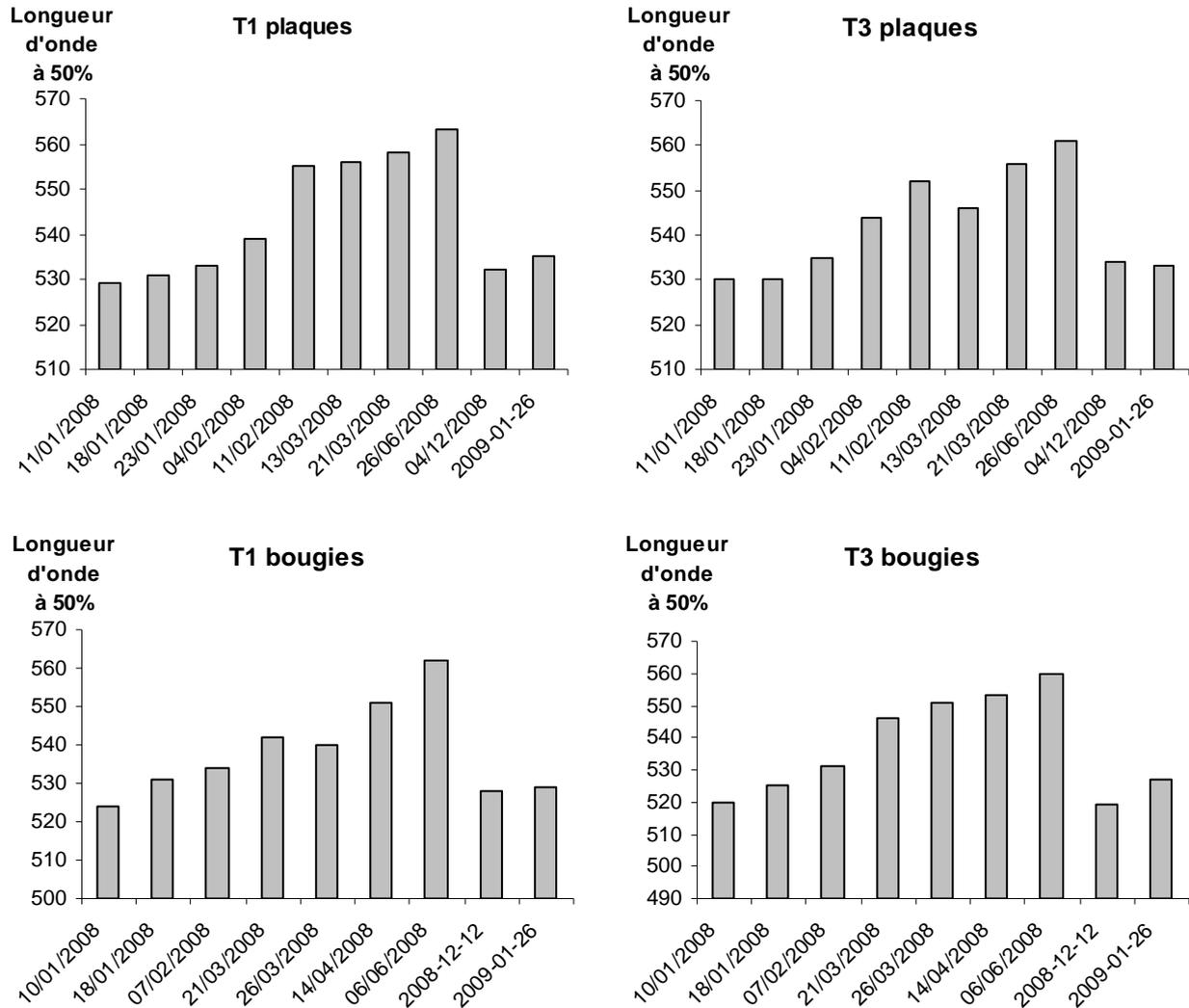


Figure 4.15 : Longueurs d'ondes d'émission à mi-hauteur (excitation 275 nm) de quelques échantillons collectés au niveau des plaques lysimétriques et des bougies poreuses pour les traitements T1 et T3

Les graphes mettent en évidence un déplacement significatif de $\lambda_{em50\%}$ vers les plus fortes longueurs d'onde entre Janvier et Juin 2008, les valeurs obtenues pour l'hiver 2009 (échantillons décembre 08 et janvier 2009) étant comparables à celles de l'hiver 2008. Le déplacement progressif des spectres vers des longueurs d'ondes d'émission plus fortes (i.e. red shift) lors du premier semestre de l'année, traduit un changement notable de la nature des chromophores et/ou de l'environnement structural dans lequel se situent ces chromophores.

Les travaux menés par BELIN et al. (1993) et EWALD et al. (1983) montrent que les matières organiques naturelles solubles présentent un spectre d'émission de fluorescence qui est d'autant plus décalé vers le rouge (fortes longueurs d'onde) qu'elles incorporent des structures de hautes masses moléculaires à caractère humiques. BELIN et al. (1993) montrent

également pour des fractions de MON isolées d'eaux de surface, que la position du spectre est d'autant plus décalée vers les fortes longueurs d'onde que leur SUVA est élevé. Un caractère humique plus marqué se traduit par un décalage du spectre vers le rouge (figure 4.16).

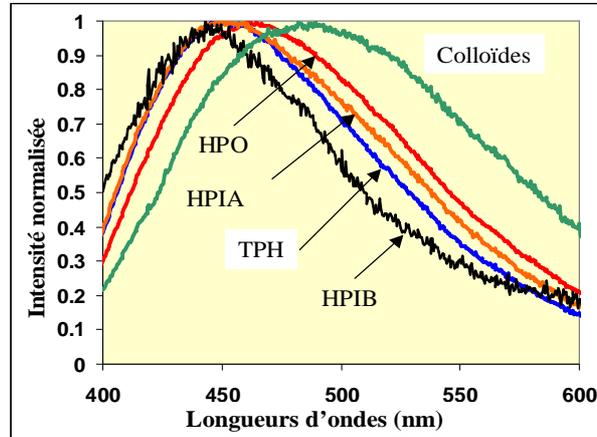


Figure 4.16 : Spectres normalisés des fractions de MON d'une eau de surface (Ribou)

Les quelques résultats obtenus sur des eaux collectées à différentes profondeurs (prélèvements par bougies poreuses au niveau des monolithes) supportent parfaitement ces remarques. La figure 4.17 montre en effet que les spectres d'émission sont d'autant plus décalés vers les fortes longueurs d'ondes que l'eau collectée est issue d'horizons peu profonds. L'enrichissement plus marqué en substances humiques solubles dans les horizons superficiels et intermédiaires a été clairement mis en évidence dans le chapitre 3.

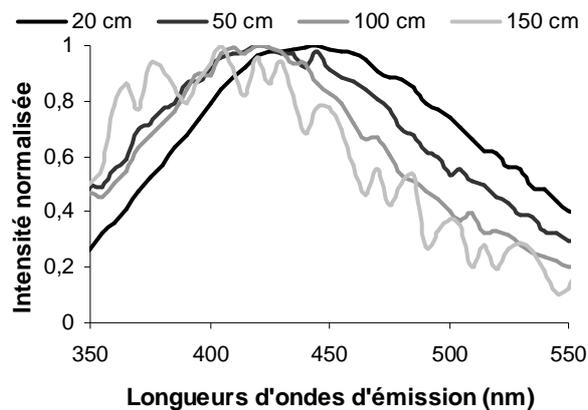


Figure 4.17 : spectre d'émission de solutions de bougies du monolithes 2 (Excitation 275 nm)

Les résultats de fluorescence et d'absorbance UV sont cohérents et confirment que la fraction soluble des MOS des eaux collectées en profondeur (pour un sol arable) se caractérise par un enrichissement en structures à caractère humique avec le réchauffement du sol.

III-3. Chromatographie d'exclusion stérique haute pression

III-3-1. Profils HPSEC-UV-DOC

La chromatographie d'exclusion stérique associée à une détection COD (HPSEC-DOC pour « High Pressure Size Exclusion Chromatography- Dissolved Organic carbon ou LC-OCD pour « Liquid Chromatography- Organic Carbon Detector) est un outil relativement récent dont seuls quelques laboratoires dans le monde sont équipés aujourd'hui. Son intérêt pour la caractérisation des eaux de surface et les eaux traitées a été démontré dans la bibliographie (HER et al. 2002). Le couplage avec la détection COD est toujours associé à une détection UV.

Quelques analyses ont pu être réalisées au laboratoire d'Anjou Recherche-Véolia Environnement à Maisons-Laffitte sur les échantillons collectés au niveau des plaques lysimétriques et les bougies poreuses à 105 cm. Ce suivi n'a pas pu être effectué régulièrement avec la détection COD à cause du manque de disponibilité de la chaîne chromatographique et surtout à cause du coût élevé de l'analyse, limitant les résultats obtenus à trois échantillons : un échantillon de PL et de BP et un échantillon d'eau de surface « la Seine » pour comparaison. Pour une meilleure comparaison, l'eau de plaque a été concentrée par évaporation sous vide réduit pour présenter un COD équivalent à celui de l'eau de Seine. Les figures 4.18 et 4.19 montrent les trois profils obtenus.

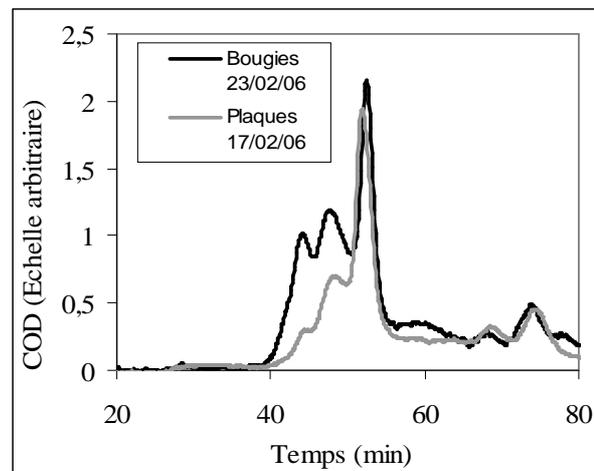
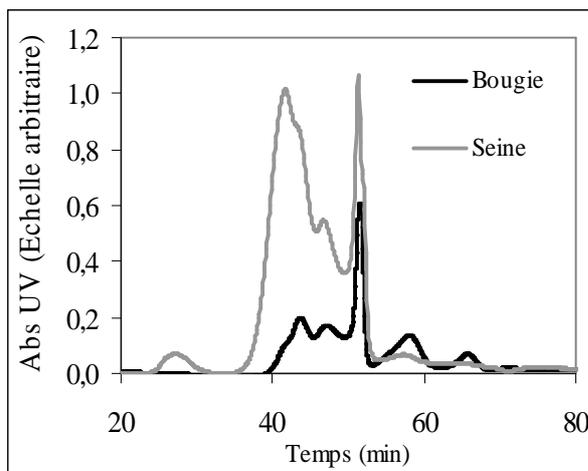
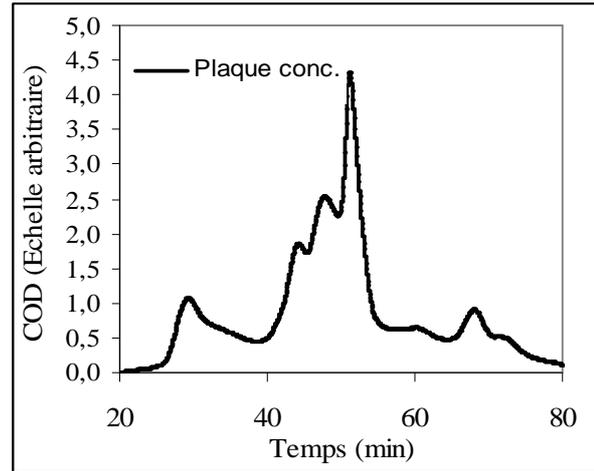
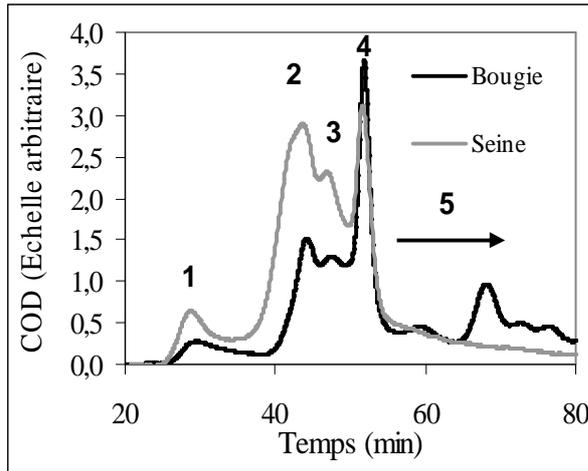


Figure 4.18 : Chromatogrammes HPSEC-UV-COD des eaux provenant des plaques lysimétriques et de la Seine (amont de Paris)

Figure 4.19 : Chromatogramme HPSEC-COD des eaux provenant des plaques lysimétriques et bougies poreuses du site ORE de Lusignan

Les concentrations en COD de l'eau collectée au niveau de la bougie, de la seine et de la plaque concentrée sont respectivement de 2,2 mgC/L, 2,5 mgC/L et 4,5 mgC/L.

La figure 4.18 compare les profils HPSEC/COD d'un échantillon d'eau collectée à partir de la bougie poreuse (profondeur 105 cm) de la parcelle T5 avec celui de la Seine prélevé en amont de Paris.

Le profil de la Seine est caractéristique du profil observé pour les eaux de surface. Il met clairement en évidence les quatre bandes caractéristiques, 1) les biopolymères de hautes masses moléculaires, 2) les substances humiques, 3) les structures de types humiques de faibles masses moléculaires (« building blocks ») et 4) les structures de plus faibles masses moléculaires acides. Les substances humiques constituent les structures prédominantes,

caractéristique reconnue pour les eaux de surface (THURMAN, 1985) dont le COD provient principalement du lessivage des sols. La superposition des profils COD et UV met clairement en évidence la bande des substances humiques.

Contrairement aux eaux de surface et en accord avec les profils discutés dans le chapitre 3, les eaux de plaque ou bougie se caractérisent par une bande des substances humiques quasiment absentes, les « building blocks » et les structures de faibles masses moléculaires acides constituent l'essentiel du COD. La matrice organique soluble apparaît comme plus complexe avec 5) des structures de faibles masses moléculaires à caractère neutre voire des structures présentant des interactions avec le gel. Cette 5^{ème} zone est peut être liée à la concentration en COD, en effet elle est très peu visible dans l'échantillon de plaque avant pré-concentration. La pré-concentration pourrait engendrer une modification des molécules présentes en molécules neutres pouvant avoir une interaction avec le gel de la colonne et ainsi être exclue plus tardivement.

Encore une fois, il est aussi important de noter pour toutes ces eaux la présence de protéines et polysaccharides de hautes masses moléculaires dont l'origine, pour les eaux de surface, est attribuée à une activité microbienne (résidus microbiens).

Les profils chromatographiques des eaux de plaque et bougie sont relativement similaires avec une bande prédominante centrée vers les 50 minutes, correspondant aux structures de faibles masses moléculaires (<400-500 g/mol) à caractère acide. Les MO solubles des bougies semblent proportionnellement plus riches en structures à caractère humique (masses moléculaires intermédiaires), résultats pouvant provenir d'un mode de collecte par succion favorisant l'entraînement de structures de MM plus élevées.

III-3-2. HPSEC/UV(254 nm)

L'analyse HPSEC/UV nécessite un appareillage beaucoup plus commun et disponible au LCME. Les figures 4.20a et 4.20b montrent les résultats obtenus pour plusieurs échantillons d'eau collectés à partir des bougies et plaques installées au niveau des parcelles T1 (culture) et T3 (prairie) au cours de l'année 2008.

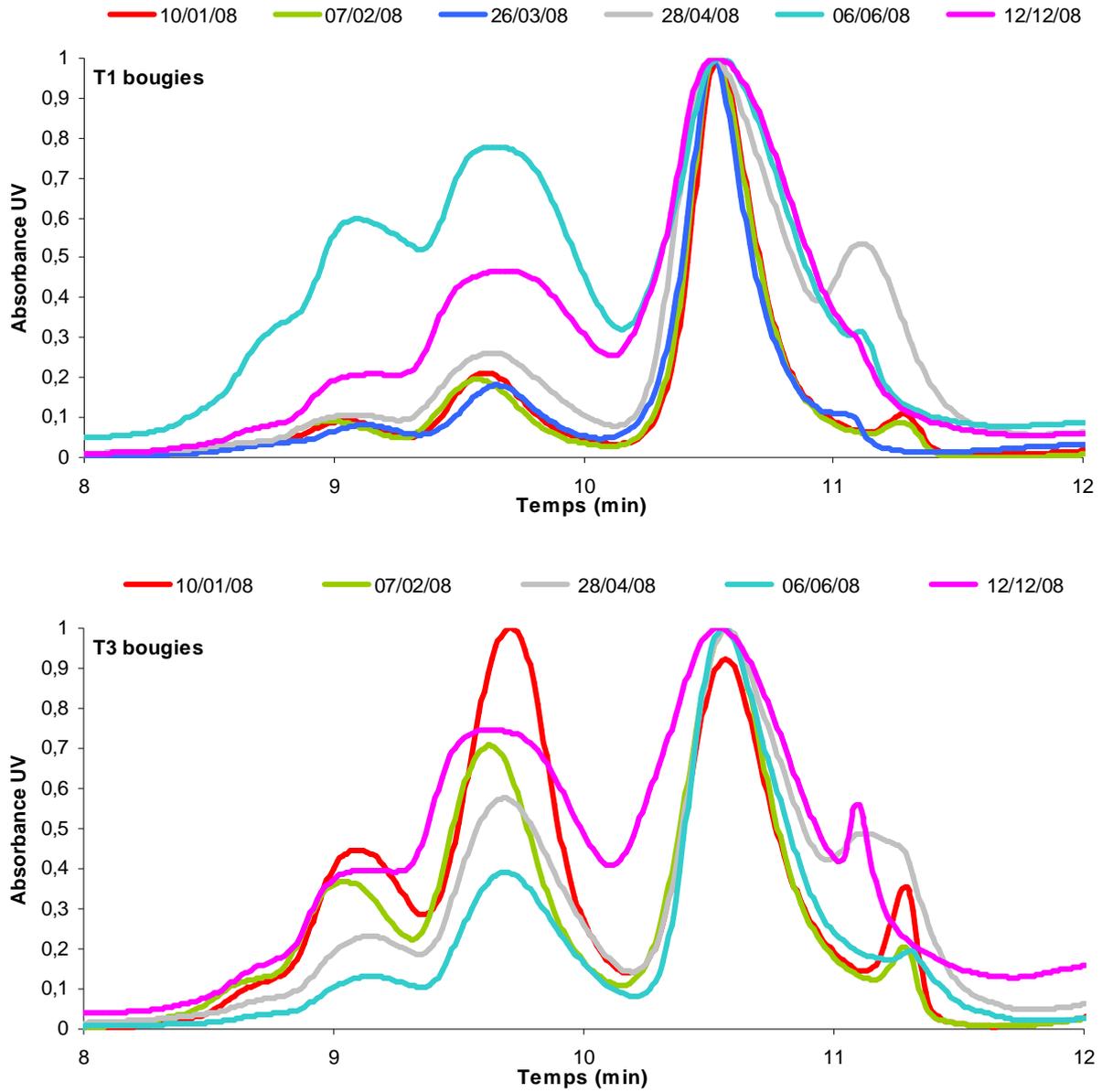


Figure 4.20a : Evolution du profil de chromatographie d'exclusion stérique avec détection UV normalisé des échantillons d'eau collectés au cours de l'année 2008 au niveau des bougies poreuses pour les traitements T1 et T3

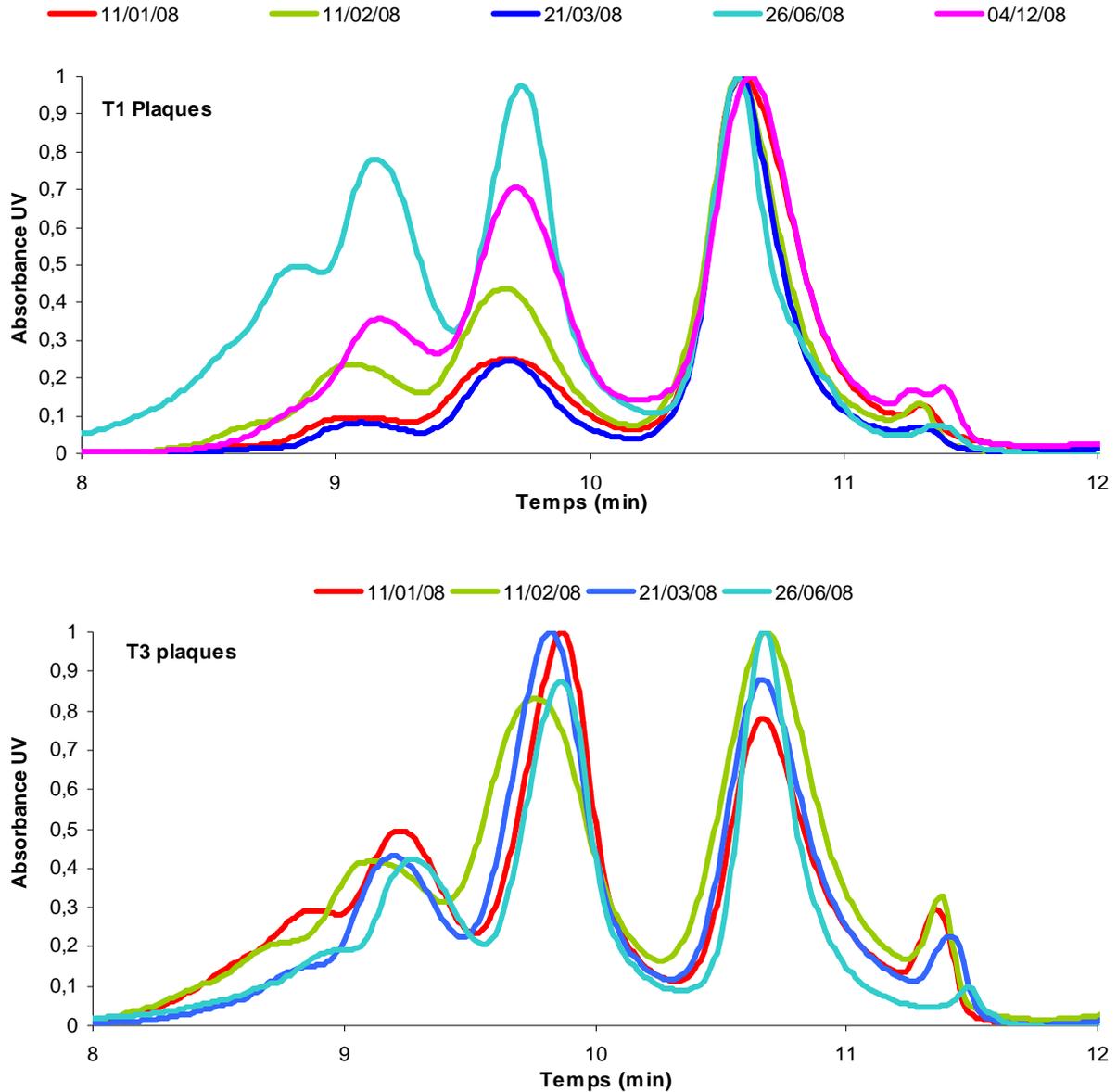


Figure 4.20b : Evolution du profil de chromatographie d'exclusion stérique avec détection UV normalisé des échantillons d'eau collectés au cours de l'année 2008 au niveau des plaques lysimétriques pour les traitements T1 et T3

On constate tout d'abord, une différence entre les profils obtenus sur le traitement T1 et le traitement T3, avec la présence de structures de plus hautes masses moléculaires dans T1. Il semblerait donc qu'il y ait une proportion plus importante de substance humique dans la culture par rapport aux prairies. Ces résultats sont confirmés dans une moindre mesure par les analyses en COD, UV et fluorescence. Une autre différence intéressante entre les parcelles T1 et T3 est visible, elle concerne le pic aux environs des 10 minutes qui est beaucoup plus important dans le profil T1 que dans les autres traitements. Ce pic autour des 10 minutes est

attribué généralement dans le domaine des eaux aux nitrates. Les traitements T1 et T3 ont subi un amendement régulier d'engrais azoté au cours des trois années de cette étude. La différence entre les deux profils n'est donc pas due à un apport extérieur différent. La seule différence entre le traitement T1 et les autres traitements (ici T3) est le mode de gestion, T1 est une culture et T3 une prairie. Les nitrates se retrouveraient donc plus facilement dans les horizons profonds pour la culture (T1) que pour les prairies (T2, T3, T4 et T5), le retournement du sol favoriserait donc la migration de l'azote dans les horizons profonds.

De plus, on remarque une augmentation des structures de haute masse moléculaire dans les échantillons du mois de juin correspondant à l'augmentation des concentrations en COD, en SUVA et du décalage en fluorescence vers les plus fortes longueurs d'ondes. Les échantillons de la période estivale possédant des concentrations en COD plus élevées seraient donc constitués de molécules de plus hautes masses moléculaires.

De nombreuses hypothèses peuvent être mises en avant pour expliquer cette augmentation de concentration et cette évolution de distribution de taille. Ces changements pourraient être dû soit :

- A une augmentation de la respiration des sols donc de l'activité microbienne due au fait de la hausse de température en période estivale (VANHALA et al. 2008).
- A une accumulation de la matière organique due à l'absence de précipitation (WILSON et al. 2008)
- Soit indirectement une augmentation de l'activité enzymatique (phénoloxydase par exemple) sensible aux conditions climatiques donc à la température qui entraîne la décomposition des structures complexes en structures plus simples, utilisables par les microorganismes, donc plus solubles (FREEMAN et al. 2001).

Cette dernière hypothèse à l'air moins évidente au vu des résultats en chromatographie d'exclusion qui montre une augmentation de la masse moléculaire des composés et non une simplification de molécules complexes. Cependant la MO des sols est très complexe, il se peut qu'elle se dégrade en fraction soluble de plus haute masse moléculaire par rapport à la matière organique soluble déjà présente.

IV. Importance des conditions climatiques : dynamique attendue du COD en période estivale

Les analyses en COD, UV, fluorescence et HPSEC ont montrés des différences entre l'hiver et l'été avec une augmentation des substances humiques et des structures de hautes masses moléculaires dans les eaux collectées dans les horizons profonds. Le phénomène de changement climatique avec le réchauffement des sols peut être à l'origine de ces modifications de structure. Pour appuyer ces résultats, des analyses complémentaires ont été mises sur le terrain. A l'approche de l'été, le monolithe a été couvert par une bâche positionnée au dessus du sol afin de sécher progressivement le sol (éviter l'écoulement des pluies dans le sol) tout en permettant une aération naturelle de la surface du sol). L'humidité du sol a été suivi continuellement (monolithe équipé de sonde TDR) et à la période choisie, le sol a été soumis à un arrosage intense dans le but de simuler une pluie d'orage.

IV-1. Séchage du monolithe

La couverture du monolithe n°3 a duré un peu plus de deux mois et a commencé en avril 2009. Les horizons profonds, les plus difficiles à sécher ont commencé à perdre leur humidité très lentement. La figure 4.21 représente l'évolution de l'humidité volumique du monolithe n°3.

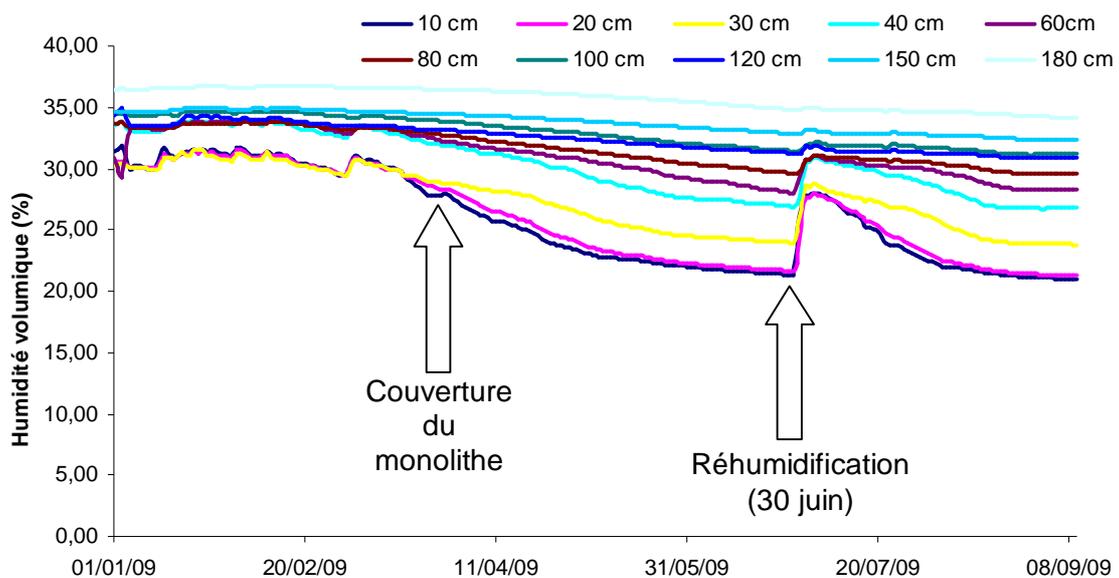


Figure 4.21 : Humidité volumique à différentes profondeurs du monolithe n°3

Les données relevées montrent une diminution significative de l'humidité en particulier dans les horizons supérieurs. Les horizons les plus profonds (< 150 cm) n'ont pas montré de modification significative de leur humidité relative. L'assèchement du monolithe n°3 a été, comme attendu, nettement plus marqué que celui relevé sur les deux monolithes 1 et 2. Pour exemple, à la profondeur de 30 cm, l'humidité volumique du monolithe n°3 au 31 Mai 2009 est de 16% alors que celle du monolithe n°2 est de 22 %. La deuxième étape du cycle est l'arrosage abondant du sol qui a été réalisé du 29 Juin au 3 Juillet 2009 avec de l'eau osmosée.

IV-2. Arrosage du monolithe n°3

L'eau de pluie est une eau très faiblement minéralisée, c'est pourquoi nous avons choisi de simuler la réhumidification du monolithe n°3 par un arrosage à l'eau osmosée.

Au 01/07/2009, la phase d'arrosage a été lancée ; elle a duré 5 jours. Les prélèvements ont été réalisés aux différentes profondeurs pour permettre un bilan quantitatif et qualitatif sur les eaux écoulées (cf protocole n°3, décrit dans le chapitre 2 « matériel et méthodes »). La vitesse d'arrosage a été assez lente au départ afin de laisser la terre se réhumidifier et se gonfler petit à petit. Les trois premiers arrosages se font en arrosant uniquement le centre du monolithe sans arroser la couronne extérieure du monolithe afin de laisser gonfler la terre et ne pas former d'écoulement préférentiel sur les parois du monolithe. Au troisième jour, le débit a été doublé : la terre était déjà humectée, il n'y plus de risques de former de chemins préférentiels.

Les premières eaux ont été collectées au troisième jour, après le versement de 220 litres d'eau osmosée. Au quatrième jour, seulement 2 litres ont été collectés en fond de cuve. Un nouvel arrosage du monolithe a été effectué afin d'éviter de mettre en fonctionnement les bougies poreuses dans un environnement potentiellement sec. C'est pourquoi 80 litres d'eau osmosée supplémentaires ont été versés. En totalité, le monolithe n°3 a reçu 300 litres d'eau osmosée. Pendant les deux premiers jours, il est tombé 56 mm d'eau osmosée en 6 heures et lors des troisième et cinquième jours, 64 mm en 3h30. Ces valeurs se rapprochent de celles enregistrées lors de pluie d'orage en été selon le site de Météo France. Un orage déverse fréquemment plus de 50 à 100 litres d'eau par mètre carré, soit 50 à 100 mm, en quelques heures.

IV-3. Caractérisation des eaux collectées aux différentes profondeurs

Tout d'abord rappelons que chaque monolithe est équipé de deux bougies poreuses par profondeur. Ces bougies sont situées à 20 cm, 50 cm, 100 cm et 150 cm. Les bougies poreuses ont été mises sous vide le 03/07/2009 (le cinquième jour du processus de réhumidification). La collecte des échantillons s'est faite 48h plus tard, le 06/07/2009. Le tableau 4.2 présente les volumes d'eau récupérés.

Tableau 4.2 : Volumes d'eau collectés par les bougies après réhumidification aux différentes profondeurs

Bougie (profondeur)	Volume collecté (ml)
B1 (20 cm)	280
B2 (20 cm)	600
B3 (50 cm)	480
B4 (50 cm)	600
B5 (100 cm)	20
B6 (100 cm)	180
B7 (150 cm)	50
B8 (150 cm)	100

Immédiatement après leur collecte, les échantillons prélevés ont été placés en chambre froide (4°C) sans pré-conditionnement.

Une centaine de ml des prélèvements issus des bougies B1, B3, B6, B7 (48 heures) ainsi que l'eau prélevée à 2 mètres le 01/07/2009 à 14h (premier jus) ont été filtrés sur une membrane de porosité de 0,45 µm et envoyés au laboratoire DOC-Labor (Allemagne) afin de réaliser des analyses en chromatographie d'exclusion stérique détection COD et UV. Deux analyses ont été effectuées sur ces échantillons, sur deux colonnes chromatographiques identiques sur un intervalle de deux jours (Envoi 1-1 et Envoi 1-2).

Un second envoi (Envoi 2) a suivi dix jours plus tard avec des échantillons des bougies B2, B3, B6, B8 et du premier jus. Rappelons que ces échantillons ont été conservés non filtrés à 4°C, et ont été filtrés à 0,45 µm avant envoi.

Les figures 4.22 et 4.23 donnent les chromatogrammes LC-UV-OCD des séries d'analyses Envoi 1-1 et Envoi 2 effectuées par le laboratoire DOC-Labor avec son mode d'intégration. A noter que l'atténuation du signal a été réajustée pour chaque chromatogramme afin de permettre une meilleure comparaison visuelle de la distribution des grandes classes de matières organiques dissoutes. Les chromatogrammes obtenus pour les différentes profondeurs présentent des profils extrêmement différents. Des différences importantes sont aussi relevées entre l'envoi 1 et l'envoi 2. Les profils se sont avérés tout à fait similaires pour les séries Envoi 1-1 et Envoi 1-2.

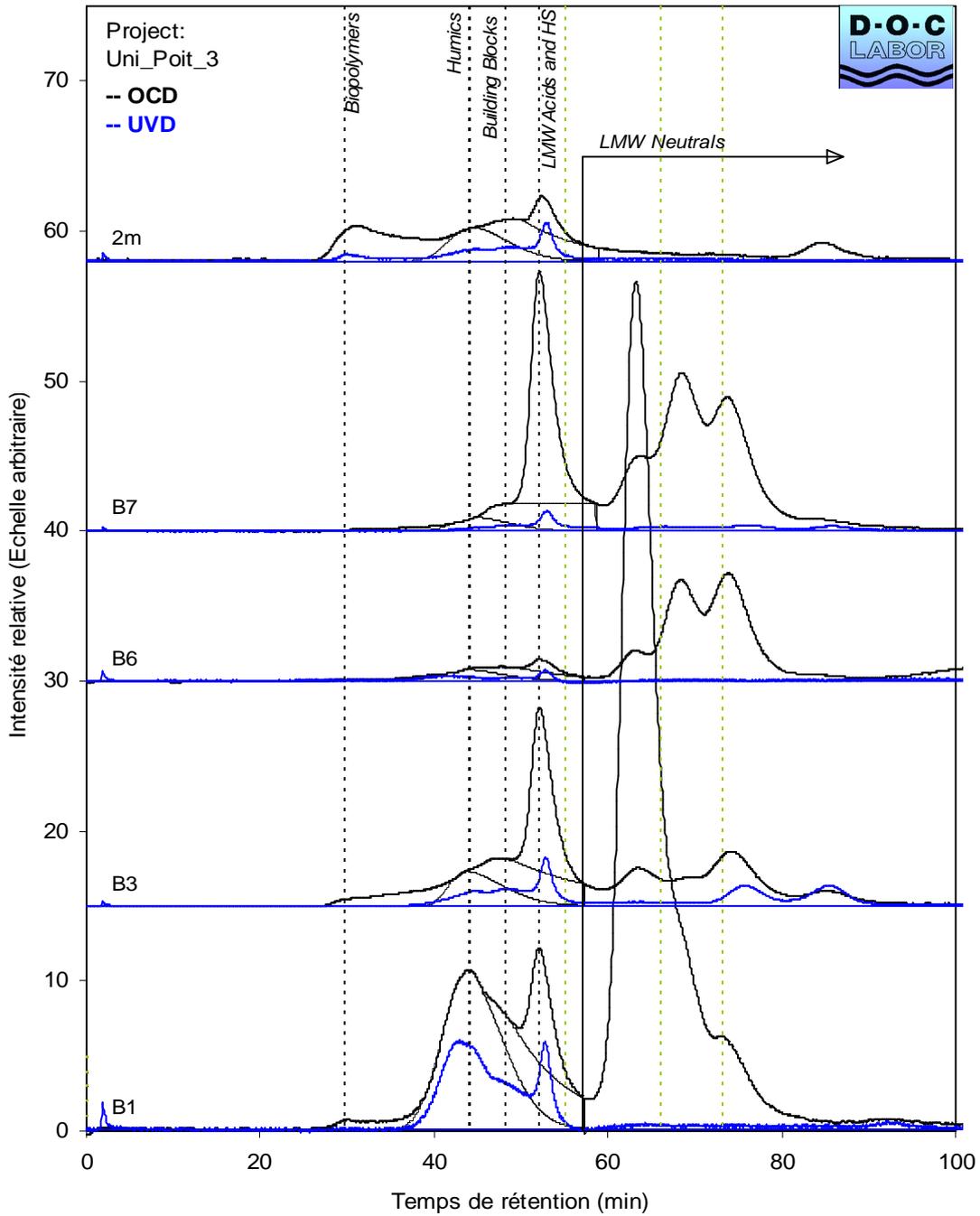


Figure 4.22 : Chromatogrammes LC-UV-OCD de la troisième série d'analyses (envoi 1) effectuée par DOC-LABOR (*LMW : Low Molecular Weight (Molécules de petites tailles moléculaires))

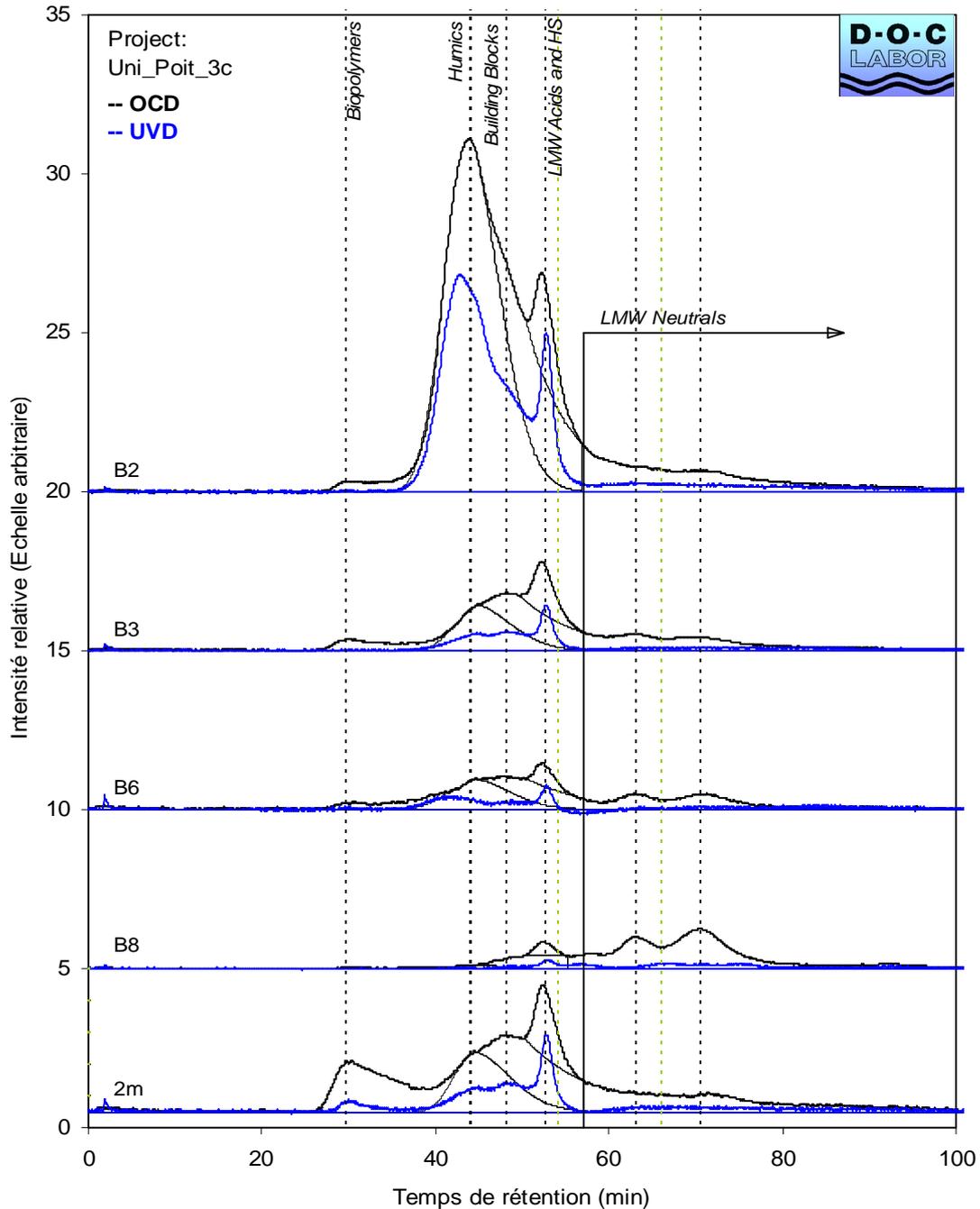


Figure 4.23 : Chromatogrammes LC-UV-OCD de la troisième série d’analyses (envoi 2) effectuée par DOC-LABOR (*LMW : Low Molecular Weight (Molécules de petites tailles moléculaires))

L’ensemble des résultats pour les trois campagnes d’analyse sont répertoriés dans le tableau 4.3. Ce tableau regroupe les teneurs en COD des échantillons (analyse obtenue sur une fraction de l’échantillon by-passée en entrée de la colonne chromatographique) ainsi que les pourcentages relatifs en COD des différentes fractions chromatographiées. Le SUVA des échantillons a également été calculé.

Tableau 4.3 : Concentration en COD, HOC (hydrophobic organic carbone), répartition du COD et SUVA des eaux des différents horizons après réhumidification du monolithe n°3 (Envoi 1 ; 1 = Envoi 1 ; Essai 1)

		COD (mg/L) dont HOC (% - mg/L) (By-pass)				Biopolymères (%-mg/L)				Substances humiques (%-mg/L)				SUVA (m ⁻¹ .mg ⁻¹ .L)			
20 cm	B1	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	
		1 ; 1	1 ; 2	Envoi 2	1 ; 1	1 ; 2	Envoi 2	1 ; 1	1 ; 2	Envoi 2	1 ; 1	1 ; 2	Envoi 2	1 ; 1	1 ; 2	Envoi 2	1 ; 1
50 cm	B2	26,18 (2,2-0,88)	28,44 (2,4-0,67)	-	1,20-0,3	0,90-0,3	-	20,20-5,3	19,10-5,4	-	0,85	1,13	-	-	-	-	
100 cm	B3	-	-	7,65 (3,9-0,3)	-	-	1,90-0,15	-	-	63,60-4,9	-	-	-	-	2,78		
150 cm	B6	8,72 (18,6-1,6)	7,45 (56,5-4,2)	2,05 (2,1-0,04)	5,80-0,5	3,10-1,6	8,40-0,17	18,30-1,6	10,20-0,8	40,00-0,8	1,60	2,02	1,70	-	-	-	
	B7	6,54 (13,8-0,9)	6,72 (33,3-2,2)	3,85 (64,6-2,5)	1,40-0,09	1,20-0,08	3,50-0,13	7,10-0,5	7,60-0,5	13,30-0,5	0,36	0,67	0,79	-	-	-	
	B8	11,56 (7,4-0,9)	10,61 (49,3-5,2)	-	1,00-0,12	0,60-0,06	-	6,90-0,8	5,90-0,6	-	0,63	1,13	-	-	-	-	
20 cm	2m	-	-	1,35 (3,8-0,05)	-	-	1,40-0,02	-	-	7,50-0,1	-	-	-	-	1,40		
50 cm		3,62	4,59 (0,8-0,04)	3,60 (7,8-0,28)	31,52-1,2	29,60-1,4	20,20-0,73	35,91-1,3	27,40-1,3	29,80-1,1	1,72	1,89	1,69	-	-	-	
Molécules de petite taille neutres (<350 g/mol) (%-mg/L)																	
100 cm	B1	Building blocks compri (300 et 450 g/mol) (%-mg/L)				Molécules de petite taille neutres (<350 g/mol) (%-mg/L)				Molécules de petite taille acides (<350 g/mol) (%-mg/L)							
150 cm	B2	Envoi 1 ; 1	Envoi 1 ; 2	Envoi 2	Envoi 1 ; 1	Envoi 1 ; 2	Envoi 2	Envoi 1 ; 1	Envoi 1 ; 1	Envoi 1 ; 1	Envoi 1 ; 2	Envoi 2	Envoi 1 ; 1	Envoi 1 ; 2	Envoi 2	Envoi 2	
	B3	5,40-1,4	5,60-1,6	-	69,60-18,2	69,40-19,7	-	1,50-0,4	2,60-0,8	-	-	-	-	-	-	-	
	B6	-	-	16,60-1,3	-	-	14,00-1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B7	12,50-1,1	8,50-0,6	22,40-0,5	34,00-3,0	18,70-1,4	27,20-0,6	10,80-0,9	3,20-0,2	0	0	0	0	0	0	0	
	B8	4,20-0,3	3,30-0,2	6,90-0,3	73,50-4,8	54,50-3,7	11,60-0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2m		8,80-1,0	4,70-0,5	11,60-0,2	59,00-6,8	38,20-4,1	-	17,00-2,0	1,40-0,1	-	-	-	-	-	-	-	
		-	-	-	-	-	75,70-1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		24,86-0,9	20,00-0,9	19,60-0,7	28,97-1,1	22,20-1,0	22,60-0,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Rappelons que tous les échantillons ont été stockés en chambre froide, non filtrés. Ce n'est qu'au moment de chaque envoi que la filtration a eu lieu. Les microorganismes présents ont pu, même à 4°C, rester actifs pendant la période de stockage (10 jours pour le deuxième envoi).

Dans un premier temps, on remarque que les deux séries d'analyses du premier envoi, réalisées à deux jours d'intervalle possèdent des profils chromatographiques peu communs. Le COD reste du même ordre de grandeur ou diminue légèrement mais on constate surtout une diminution de la concentration avec la profondeur. Ces échantillons présentent également une proportion en structures de petites masses molaires hydrophiles importantes, surtout des structures neutres notamment dans l'horizon de surface (20 cm). Les résultats montrent aussi une présence importante de biopolymères dans l'horizon à 2 mètres pour les deux séries d'analyses du premier envoi, résultats surprenants et difficiles à expliquer. Enfin, les substances humiques semblent être plus importantes dans l'horizon profond pour les deux séries d'analyses du premier envoi qui sont aussi caractérisées par un SUVA plus élevé que dans l'horizon de surface. Le lessivage du sol après une période de sécheresse semble être à l'origine de ces propriétés.

Dans un second temps, les analyses du second envoi (dix jours plus tard) montrent que la quantité de matière organique diminue considérablement (plus de 75% d'abattement) pour les eaux prélevées par bougie poreuse. En effet, au bout de dix jours de stockage, le pic des composés neutres a totalement disparu (21 mg/L de COD éliminés 18 mg/L de LMW neutres). Or, on sait que le lessivage des sols dans de telles conditions climatiques apporte dans les cours d'eau des composés hydrophiles très biodégradables qui sont rapidement assimilés par les microorganismes aquatiques (en quelques heures seulement). Même à faible température (stockage à 4°C), on peut penser que dix jours peuvent suffire pour consommer ces fractions de matières organiques biodégradables. Au bout de dix jours de stockage, les substances humiques deviennent prédominantes dans l'échantillon.

Puis, il est à noter que le profil de l'horizon de surface est comparable à celui obtenu pour des eaux de surface à l'exception du premier envoi qui contient des proportions plus importantes de structures neutres qui doivent provenir des végétaux en décomposition sous l'effet de la sécheresse.

Enfin, on note que la concentration des eaux des plaques à deux mètres reste quant à elle constante, égale à 3,6-4 mg/L. Cette absence d'abattement peut être expliquée de deux façons : la première vient du fait que l'activité microbienne à deux mètres est nettement moins importante qu'aux horizons supérieurs, ce qui limiterait la production du COD ; la

deuxième pourrait s'expliquer par l'utilisation de la fraction biodégradable dans les horizons supérieurs.

IV-4. Evolution de la qualité des eaux collectées à 2 Mètres de profondeur en fonction du temps

L'eau a commencé à couler à 2 Mètres de profondeur (drainage naturel grâce à une tranchée présentant une pente de 2 %) après avoir versé 220 Litres d'eau osmosée sur le monolithe n°3. Le tableau 4.4 donne les volumes d'eau collectés, la concentration en COD et le SUVA en fonction du temps. Il est complété par les données obtenues sur les prélèvements à deux mètres pendant la période allant du 13/11/08 au 14/04/09 (données discutées dans la partie).

Tableau 4.4 : COD et SUVA des eaux collectées à 2 Mètres pendant la phase de réhumidification sur le monolithes n°3

Dates et heures	Volume collecté (L)	COD (mg/L)	SUVA (m ⁻¹ .mg ⁻¹ .L)
13/11/08–14/04/09		0,5 à 1,9	
Troisième jour de réhumidification (220 litres)			
01/07/09 14 h	3,25	7,65	1,75
01/07/09 17 h	2,00	4,71	2,95
02/07/09 9 h	2,00	4,14	
Ajout d'eau osmosée supplémentaire (80 litres)			
03/07/09 12 h	17,00	3,82	2,59
03/07/09 13 h 30	15,00	3,74	2,86
06/06/09 9 h	14,00	2,16	2,87

On remarque que la première collecte d'eau (01/07/09) présente un COD bien plus important que les collectes effectuées tout au long de l'année (13/11/08–14/04/09). Après ce

pic, l'évolution de la concentration en COD semble ensuite décroître jusqu'à atteindre des valeurs plus proche des valeurs usuelles. L'absorbance UV à 254 nm (non présentée) semble suivre la même évolution alors que le SUVA semble lui assez stable, à part pour le premier point collecté.

Les chromatogrammes SEC/UV de ces échantillons sont présentés figure 4.24.

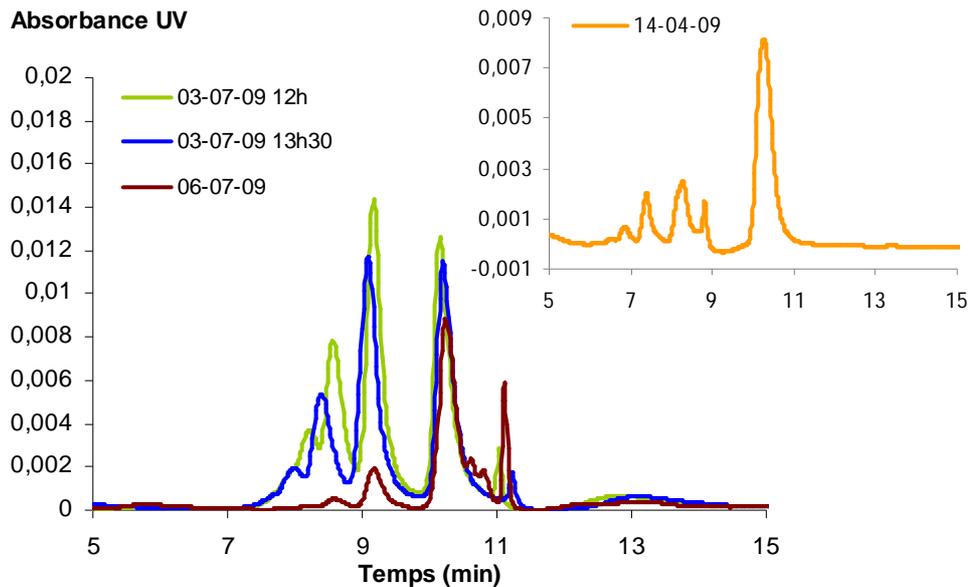


Figure 4.24 : Chromatogramme HPSEC-UV des eaux collectées à 2 mètres du monolithe n°3, à différentes dates.

Les spectres des premières collectes (figure 20) font apparaître des proportions significatives de structures de hautes masses moléculaires ($t_R < 9$ min) à caractères humiques qui sont des composants majeurs de la matière organique soluble des horizons de surface. Elles sont en général peu abondantes à cette profondeur (2 Mètres), comme le montre le profil du 14 Avril 09. Cette fraction de matière organique soluble disparaît peu à peu au fil des prélèvements. Cette observation est en accord avec les valeurs de COD et d'UV à 254 nm, plus élevées pour les premiers points de la collecte. Le spectre du 06 Juillet à 9h, ainsi que ses valeurs en COD et UV à 254 nm sont plus proches des spectres habituellement observés à cette profondeur (comme celui du 14 Avril 09 par exemple). La proportion relative de petites molécules devient plus importante.

Cependant il est à noter qu'il est possible qu'une réhumidification brutale puisse entraîner rapidement des matières organiques solubles de surface vers les horizons profonds par des chemins préférentiels, malgré les précautions prises expliquant ainsi les profils de SEC/UV et les valeurs de COD et d'UV à 254 nm observés.

V. Conclusion

Le suivi des eaux collectées au niveau des PL et des BP met en évidence une évolution significative des teneurs en COD au cours du temps dans tous les traitements. Des variations cycliques des concentrations en COD ont été observées, avec une augmentation pendant l'hiver jusqu'au milieu du printemps suivie d'une diminution en fin d'année. En été après plusieurs mois d'une pluviosité insuffisante pour permettre un échantillonnage en profondeur on observe une augmentation très significative du COD jusqu'à 4-5 mg.L⁻¹. Cette valeur plus forte en COD s'associe à une augmentation de la proportion relative en structures de hautes masses moléculaires i.e. substances humiques. L'étude de l'impact des cycles de sécheresse-réhumidification à partir des monolithes peut expliquer en partie cette augmentation. En effet, la réhumidification brutale qui pourrait correspondre aux premières pluies après un été sec s'accompagne de changements qualitatifs et quantitatifs importants sur la matière organique soluble des sols. Les premières eaux collectées montrent une augmentation significative des concentrations en COD, observé au niveau de tous les horizons. Cette matière organique est composée majoritairement de molécules hydrophiles de petite taille, qui semble être très biodégradable (disparition du pic en chromatographie d'exclusion de taille au bout de 10 jours). De nombreux travaux restent encore à réaliser pour pouvoir comprendre ce phénomène. Dans cette étude, seule une séquence d'assèchement-réhumidification a pu être réalisée.

Cette augmentation de la concentration en COD en été s'accompagne également d'une augmentation du SUVA, donc du caractère aromatique de la MO et d'un décalage de la position des chromophores en fluorescence vers les plus fortes longueurs d'onde traduisant une augmentation des structures de hautes masses moléculaires.

Le suivi de la dynamique de l'azote n'a pas permis d'aboutir à des conclusions très originales. En effet, la dynamique temporelle de l'azote ne semble pas suivre une logique particulière en fonction de la température ou de la pluviométrie comme le carbone. De plus les résultats obtenus pour les deux parcelles qui ont subi un apport d'engrais azoté sont assez différents, phénomène que l'on doit probablement attribuer à l'hétérogénéité des sols.

Plusieurs hypothèses peuvent être mises en avant pour expliquer cette augmentation de la concentration en COD et cette évolution de distribution de taille. Ces changements pourraient être dû soit à une augmentation de la respiration des sols donc de l'activité microbienne (VANHALA et al. 2008), soit à l'accumulation de la matière organique due à l'absence de précipitation (WILSON et al. 2008), soit indirectement à une augmentation de l'activité enzymatique (FREEMAN et al. 2001).

CHAPITRE 5 : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES MATIERES ORGANIQUES SOLUBLES DES SOLS : HORIZONS PROFOND ET HORIZON DE SURFACE

I. Introduction

Ce chapitre est consacré à la caractérisation indirecte de la fraction soluble des MOS des horizons profonds (105 cm), la dénomination indirecte faisant référence à la nécessité d'isoler les matières organiques solubles de la matrice minérale pour pouvoir mettre en œuvre des outils analytiques de caractérisation moléculaires pour lesquels les sels minéraux interfèrent de manière significative. L'obtention de quantité de matières nécessaire à l'utilisation de tels outils implique de travailler avec des volumes d'eau importants. Cette contrainte constitue un handicap notable qui justifie le fait, qu'à notre connaissance, il n'existe pas de tels travaux dans la littérature portant notamment sur la caractérisation de la fraction soluble des MOS d'horizon profond isolée à partir de prélèvements in situ.

Deux campagnes d'extraction ont été réalisées sur des eaux collectées par bougies poreuses ou plaques lysimétriques en 2007 et en 2008 sur les différentes parcelles. Pour rappel, les dix parcelles étudiées sont séparées en cinq traitements de T1 à T5 avec différents modes d'occupation culture/prairie sur des durées différentes. Le tableau 5.1 présente pour rappel ces différents traitements et le mode d'occupation des parcelles sur les vingt prochaines années. L'année 1 correspondant à l'année 2005. Les différences existantes entre l'année 2007 et 2008 reposent sur les parcelles T1 et T2. En effet, pendant les trois premières années (2005-2007), elles ont été mises sous culture puis les parcelles du traitement T2 ont été transformées en prairies. En ce qui concerne les traitements T3 et T5, ils sont identiques tout au long de ces travaux. Enfin, le traitement T4 se différencie des traitements T3 et T5 par un appauvrissement en azote.

On précisera que ce protocole d'extraction sur résines permet d'isoler et de séparer les matières organiques dissoutes en trois fractions HPO, TPH, HPI, fractionnement basé sur des critères de solubilité (taille moléculaire, hydrophobicité).

Tableau 5.1 : Mode d'occupation des parcelles du site de l'ORE (rga : ray-grass)

1, 2, 3, 4, 5, 6 ... **années** → 20...

Dispositif petites parcelles

T1	culture	c1	c2	c3	c1															
T2	P 3ans N+ fauche	c1	c2	c3	1	2	3	c1	c2	c3	1	2	3	c1	c2	c3	1	2	3	c1
T3	P 6ans N+ fauche	1	2	3	4	5	6	c1	c2	c3	1	2	3	4	5	6	c1	c2	c3	1
T4	P 6ans N- fauche	1	2	3	4	5	6	c1	c2	c3	1	2	3	4	5	6	c1	c2	c3	1
T5	P 20ans N+ fauche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

c1 c2 c3 → **Séquence cultures: maïs – blé – orge**

1 2 3 ... → **Séquence prairies: féтуque élevée + dactyle + rga + (trèfle blanc)**

Pour compléter nos travaux nous avons également choisi de travailler sur des fractions équivalentes isolées à partir d'une solution de sol (lixiviation en colonne) préparée à partir d'un échantillon d'horizon 0-30 cm.

Nos travaux peuvent donc être considérés comme novateurs. Dans ce contexte, nous avons choisi de comparer les données issues des mêmes techniques analytiques sur des fractions isolées préalablement au laboratoire à partir de diverses eaux de surface en utilisant la même procédure d'extraction par résines XAD-8 et XAD-4.

Les fractions ainsi obtenues ont fait l'objet de nombreuses analyses structurales associant des analyses spectrométriques (RMN ¹³C, IR, fluorescence,...), chromatographiques (Pyrolyse CG/SM, MSSV/GC/MS, monomères de sucres) et isotopiques (¹³C, ¹⁴C). La collaboration avec plusieurs laboratoires extérieurs à l'Université de Poitiers dont un laboratoire étranger (University of Curtin – Perth Australie) a permis la mise en œuvre d'une très grande variété de techniques analytiques. La complémentarité de ces outils a permis d'apporter des informations essentielles à l'identification structurale des MOS solubles d'horizon profond.

Ce chapitre sera structuré en deux parties, dans un premier temps nous présenterons les résultats obtenus pour les différentes techniques analytiques puis dans un second temps ces résultats seront discutés par rapport à la littérature. Nous avons choisi de présenter ce chapitre en deux parties afin de s'appuyer sur des travaux antérieurs au laboratoire. Ces travaux avaient eu pour objectifs de travailler essentiellement sur les MOD d'eaux de surface d'origines différentes.

II. Résultats

II-1. Extraction des matières organiques solubles des sols sur résines XAD

Dans un premier temps, l'un des prélèvements par bougie poreuse (i.e. horizon profond) à fait l'objet de la phase préliminaire de la procédure d'extraction qui consiste, après concentration par évaporation rotative, à développer une étape de dialyse avec une membrane de 3500 daltons dans le but d'isoler une fraction dite « Colloïdes ». Cette première manipulation n'a pas montré une présence significative de MO de hautes masses moléculaires dans les eaux collectées contrairement à ce qui est généralement observé dans les eaux de surface après filtration sur une membrane de porosité 1 μm . Ce résultat montre que le sol joue un rôle de barrière filtrante pour les structures colloïdales, résultat en accord avec les observations réalisées sur les eaux souterraines généralement exemptes de turbidité notable. Toutefois les résultats obtenus par analyse directe LC-OCD (cf chapitre 4) sur des prélèvements ponctuels équivalents ont montré la présence de structures colloïdales. Ce résultat contradictoire peut trouver deux explications. Soit les colloïdes sont présents de manière sporadique, soit les colloïdes observés sont principalement d'origine inorganique. Quoiqu'il en soit, il a été décidé au regard de ces premiers résultats, de simplifier le protocole d'extraction en supprimant cette première étape de concentration-dialyse proposé par LEENHEER et al., (2000).

Les tableaux 5.2a ; 5.2b et 5.2c présentent les caractéristiques des échantillons (volume, COD, SUVA) à partir desquels les campagnes d'extraction ont été réalisées.

Tableau 5.2a : Caractéristiques des eaux soumises à la procédure d'extraction sur résines XAD-8 et XAD-4 en 2007 et 2008

T1 Plaque 2007	Volume (L)	COD		SUVA (m- ¹ .L/mgC)	T4 Plaque 2007	Volume (L)	COD		SUVA (m ⁻¹ .L/mgC)
		mg/L	Rdt (%)				mg/L	Rdt (%)	
Eau brute	40	1,20	-	1,3	Eau brute	20	1,83	-	1,5
Eau concentrée	7	6,80	99	1,5	Eau concentrée	8	4,28	94	1,6
Perméat XAD-8	7	3,75	55	-	Perméat XAD-8	8	2,35	55	-
Perméat XAD-4	7	2,52	38	-	Perméat XAD-4	8	1,56	36	-

Tableau 5.2b : Caractéristiques des eaux soumises à la procédure d'extraction sur résines XAD-8 et XAD-4 en 2007 et 2008

T mélange		COD			COD				
Plaques (T3+T5) 2007	Volume (L)	mg/L	Rdt (%)	SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)	T1 Plaque 2008	Volume (L)	mg/L	Rdt (%)	SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)
Eau brute	105	2,14	-	1,2	Eau brute	80	1,35	-	1,2
Eau concentrée	10	21,92	98	1,3	Eau concentrée	10	9,85	91	1,6
Perméat XAD-8	10	12,23	56	-	Perméat XAD-8	10	5,31	54	-
Perméat XAD-4	10	8,04	36	-	Perméat XAD-4	10	3,53	36	-
T2 Plaque 2008	Volume (L)	mg/L	Rdt (%)	SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)	T3 Plaque 2008	Volume (L)	mg/L	Rdt (%)	SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)
Eau brute	55	1,26	-	1,4	Eau brute	50	1,42	-	1,3
Eau concentrée	10	6,63	96	1,4	Eau concentrée	9	7,74	98	1,5
Perméat XAD-8	10	3,62	53	-	Perméat XAD-8	9	4,29	55	-
Perméat XAD-4	10	2,31	35	-	Perméat XAD-4	9	2,90	37	-
T4 Plaque 2008	Volume (L)	mg/L	Rdt (%)	SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)	T5 Plaque 2008	Volume (L)	mg/L	Rdt (%)	SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)
Eau brute	50	1,31	-	1,3	Eau brute	65	1,36	-	1,4
Eau concentrée	10	6,36	97	1,4	Eau concentrée	10	8,54	97	1,5
Perméat XAD-8	10	3,41	54	-	Perméat XAD-8	10	4,67	55	-
Perméat XAD-4	10	2,35	37	-	Perméat XAD-4	10	3,09	36	-

Tableau 5.2c) : Caractéristiques des eaux soumises à la procédure d'extraction sur résines XAD-8 et XAD-4 en 2007 et 2008

T1 Bougie 2007	Volume (L)	COD		SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)	T2 Bougie 2007	Volume (L)	COD		SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)
		mg/L	Rdt (%)				mg/L	Rdt (%)	
Eau brute	17	1,22	-	1,3	Eau brute	30	1,13	-	1,4
Eau concentrée	7	2,83	96	1,5	Eau concentrée	5	6,64	98	1,5
Perméat XAD-8	7	1,70	60	-	Perméat XAD-8	5	3,98	60	-
Perméat XAD-4	7	1,10	38	-	Perméat XAD-4	5	2,18	33	-

T3 Bougie 2007	Volume (L)	COD		SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)	T4 Bougie 2007	Volume (L)	COD		SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)
		mg/L	Rdt (%)				mg/L	Rdt (%)	
Eau brute	14	1,44	-	1,2	Eau brute	14	1,11	-	1,3
Eau concentrée	4	4,99	99	1,3	Eau concentrée	4	3,53	91	1,4
Perméat XAD-8	4	2,87	57	-	Perméat XAD-8	4	1,96	56	-
Perméat XAD-4	4	1,71	34	-	Perméat XAD-4	4	1,14	35	-

T5 Bougie 2007	Volume (L)	COD		SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)	Solution de sol 0-30 cm	Volume (L)	COD		SUVA (m ⁻¹ .L/mg C)
		mg/L	Rdt (%)				mg/L	Rdt (%)	
Eau brute	28	1,62	-	1,2	Eau brute	60	1,85	-	2,8
Eau concentrée	5	8,89	98	1,4	Eau concentrée	10	10,20	92	3,0
Perméat XAD-8	5	5,12	58	-	Perméat XAD-8	10	4,12	40	-
Perméat XAD-4	5	3,15	36	-	Perméat XAD-4	10	1,85	18	-

La phase de pré-concentration par évaporation rotative réalisée pour manipuler des volumes plus faibles et plus concentrés en COD peut-être considérée comme quantitative. Les pertes restent dans le domaine de l'erreur analytique du COT-mètre (quelques pourcents) avec quelques exceptions où le taux de recouvrement est de 91 %. Logiquement les SUVA restent inchangés, on note toutefois une très légère, mais systématique, augmentation de 0,1 à 0,2

unité ; à l'exception de T1 Plaque 2008 dont l'augmentation atteint 0,4 unité s'associant à une perte de COD de 9 %. Ces résultats suggèrent une perte de composés non humiques i.e. composés de faibles masses moléculaires à caractère volatil ou semi volatil.

Pour les échantillons des horizons profonds, les fractions non adsorbées (perméats) s'élèvent à environ 55 % et 35 % du concentrât sur les résines XAD-8 et XAD-4 respectivement. Pour la solution de sol, horizon 0-30 cm, les rendements d'adsorption sont plus forts, et également de plus fortes teneurs en COD des perméats XAD-8 et XAD-4, respectivement 40 et 18 %. Ces résultats sont en accord avec un SUVA significativement plus élevé.

Le fractionnement sur résines XAD permet de déterminer la distribution du COD des différentes eaux collectées, distribution qui correspond aux rendements d'adsorption sur les deux résines en série, fraction HPO pour la résine XAD-8, TPH pour la résine XAD-4 et HPI pour la fraction non adsorbée sur ces deux résines (tableau 5.3).

Tableau 5.3 : Distribution du COD des eaux adsorbées sur résines XAD-8 et XAD-4 pour les traitements T1 à T5 des plaques et bougies et de l'horizon de surface 0-30 cm

Traitements	Année 2007			Année 2008			
	HPO (%)	TPH (%)	HPI (%)	HPO (%)	TPH (%)	HPI (%)	
Plaques	T1	45	17	38	46	18	36
	T2	45	19	36	47	18	35
	T3	47	20	33	45	18	37
	T4	45	19	36	46	17	37
	T5	44	21	35	45	19	36
Bougies	T1	40	22	38	-	-	-
	T2	40	27	33	-	-	-
	T3	43	23	34	-	-	-
	T4	44	21	35	-	-	-
	T5	42	22	36	-	-	-
Horizon 0-30 cm	60	22	18				

Les distributions du COD établies pour les eaux des plaques lysimétriques et pour les bougies poreuses varient de 40% à 47% pour la fraction HPO, de 17% à 27% pour la fraction TPH et de 33% à 38% pour la fraction HPI. Ces résultats montrent que les eaux des plaques et des bougies présentent une fraction non humique (TPH + HPI) légèrement dominante. On relèvera également que les bougies possèdent des proportions plus importantes en TPH et moins importantes en HPO par rapport aux plaques. D'un point de vue général, il n'existe pas de différences significatives/flagrantes dans la distribution du COD des parcelles T1 à T5.

Les résultats obtenus sur le fractionnement de la solution de sol de l'horizon de surface 0-30 cm montrent des différences par rapport à ceux des plaques et des bougies. Cette distribution montre que l'horizon de surface possède une fraction HPO (hydrophobe, 60%) beaucoup plus importante (caractère humique plus marqué) que l'horizon profond. Les substances non-humiques contrairement à l'horizon profond sont minoritaires (< 50%).

Les premières observations permettent de montrer une différence de distribution importante entre la surface et la profondeur. L'horizon de surface étant constitué majoritairement de composés humiques hydrophobes (60%) alors que l'horizon profond possède une majorité de substances non humiques (TPH+ HPI).

A partir des rendements d'élution et d'extraction de chacune des résines, il a été possible de déterminer le rendement global d'extraction du COD par cette procédure. Le tableau 5.4 présente l'efficacité de la procédure d'extraction des fractions hydrophobes et transphiliques retenues respectivement sur les résines XAD-8 et XAD-4. Dans ce tableau a été calculé le rendement d'élution qui correspond à la quantité de COD éluee (calculée à partir de la masse d'extrait lyophilisé et de sa teneur en carbone déterminée par COT-mètre après remise en solution d'une quantité connue) sur la quantité de COD adsorbé multiplié par 100. Le rendement d'extraction est égal au rendement d'adsorption multiplié par le rendement d'élution. Enfin, le rendement global d'extraction correspond à la somme des rendements d'extraction obtenus pour les résines XAD-8 et XAD-4.

Tableau 5.4 : Efficacité de la procédure d'extraction sur résines XAD-8 et XAD-4

Echantillons	Résine XAD-8		Résine XAD-4		Rendement global de l'extraction du COD (%)
	Rendement d'élution du COD (%)	Rendement d'extraction du COD (%)	Rendement d'élution du COD (%)	Rendement d'extraction du COD (%)	
	T1 Plaques 2008	65	29	63	
T2 Plaques 2008	70	33	65	12	45
T3 Plaques 2008	65	29	65	12	41
T4 Plaques 2008	73	34	66	12	46
Horizon 0-30 cm	90	54	86	19	73

Les rendements d'extraction sur résines XAD-8 et XAD-4 (ne prennent pas en compte la fraction HPI) du tableau 5.4 varient entre 40 et 46 % dans l'horizon profond alors qu'il est supérieur à 70 % pour l'horizon de surface. Ces valeurs sont pour l'horizon profond inférieures à celles classiquement retrouvées dans la littérature (AIKEN et al., 1992 et MARTIN, 1995) variant généralement de 60 à 90 %. L'extraction sur résines XAD serait donc moins performante pour l'extraction du COD de l'horizon profond des sols. Par conséquent, les structures organiques seraient moins solubles dans l'acétonitrile (élution acétonitrile/eau 75%/25%), moins polaires, moins chargées que les structures isolées d'eau de surface, différence à retenir au niveau de la discussion

Enfin, le tableau 5.5 récapitule les différents extraits obtenus par l'extraction sur résines XAD au cours des deux campagnes de 2007 et 2008. Les extraits HPI de chacune des parcelles n'ont pas permis d'obtenir assez de matière pour permettre d'appliquer les différentes techniques d'analyses. C'est pourquoi les deux campagnes ont été regroupées par année sans distinction de parcelles. En plus des échantillons des horizons profonds, des échantillons isolés de l'horizon de surface ont été étudiés.

Tableau 5.5 : Echantillons d'horizon profond étudiés dans ce manuscrit (plaques et bougies)

		Année 2007			Année 2008		
		Fractions					
	Parcelles	HPO	TPH	HPI	HPO	TPH	HPI
Plaques	T1	x	x		x	x	
	T2	x	x		x	x	
	T3	x	x	x	x	x	x
	T4	x	x		x	x	
	T5	x	x		x	x	
Bougies	T1	x	x		-	-	
	T2	x	x		-	-	
	T3	x	x	-	-	-	-
	T4	x	x		-	-	
	T5	x	x		-	-	

II-2. Rapport carbone/azote et SUVA des MOD des sols

Les teneurs en carbone et en azote des différents extraits ont été déterminées après remise en solution dans l'eau ultrapure avec l'analyseur SHIMADZU équipé de la double détection COT et Nt. Les rapports C/N ont ainsi été calculés, rapports sensés refléter uniquement la composition de la matrice organique, les extraits étant supposés exempts d'azote inorganique (non adsorbé sur résines XAD et éliminé lors des phases de purification pour les HPI).

Les tableaux 5.6 et 5.7 montrent respectivement les rapports C/N et le SUVA obtenus pour les différents extraits.

Tableau 5.6 : Rapport C/N des différents extraits de MOD des horizons profond et de surface

Parcelles	Année 2007			Année 2008		
	Plaques			Plaques		
	HPO	TPH	HPI	HPO	TPH	HPI
T1	13,8	5,3		13,2	4,9	
T2	13,3	5,0		13,3	4,8	
T3	13,9	4,6	3,9	13,6	5,0	4,4
T4	14,5	4,3		14,0	4,7	
T5	13,4	4,4		13,4	4,8	
	Bougies					
	HPO	TPH	HPI			
T1	13,9	4,9				
T2	13,6	4,7				
T3	13,3	4,3	-			
T4	13,8	4,5				
T5	14,0	5,0				
Horizon de surface	HPO	TPH	HPI			
0-30 cm	15,1	11,2	-			

Les ratios C/N obtenus pour les fractions HPO des horizons profonds varient entre 13,2 et 14,5 et sont légèrement inférieurs à celui obtenu pour l'horizon de surface (C/N = 15). Pour la fraction TPH, les ratios C/N sont beaucoup plus faibles variant entre 4 et 5. Ces valeurs sont presque trois fois moins importantes que celles observées dans la fraction TPH de l'horizon de surface (C/N = 11). Ceci montre la présence beaucoup plus importante d'azote donc de composés azotés dans la fraction TPH dans la fraction soluble des matières organiques de l'horizon profond par rapport à celles de l'horizon de surface. Les deux fractions HPI présentent des rapports C/N légèrement inférieurs à ceux des fractions TPH correspondantes, 3,9 et 4,4. On relève ainsi une augmentation de la teneur en structures azotées avec le caractère hydrophile de la matrice organique i.e. HPI > TPH > HPO.

Tableau 5.7 : SUVA des différents extraits de MOD des horizons profonds et de surface

Parcelles		Année 2007			Année 2008		
Plaques	HPO	TPH	HPI	HPO	TPH	HPI	
T1	1,3	1,3		1,2	1,2		
T2	1,4	1,3		1,4	1,1		
T3	1,5	1,1	0,8	1,5	1,2	0,7	
T4	1,5	1,0		1,3	1,3		
T5	1,6	1,2		1,2	1,0		
Bougies	HPO	TPH	HPI	HPO	TPH	HPI	
T1	1,1	1,2		-	-		
T2	1,1	1,2		-	-		
T3	1,4	1,3	-	-	-	-	
T4	1,3	1,1		-	-		
T5	1,4	1,3		-	-		
Horizon de surface	HPO	TPH	HPI				
0-30 cm	2,4	1,5	-				

Les extraits HPO d'horizons profonds possèdent des valeurs de SUVA comprises entre 1 et 1,6. Ces valeurs sont largement inférieures à celles observées pour l'horizon de surface (SUVA = 2,4). Les extraits TPH possèdent des valeurs comparables aux HPO comprises entre 1 et 1,4. Ces valeurs sont légèrement inférieures à celles observées dans l'horizon de surface. Enfin, malgré le peu de résultats sur la fraction HPI, il est à noter une valeur de SUVA faible (0,7-0,8) dans les horizons profonds. Il faut également noter que les extraits HPO des plaques de l'année 2007 possèdent des valeurs de SUVA systématiquement supérieures à celles relevées pour les extraits isolés en 2007 à partir des eaux collectées par bougies. Les valeurs des extraits HPO des plaques de l'année 2007 sont également supérieures à celles obtenus pour les extraits HPO des plaques de l'année 2008.

II-3. Spectrofluorimétrie

Les analyses en spectrofluorimétrie ont été réalisées après remise en solution des extraits de MOD dans de l'eau ultrapure. Les solutions obtenues ont des concentrations en carbone de $5 \pm 0,2$ mg C/L. A partir de ces solutions, des spectres dits EEM pour « Excitation Emission Matrix » ont été réalisés. La figure 5.1 montre les spectres obtenus pour les fractions HPO et TPH de l'horizon profond et de l'horizon de surface et pour un extrait HPI. Quelle que soit la parcelle étudiée et le mode de prélèvements utilisé (bougies/plaques), ces spectres mettent en évidence deux chromophores appelés C et A dans la littérature (COBLE, 1996). Selon les travaux de CHEN et al. (2003), ces deux fluorophores C et A sont situés respectivement dans les régions V (acide humique) et III (acide fulvique). La position de ces chromophores et leur enveloppe spectrale varie en fonction de l'origine et de la nature de l'extrait (Tableau 5.8).

Les premières observations ne montrent pas de différences significatives entre les extraits obtenus au niveau des différentes parcelles, mais elles permettent de voir un décalage vers les plus faibles valeurs d'excitation et d'émission pour les extraits de MOD de l'horizon profond comparativement à ceux de l'horizon de surface.

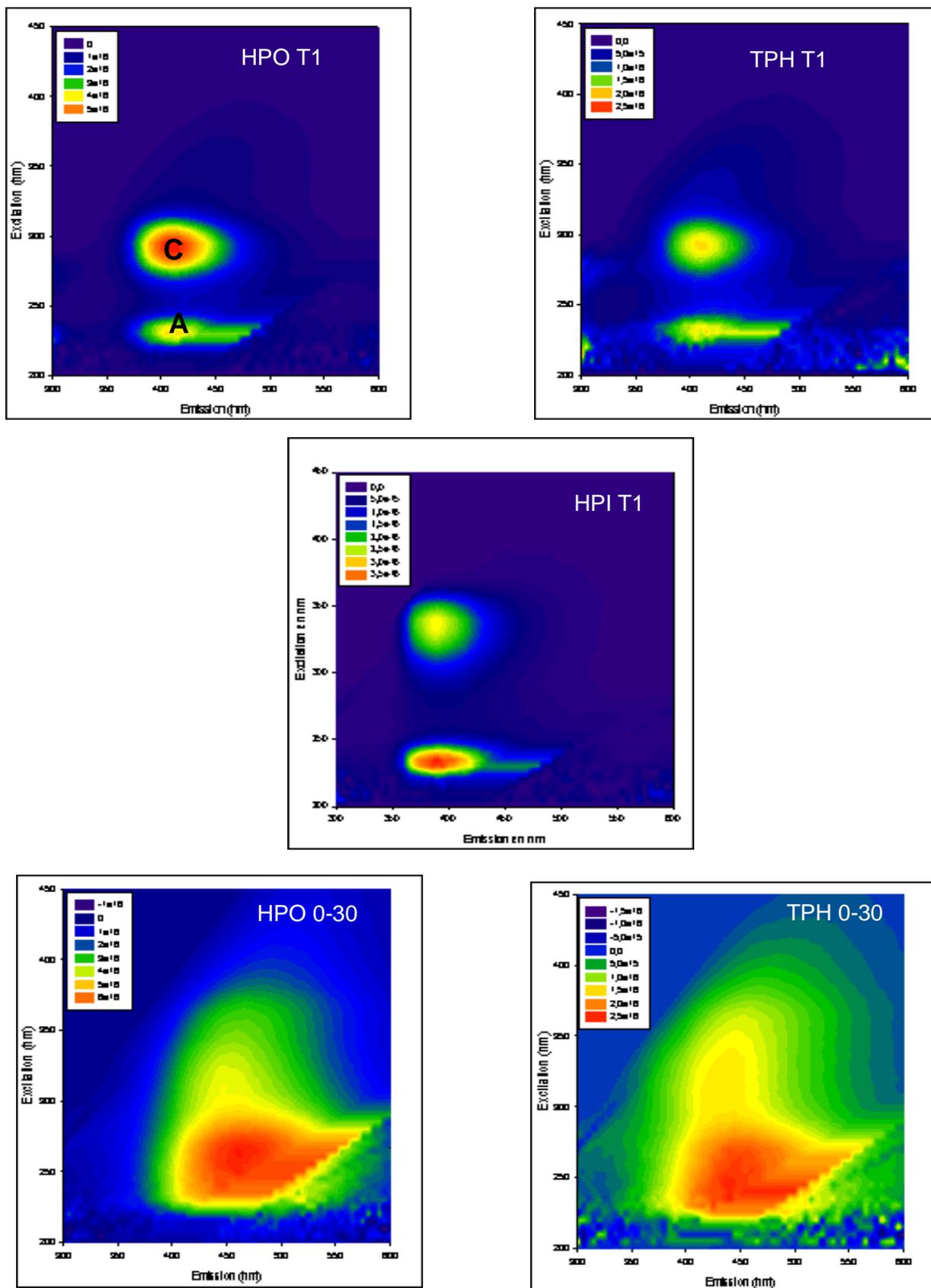


Figure 5.1 : Spectres EEM des fractions HPO, TPH et HPI de l'horizon profond et de l'horizon de surface 0-30 cm C'est quoi plaque ou bougie

Tableau 5.8 : Position des chromophores, ratio V_C/V_A (Volume chromophores C et A) et indices HIX et BIX de quelques extraits de plaques lysimétriques

Extraits	Positions des chromophores		Volume chromophores	HIX	BIX
	C (Ex/Em)	A (Ex/Em)	C et A		
	en nm	en nm	V_C/V_A		
HPO T1	280/410	230/410	1,96	12	0,70
TPH T1	285/410	235/410	1,46	10	0,80
HPI T1	340/390	235/390	-	-	-
HPO T2	280/410	230/410	1,83	13	0,68
TPH T2	280/410	235/410	1,43	9	0,82
HPO T3	285/415	235/415	1,85	13	0,65
TPH T3	280/410	230/410	1,47	11	0,90
HPO T4	285/410	235/410	1,81	12	0,66
TPH T4	280/415	230/415	1,59	10	0,90
HPO T5	285/410	230/410	1,85	14	0,65
TPH T5	280/410	235/410	1,48	10	0,72
HPO 0-30	320/455	260/455	0,50	18	0,45
TPH 0-30	330/450	250/450	0,84	16	0,50

Les spectres EEM des extraits de MOD de l'horizon profond sont très différents de ceux enregistrés pour les extraits de l'horizon de surface. Les enveloppes spectrales des deux chromophores sont moins larges, mieux définies, attestant probablement de la présence de structures moins complexes en profondeur qu'en surface. En ce qui concerne la fraction HPI, comme les fractions HPO et TPH, elle possède deux chromophores bien définis avec des positions totalement différentes par rapport aux autres fractions.

En utilisant le logiciel MATLAB et un programme de calcul s'appuyant sur quelques approximations mathématiques, nous avons pu intégrer les enveloppes spectrales et ainsi calculer le ratio Volume C/Volume A qui permet d'apprécier l'abondance relative des deux chromophores. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.8. Les résultats montrent que les extraits HPO et TPH des horizons profonds possèdent des ratios C/A supérieurs à ceux de l'horizon de surface. La MOD des horizons profonds posséderait des proportions plus importantes en structures de type fulvique qu'en structures de type humique au contraire de

l'horizon de surface plus riche en structure humique. Si l'on compare les ratios HPO et TPH, on note que les fractions HPO possèdent des ratios C/A supérieurs à ceux des fractions TPH. Les fractions HPO seraient donc constituées d'une proportion de structures de type humique plus importante que les fractions TPH.

Enfin, pour compléter les analyses en spectrofluorimétrie, nous avons déterminé deux indices couramment utilisés dans le domaine de la fluorescence et surtout dans le domaine des eaux naturelles. L'indice HIX qui correspond à l'indice du degré d'humification de la matière organique (ZSOLNAY et al. 1999) et l'indice BIX correspondant à l'indice de contribution autochtone récente. L'indice HIX est calculé par le ratio H/L de deux régions d'un spectre d'émission pour une excitation de 254 nm. Les deux zones sont calculées entre 300 et 345 nm pour la région L et entre 435 et 480 nm pour la région H. Généralement une augmentation du degré d'aromaticité de la matière organique, c'est-à-dire un décalage du spectre d'émission vers le rouge, se traduit par une augmentation de l'indice HIX et donc à la présence de molécules complexes de haut poids moléculaire (SENESI et al. 1991). La détermination de l'indice BIX permet de prévoir la présence du fluorophore β caractéristique de l'activité biologique notamment dans les échantillons d'eau. L'indice BIX correspond au ratio de l'intensité de fluorescence à 380 et 430 nm pour une longueur d'onde d'excitation fixe de 310 nm. Une augmentation de l'indice BIX est liée à une augmentation de la concentration en fluorophore Béta. Les indices HIX et BIX évoluent de manière inverse, plus l'indice HIX est grand plus l'indice BIX est faible et inversement.

Les résultats concernant l'indice HIX montrent que les fractions de l'horizon profond possèdent des valeurs plus faibles (14-9) par rapport aux fractions de l'horizon de surface (19-17). Ce résultat montre que les fractions HPO et TPH de la surface sont décalées vers les plus fortes longueurs d'onde (le rouge) résultant d'une plus grande proportion de molécule complexes de haut poids moléculaire en surface par rapport à l'horizon profond. Enfin, on peut noter que la fraction HPO (14-12) possède un indice HIX supérieur à la fraction TPH (11-9). Elle serait donc constituée de molécules plus complexes, de plus haut poids moléculaire.

Enfin, les résultats de l'indice BIX montrent des valeurs entre 0,7 et 0,9. Ces valeurs sont relativement similaires quels que soit les traitements. De manière générale, un indice BIX > 1 indique une activité biologique importante avec l'apport de matière organique fraîche et un indice $< 0,7$, une faible activité biologique avec un apport autochtone faible. Les résultats

obtenus pour les fractions de l'horizon profond semblent montrer que l'apport autochtone de matière organique fraîche est relativement faible.

II-4. Chromatographie d'exclusion de taille haute performance (HPSEC) détection UV et azote

La chromatographie d'exclusion de taille permet la séparation des molécules en fonction de leur masse moléculaire. Les composés de taille importante sont exclus de la porosité de la phase stationnaire et sont donc rapidement élués. Au contraire, les composés de taille plus réduite pénètrent dans la porosité du gel et présentent donc un temps de rétention plus long.

La figure 5.2 montre des exemples de chromatogramme obtenus pour les extraits HPO et TPH de l'horizon profond (traitements T1) et de l'horizon de surface (0-30 cm) avec une détection UV (254 nm) et une détection azote total (N_T). Ces différents chromatogrammes mettent en évidence les mêmes pics chromatographiques numérotés de 1 à 5 ; par contre l'intensité de ces différents pics varie avec la nature de l'échantillon. Le tableau 5.9 présente l'abondance relative de ces 5 pics chromatographiques enregistrés par détection UV et N_t . Ces pics chromatographiques sont référencés par rapport à leur temps de rétention et par rapport à leur masse moléculaire déterminée à partir de l'établissement d'une droite de calibration (cf chapitre 2 : matériel et méthodes). La masse moléculaire proposée correspond au temps de rétention du pic chromatographique. En complément, ce tableau 5.9 compare les valeurs de concentration en azote, obtenues par analyse globale réalisée avec l'analyseur Shimadzu TOC/TN avec celles obtenues par intégration des pics chromatographiques enregistrés par analyse SEC/TN. Rappelons que pour ces analyses, les concentrations en azote ont été ajustées entre 1,5 et 2,0 mgN/L pour tous les échantillons. Les concentrations en carbone sont de ce fait variables d'un échantillon à l'autre.

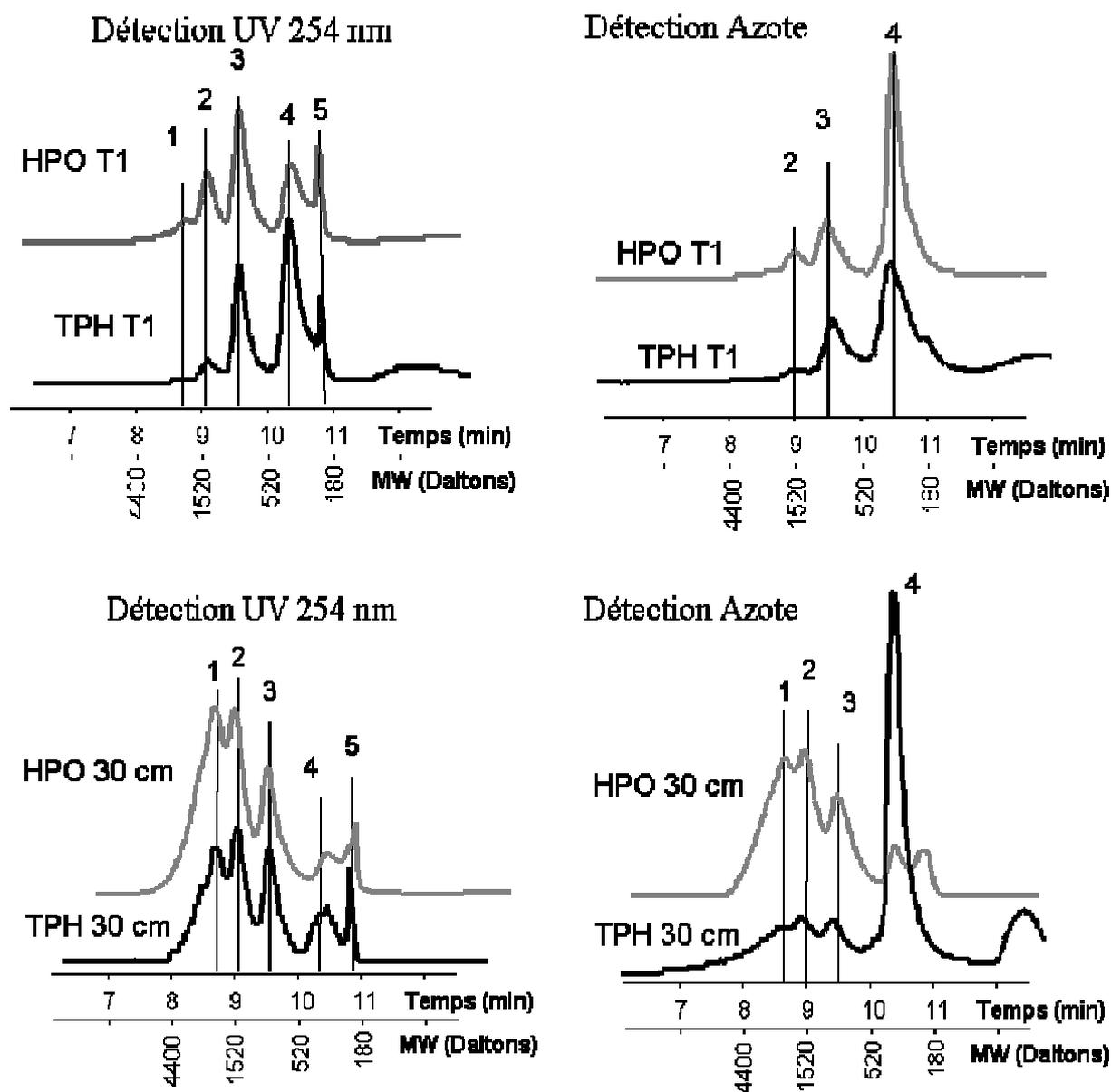


Figure 5.2 : Chromatogrammes obtenus avec le détecteur UV à 254 nm et azote pour différents extraits HPO et TPH

Tableau 5.9 : Abondance relative (%) des pics identifiés dans les extraits HPO et TPH des échantillons étudiés (détection UV et azote)

Echantillons	Azote Total mg/L (Shimadzu)	Azote		Distribution relative (%)								
		Total mg/L (SEC/TN)	Pic 1		Pic 2		Pic 3		Pic 4		Pic 5	
			2500 Da		1500 Da		1000 Da		400 Da		200 Da	
			UV	N	UV	N	UV	N	UV	N	UV	N
HPO T1	1,90	1,85	15	0	23	13	28	20	33	67	1	0
TPH T1	1,97	1,90	3	0	13	5	35	30	47	65	2	0
HPO T2	1,95	1,91	13	0	22	12	30	21	34	66	2	0
TPH T2	1,85	1,88	2	0	14	6	37	30	45	64	2	0
HPO T3	1,44	1,50	15	0	20	14	28	21	35	65	2	0
TPH T3	1,92	1,94	2	0	15	5	36	29	44	66	3	0
HPO T4	1,49	1,49	17	0	22	10	27	22	33	68	1	0
TPH T4	1,87	1,88	2	0	15	5	33	28	48	69	2	0
HPO T5	1,95	1,91	14	0	23	12	26	21	36	69	1	0
TPH T5	2,07	2,06	3	0	14	6	34	30	47	64	2	0
HPO 0-30	1,87	1,92	47	36	26	20	17	26	10	8	1	10
TPH 0-30	2,01	1,96	39	10	20	9	25	11	15	70	1	0

Il est important de préciser que l'on considère que l'azote mesuré est d'origine organique puisque les ions nitrates ne sont pas adsorbés sur les résines XAD. On peut donc parler d'azote organique dissous NOD.

Le tableau 5.9 montre que les teneurs en NOD obtenues par analyseur Shimadzu et par intégration des profils chromatographiques SEC/NT sont similaires. Ces résultats confirment que la totalité de NOD injectée dans la chaîne chromatographique a été analysée. Il ne semble donc pas y avoir de phénomène de discrimination significatif i.e. adsorption irréversible dans le gel. La distribution relative du NOD prend bien en compte la totalité de l'azote remis en solution. De plus, ces résultats permettent de mettre en évidence, une différence de distribution entre l'horizon profond et l'horizon de surface. Cependant, aucune différence significative n'apparaît entre les différents traitements.

Pour les extraits de MOD issus de l'horizon de surface, les chromatogrammes enregistrés à 254 nm montrent que les structures insaturées i.e. carbone aromatique sont prédominantes au niveau des composés de hautes masses moléculaires (pics 1 et 2 respectivement centrés sur 2500 et 1500 Daltons). Les chromatogrammes NOD présentent des

allures comparables à ceux de l'UV 254 nm avec toutefois une proportion très élevée de structures azotées de faibles masses moléculaires pour l'extrait TPH (pic 4 à 400 Daltons, 70 % du NOD). Les chromatogrammes obtenus pour les fractions de MOD isolées de l'horizon profond sont très différents. Les profils UV 254 nm sont décalés vers les plus faibles masses moléculaires comparativement à l'horizon de surface puisque le pic prédominant est le 3 centré sur 1000 Daltons. Le décalage est encore plus marqué pour la fraction TPH que pour la fraction HPO. Les structures azotées sont majoritairement incluses dans les structures de plus faibles masses moléculaires inférieures, pics 3 (1000 Daltons) et 4 (400 Daltons) dans l'ordre d'importance croissant

Les extraits de MOD d'horizon profond présentent globalement des proportions plus fortes en structures aromatiques et azotées de faibles masses moléculaires que celles obtenues au niveau de l'horizon de surface.

II-5. Spectroscopie infrarouge (IR)

Des analyses en spectroscopie infrarouge ont été réalisées sur tous les différents extraits HPO et TPH isolés. Les spectres obtenus pour les extraits HPO et TPH de l'horizon profond T1 (les spectres obtenus pour les autres extraits d'horizon profond sont rigoureusement identiques) et de l'horizon de surface 0-30 sont présentés figure 5.3. Le spectre IR d'un extrait HPI n'a pu être réalisé par manque d'extraits secs. Des priorités d'analyse ont du être faites avec une préférence pour la RMN ^{13}C .

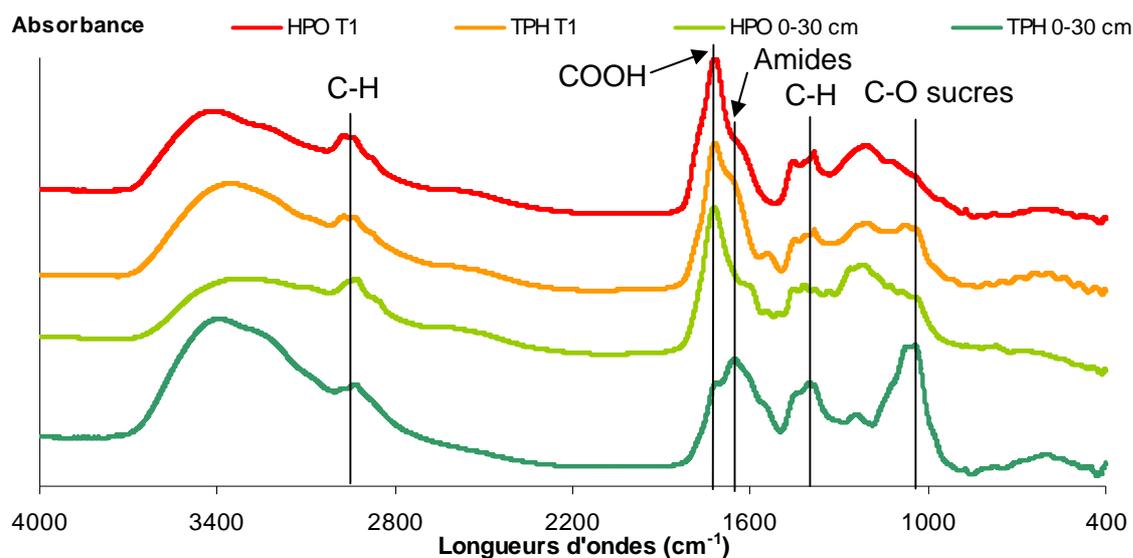


Figure 5.3 : Spectres IR des fractions HPO et TPH d'horizon profond et d'horizon de surface

L'utilisation de l'infra rouge pour l'analyse de matières organiques complexes doit rester, en ce qui nous concerne, une approche semi-qualitative. Sur le plan qualitatif, les différents profils présentent les mêmes bandes d'adsorption. Toutefois, leur abondance relative varie en fonction des extraits et de leur origine :

- Une bande très large relative au groupement O-H ($3300-3400\text{ cm}^{-1}$) pouvant provenir en grande partie d'eau liée,
- Les bandes caractéristiques des groupements C-H (CH_3 (2960 et 1380 cm^{-1}) et CH_2 (2940 et 1460 cm^{-1})) ; la bande relative au CH_3 est nettement plus marquée notamment à 1380 cm^{-1} pour les extraits issus de l'horizon profond,
- La bande caractéristique relative au groupement carboxylique ($1730-1720\text{ cm}^{-1}$; $1220-1180\text{ cm}^{-1}$), bande majoritaire pour tous les extraits à l'exception de la fraction TPH isolée de l'horizon de surface,
- Les bandes relatives à la fonction C-O ($1100-1000\text{ cm}^{-1}$), attribuées aux sucres, plus importantes dans les fractions TPH comparativement aux fractions HPO de même origine. Cette bande est extrêmement abondante pour la fraction TPH de l'horizon de surface.
- Les bandes qui correspondent aux groupements azotés (amide 1 : 1660 cm^{-1} ; amide 2 : 1550 cm^{-1}), proportionnellement plus abondantes dans les extraits TPH que HPO (en

accord avec le rapport C/N), remarque qui s'applique particulièrement à l'extrait TPH isolé de l'horizon de surface. Le rapport C/N montre toutefois une faible abondance d'azote dans cet extrait, comparativement aux fractions équivalentes isolées des MOD d'horizon profond (cf tableau 5.6) ce qui semble donc un peu contradictoire. La bande à 1660 cm^{-1} pourrait englober des groupements carboxyle non protonés, hypothèse qui nécessite la présence de groupements acides à faibles pka puisque l'échantillon est acidifié à $\text{pH} = 2$.

Les résultats obtenus en infrarouge sont en accord avec ceux de la littérature montrant l'abondance des groupements carboxyliques qui justifie la forte solubilité des matières organiques dans l'eau. On relèvera une proportion relative plus forte en sucres dans les fractions TPH, quelle que soit l'origine. On notera également des pics correspondants aux groupements CH_3 plus intenses dans les extraits de l'horizon profond. La singularité du profil de l'extrait TPH de surface en particulier pour les zones COO^- et amides, reste difficilement explicable au regard des autres résultats analytiques.

II-6. Résonance magnétique nucléaire ^{13}C (RMN- ^{13}C)

La figure 5.4 présente quelques exemples de spectres observés pour les extraits HPO, TPH et HPI isolés des MOD des horizons profonds et de l'horizon de surface. Les spectres HPO, TPH et HPI présentent quatre bandes principales plus ou moins bien résolues, attribuées au carbone carboxylique, au carbone aromatique, à la liaison C-O des alcools aliphatiques, des esters et des éthers et enfin aux liaisons C-C, C-N et C-H du carbone aliphatique.

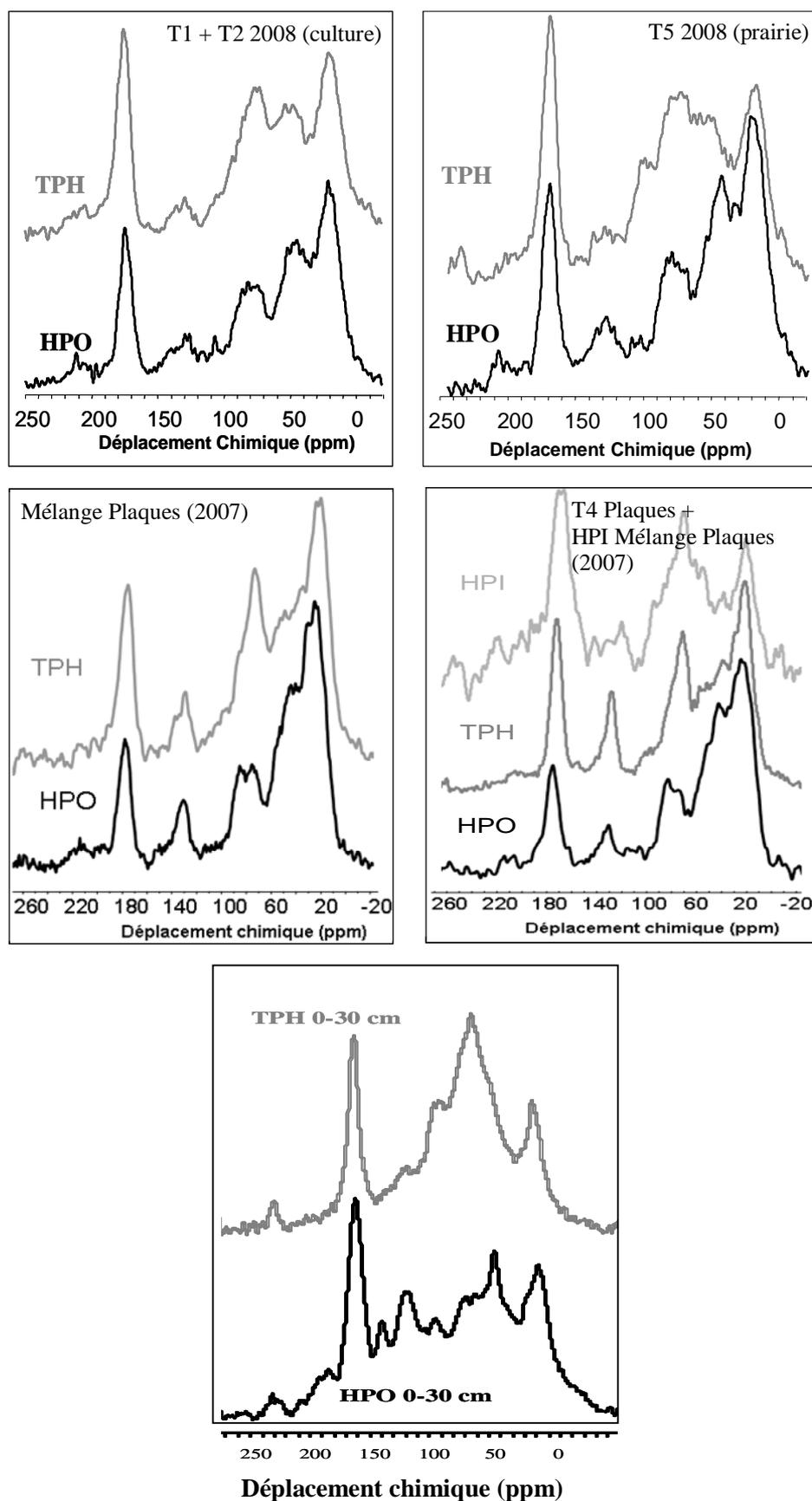


Figure 5.4 : Spectres RMN ¹³C des fractions d'un horizon profond et d'un horizon de surface

L'observation des différents spectres permet de mettre en évidence une différence majeure entre les échantillons de 2007 et de 2008. En effet, la bande caractéristique du carbone aromatique est mieux définie, mieux résolue ce qui lui confère visuellement une plus forte abondance dans les échantillons de 2007 par rapport à ceux de 2008. Cette différence provient également du fait que les spectres enregistrés en 2008 sont de bien moins bonne qualité que ceux obtenus en 2007, les spectres montrent un bruit beaucoup plus important. Le temps d'accumulation peut-être une raison, le réglage de l'équipement une autre raison, la qualité de nos extraits ne semble pas à l'origine de ce constat. Afin d'appréhender les résultats de manière semi-quantitative, le tableau 5.10 présente la distribution relative des six bandes spectrales identifiées, résultats obtenus par l'intégration de l'aire respective à chaque type de carbone identifié.

Tableau 5.10 : Distribution relative (%) des six bandes identifiées en RMN ¹³C

Ressources	Temps de contact (ms)	Fractions	Bande d'intégration (ppm) et valeurs (%)					
			0-60 C-C/C- H/CN	60-90 C-O	90-110 O-C-O	110-160 Caromatique	160-190 COOH	190-220 C=O
Année 2007								
Horizon profond	1	HPO	55	16	3	12	10	4
mélange bougies (COD = 1,5 mg/L ; SUVA =1,4)	1	TPH	48	22	3	10	12	4
Horizon profond T1 bougies (COD = 1,2 mg/L ; SUVA = 1,5)	1	HPO	49	16	6	14	11	4
Horizon profond T4 plaques (COD = 1,8 mg/L ; SUVA =1,6)	1	HPO	54	16	3	12	10	4
	1	TPH	45	20	4	12	14	3
Horizon profond mélange plaques (COD = 2,1 mg/L ; SUVA =1,6)	1	HPI	30	25	9	3	23	10
Année 2008								
Horizon profond T1+T2 plaques (COD = 1,3 mg/L ; SUVA = 1,3)	1	HPO	51	17	6	10	13	4
	1	TPH	36	23	11	10	16	4
Horizon profond T3 plaques (COD = 1,4 mg/L ; SUVA = 1,4)	1	HPO	46	19	8	10	12	5
	1	TPH	35	25	10	10	16	3
Horizon profond T5 plaques (COD = 1,4 mg/L ; SUVA = 1,3)	1	HPO	52	16	5	10	14	3
	1	TPH	37	23	10	10	17	3
	1	HPI	32	24	8	3	22	11
Horizon surface 0-30cm (COD = 1,9 mg/L ; SUVA = 3,2)	1	HPO	33	16	8	22	17	4
	1	TPH	29	29	13	13	14	2

Cette approche semi quantitative offre la possibilité de dégager les caractéristiques structurales des différentes fractions de la MOD des sols, mais aussi de comparer les changements possibles de ces caractéristiques au cours des années 2007 et 2008 (mode de collecte et mode d'occupation).

Les premières observations des résultats obtenus au cours des années 2007 et 2008 montrent des valeurs d'intégration relativement similaires entre les deux années dans les trois fractions étudiées. L'analyse semi-quantitative semble gommer les différences structurales observées visuellement. Les résultats obtenus entre les bougies et les plaques lysimétriques, montrent que la répartition des différentes bandes est quasiment similaire. A nouveau, le mode d'occupation ne semble pas avoir d'impact sur la distribution des différentes bandes.

Les profils enregistrés (de moins bonne qualité) pour les extraits de l'horizon de surface (0-30 cm) permettent les comparaisons suivantes :

- Les fractions HPO contiennent des proportions plus importantes en carbone aromatique (95-165 ppm) que les autres fractions. On peut également observer sur le spectre de la fraction HPO en particulier dans l'horizon de surface, deux petits pics qui encadrent la bande du carbone aromatique et qui sont attribués au carbone phénolique.
- Les fractions TPH et HPI possèdent un caractère oxygéné plus marqué que la fraction HPO, confirmé par les teneurs relatives plus élevées en carbone carboxylique (160-190 ppm) et en groupes fonctionnels C-O (60-90 ppm).
- Pour l'horizon profond, on remarque que la fraction HPO possède une proportion relative en groupement C-C/C-H (0-60 ppm) nettement plus importante que les fractions HPO de l'horizon de surface au détriment du carbone aromatique (110-160 ppm) beaucoup plus faible que dans les autres fractions HPO. Ces résultats sont en accord avec la présence plus marquée des bandes CH₃ et CH₂ en IR.
- Les fractions TPH et HPI de l'horizon profond possèdent des proportions relativement similaires aux autres fractions TPH et HPI présentées dans le tableau 5.10. Cependant il est à noter des proportions légèrement supérieures en groupement C=O (190-220 ppm) relatives aux esters et aux éthers dans les horizons profonds en particulier dans la fraction HPI.

La MOD des horizons profonds semble être constituée de composés faiblement aromatiques avec la présence de composés de structures plus simples confirmé par la proportion plus importante des groupements C-C/C-H (0-60 ppm) et avec un caractère oxygéné marqué notamment avec la proportion importante de groupements carboxylique (COOH) et esters/éthers (C=O). Cependant, il est à noter la présence d'une plus grande proportion de composés aromatiques dans les extraits de l'année 2007 dont l'origine n'est pas encore expliquée.

II-7. Datation au C^{14} et δC^{13}

Sur quelques extraits HPO et TPH, des analyses en ^{14}C et $\delta^{13}C$ ont été effectuées afin de dater le carbone de la MOD des horizons profonds par rapport à celui de l'horizon de surface. La mesure de la datation au ^{14}C est calculée à partir de l'âge conventionnel du ^{14}C établi par STUIVER et POLACH en 1977. Les différents résultats sont regroupés dans le tableau 5.11.

Tableau 5.11 : ^{14}C et $\delta^{13}C$ (‰) de quelques extraits HPO et TPH

Fractions	*Corrected pMC	Age conventionnel	$\delta^{13}C$ ‰
HPO 0-30 cm	131,86 ±0,34	>1954 BP**	-31,27 ±0,13
TPH 0-30 cm	131,92 ±0,40	>1954 BP	-24,39 ±0,09
HPO (105cm) (2007)	95,52 ±0,28	370 ± 25 BP	-29,36 ±0,18
TPH (105 cm) (2007)	91,29 ±0,33	730 ± 30 BP	-27,21 ±0,36
HPO (105 cm) (2008)	94,30 ±0,28	470 ± 25 BP	-27,84 ±0,13
TPH (105 cm) (2008)	92,46 ±0,30	630 ± 25 BP	-26,75 ±0,29

* per cent Modern Carbon ; ** Before Present

Les résultats obtenus par datation au ^{14}C montrent que les extraits de MOD issus des horizons profonds présentent un âge calculé compris entre 400-700 ans environ. L'extrait TPH apparaît comme significativement plus ancien que l'extrait HPO. Les résultats obtenus en 2008 sont confirmés par ceux de 2007. Malheureusement les résultats obtenus pour les

extraits isolés de l'horizon de surface sont ininterprétables. Le fait que le « Corrected pMC (percent Modern Carbon) » pour l'horizon de surface soit supérieur à 108-109 % (valeur attendue pour les matières organiques issues des végétaux supérieurs, production à partir du CO₂ de l'atmosphère) vient du fait d'une contamination volontaire du sol lors d'essais conduits il y a plusieurs années avec des molécules marquées au ¹⁴C. Malgré des résultats inattendus, on peut logiquement considérer que les MOD en profondeur sont d'âges plus anciens que les MOD de surface.

Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont cohérentes, montrant des extraits HPO plus appauvris en ¹³C en surface qu'en profondeur, suggérant un caractère humique plus marqué. La fraction TPH est plus enrichie en ¹³C (valeur absolue du $\delta^{13}\text{C}$ plus faible) que la fraction HPO en rapport avec le caractère moins aromatique de cet extrait. Toutefois, l'écart observé entre HPO et TPH de l'horizon de surface est très important (3 à 4 fois plus important que pour les extraits isolés en profondeur), résultat qui peut être mis en relation avec le fort écart de SUVA et la forte abondance relative d'azote organique de faibles masses moléculaires.

II-9. Pyrolyse GC-MS/Thermochemiolyse

II-9-1. Pyrolyse GC-MS

L'ensemble des extraits HPO et TPH a été analysé par pyrolyse GC-MS. Cette technique repose sur l'identification par spectrométrie de masse des structures organiques simples ou « fragments » volatils, générés lors de la dégradation thermique du matériel organique. Seule une partie des fragments présents sur les différents chromatogrammes est identifiable mais elle est considérée comme représentative de l'échantillon. En effet, les conditions d'analyse sont constantes et la dégradation pyrolytique des extraits de MOD est alors supposée identique pour l'ensemble des échantillons.

L'ensemble des fragments de pyrolyse identifiés est classiquement regroupé par origine ou nature de biopolymère tels qu'ils ont été définis par BRUCHET et al. (1990) ou PAGE et al. (2003). En effet, les principaux biopolymères constitutifs des MOD produisent des fragments de pyrolyse caractéristiques (BRUCHET et al. 1990 ; BIBER et al. 1996 ; CHRISTY et al. 1999). La contribution relative de chaque biopolymère au matériel organique est évaluée de manière semi-quantitative. Le calcul repose en effet sur le rapport entre l'aire totale des fragments caractéristiques du biopolymère considéré, et l'aire totale des pics

identifiés ou présents sur le chromatogramme. A partir des molécules identifiées, les chercheurs distinguent cinq classes principales de biopolymères :

- Les polysaccharides (PS), dont l'origine peut être aussi bien aquagénique (algues, bactéries) que pédogénique (plantes) car ils constituent l'élément majoritaire au sein des cellules vivantes (parois, noyau).
- Les protéines (PR) principalement issues de l'activité biologique du sol.
- Les amino-sucres (AS) considérés comme de bons marqueurs d'activité bactérienne.
- Les polyhydroxyaromatiques (PHA) formés lors de la dégradation thermique des tannins et de la lignine issus des plantes.
- Les alkyl-benzènes (AB) dont l'origine est mal définie, le plus souvent attribués à la dégradation thermique des lipides (cyclisation) ou aux structures aromatiques (SAIZ JIMENEZ, 1995 ; VAN HEEMST et al. 1999).

La figure 5.5 montre un exemple de pyrochromatogramme obtenu sur les extraits HPO isolés des MOD des horizons profond et de surface. Le tableau 5.12 regroupe les molécules retenues pour le calcul de distribution des biopolymères, avec leur temps de rétention et leur biopolymères d'origine, molécules qui ont été détectées dans tous les pyrochromatogrammes enregistrés.

Tableau 5.12 : Molécules identifiées dans les pyrochromatogrammes et biopolymères d'origine

Temps (min)	Molécules identifiées	Biopolymère d'origine	Temps (min)	Molécules identifiées	Biopolymère d'origine
3,43	2-Butanone	PS	16,00	Benzene, 1-ethyl-3,5-dimethyl-	AB
3,87	Bicyclo [2,2,2] octanone, 4-(acetyloxy)-	PS	16,19	2-cyclopenten-1-one, 2-methyl-	PS
4,18	3-Buten-2-one	PS	17,30	Benzene, 2-propenyl-	AB
4,66	2-Butanone, 3-methyl	PS	17,92	Benzene, 1,2,4,5-tetramethyl-	AB
5,02	2,3-Butanedione	PS	19,17	Furfural	PS
5,21	3-Buten-2-one	PS	19,82	2-cyclopenten-1-one, 3,4-dimethyl-	PS
5,31	Pyrrolidine, 1-nitroso	PR	19,97	Benzene, 1,2,3,4-tetramethyl-	AB
5,48	2-butanal, 2-ethenyl	PS	20,24	Ethanone	PS
5,66	Penten-3-one	PS	20,69	pyrrole	PR
5,98	1-penten-3-one, 4-methyl	PS	21,05	2-cyclopenten-1-one, 3-methyl-	PS
6,10	Toluene	PR	21,67	2-cyclopenten-1-one, 2,3-dimethyl-	PS
6,33	1H-Imidazole, 2-ethyl-4-methyl-	PS	21,85	Pyrrole, 3-methyl-	PR
6,82	3-methylpyridazine	PR	22,38	Pyrrole, 3-methyl-	PR
7,04	Pyridazine, 3-methyl-	PR	22,92	Pyrrole, 2,5-dimethyl-	PR
7,50	3,4,5-Trimethylpyrazole	PR	23,25	Pyrrole, 2,4-dimethyl-	PR
8,35	Ethylbenzene	AB	24,97	3-hexen-2-one, 3-methyl-	PS
8,56	Xylene	AB	27,69	Acetamide, N,N-dimethyl-	AS
8,77	Benzene, 1,3-dimethyl	AB	27,90	Acetamide	AS
9,32	Phenol-3-methyl-	PHA	29,80	2-cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-methyl	PS
10,11	Benzene, 1,2-dimethyl	AB	34,26	Phenol, 2-methyl-	PHA
11,36	Benzene, 1-ethyl-4-methyl	AB	34,36	Phenol	PHA
12,00	Benzene, 1,3,5-trimethyl	AB	36,22	Phenol, 4-methyl-	PHA
13,23	Benzene, 1,2,4-trimethyl	AB	36,44	Phenol, 3-methyl-	PHA
13,70	Pyridine, 4-methyl	PR	38,45	Phenol, 3,5-dimethyl-	PHA
13,91	2-Propanone, 1-hydroxy-	PS	41,04	Phenol, m-tert-butyl-	PHA
15,05	Benzene, 1,2,4-trimethyl	AB	44,16	3,4-diethylphenol	PHA
15,52	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	AB			
15,75	Benzene, 1,2,4,5-tetramethyl-	AB			

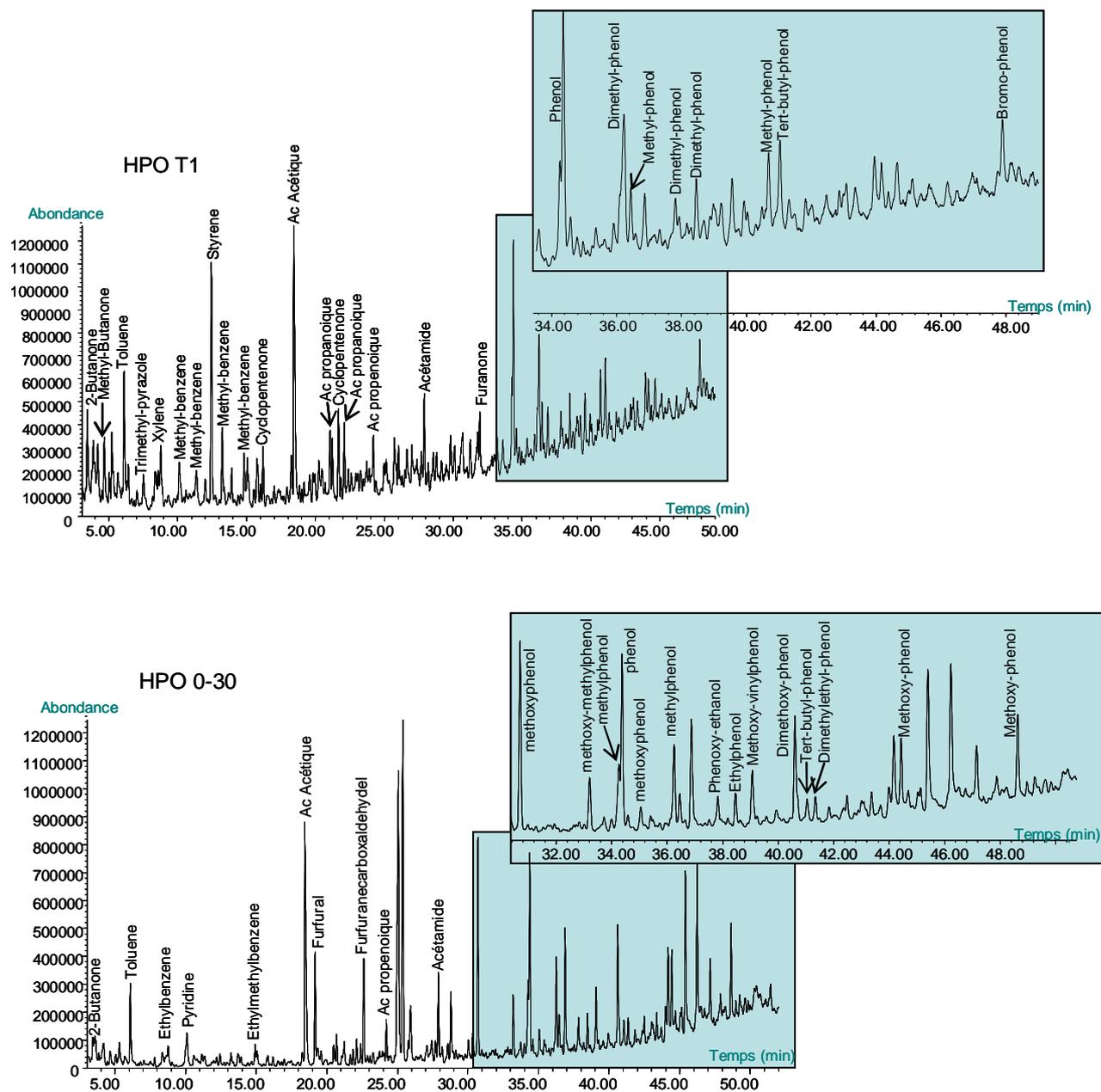


Figure 5.5 : Exemple de chromatogramme obtenu en pyrolyse sur un extrait HPO du traitement T1 et HPO de surface

Les spectres de pyrolyse GC/MS des deux extraits HPO sont qualitativement assez différents. Si l'acide acétique reste l'un des constituants majeurs des deux pyrochromatogrammes (sans origine définie), on remarque une présence marquée de dérivés furfuryliques (origine : sucres) dans HPO 0-30, le styrène est prédominant dans HPO T1

(origine : polyhydroxyaromatiques ou protéines). Les deux extraits montrent la présence de résidus microbiens (acétamide). Les pics importants observés au voisinage des 25 min pour l'extrait HPO 0-30 correspondraient à des molécules appartenant à la famille des glycols ; il s'agit soit des impuretés analytiques, peu probable, soit des contaminants présents dans l'échantillon de sol. Les différences se portent également sur les dérivés phénoliques, en nombre plus important dans l'extrait issu de la surface avec surtout des dérivés phénoliques porteurs de groupement méthoxy non visibles dans l'extrait isolé en profondeur. Ces dérivés méthoxy-phénols sont probablement issus de la pyrolyse des structures de type lignines présentes dans la matrice organique des sols. Les extraits TPH correspondants montrent des profils assez proches (non montrés), profils marqués par deux pics majoritaires, l'acide acétique et l'acétamide. L'extrait TPH de surface montre toutefois des pics plus intenses de furfural et methyl-furfural en accord avec l'extrait HPO correspondant et surtout des indicateurs d'activité biologique comme le triethyl-phosphate (phospholipides) et l'acide benzoïques.

Nous avons choisi d'établir que l'ensemble des molécules identifiées représentait 100% des molécules présentes dans les extraits afin de déterminer la distribution relative des différentes biopolymères. L'ensemble de tous les résultats obtenus sur les échantillons sont regroupés dans le tableau 5.13

Tableau 5.13 : Distribution relative (%) des différents biopolymères dans les extraits HPO et TPH (2007 et 2008) (PS : polysaccharides ; PHA : polyhydroxyaromatiques ; PR : Protéines ; AS : Aminosucre ; AB : Alkylbenzenes)

Echantillons	Distribution relative (%)				
	PS	PHA	PR	AS	AB
2007					
HPO T4	30	26	21	9	14
TPH T4	33	17	29	14	7
HPO T5	30	27	14	6	23
TPH T5	28	19	35	7	11
2008					
HPO T1	22	12	17	35	14
TPH T1	24	10	33	21	12
HPO T2	32	22	22	7	17
TPH T2	31	12	32	16	9
HPO T3	37	17	19	9	18
TPH T3	33	10	30	22	5
HPO T4	41	20	14	6	19
TPH T4	34	12	26	20	8
HPO T5	33	22	16	8	21
TPH T5	31	15	41	9	4
HPO 0-30	34	43	15	4	4
TPH 0-30	43	6	20	25	6

La comparaison de la distribution des biopolymères montre des différences notables entre l'horizon profond et l'horizon de surface. Ainsi, les fractions HPO des horizons profonds possèdent proportionnellement moins de composés PHA que la fraction HPO de surface mais plus de structures AB et des proportions relatives en PR similaires. En ce qui concerne la fraction TPH des horizons profonds, celle-ci possède moins de structures PS que l'extrait de surface mais plus de structures PHA et de PR.

Si l'on compare les fractions HPO et TPH, on remarque une proportion plus importante de PHA dans les fractions HPO, résultats en accord avec l'aromaticité (SUVA HPO > SUVA TPH). On note également une plus grande proportion en protéines dans la fraction TPH par rapport à la fraction HPO montrant une plus grande proportion de composés azotés dans cette fraction, résultat allant dans le bon sens avec le rapport C/N déterminé précédemment (C/N TPH < C/N HPO). Enfin, les proportions en AB sont systématiquement

plus importantes dans la fraction HPO par rapport à la fraction TPH alors que l'inverse est observé pour les AS et les PS.

La répartition des biopolymères confirme l'observation des spectres à savoir qu'il y a moins de composés PHA (dérivé de lignines et de tanins) dans les horizons profonds. La MOD des horizons profonds posséderait également des proportions plus importantes en AS, notamment d'acétamide constituants de la paroi microbienne et en AB issus de la cyclisation des acides gras (SAIZ JIMENEZ, 1995).

II-9-2. Thermochemiolyse TMAH

Des analyses en thermochemiolyse TMAH (TétraMéthyl Hydroxide Ammonium) GC/MS ont été réalisées sur les extraits HPO et TPH isolés de l'horizon profond et de l'horizon de surface. L'interprétation des résultats obtenus sera purement qualitative. Nous nous sommes ainsi focalisés sur la présence des composés aromatiques et des acides gras en regardant les chromatogrammes de l'ion 77 (composés aromatiques) et celui de l'ion 74 (acides gras). Pour étudier les composés aromatiques, nous nous sommes centrés sur les structures pouvant provenir des unités syringyles, guaiacyles et p-hydroxyphenyles des lignines car ce sont des unités généralement retrouvées dans la matrice organique des sols même si certaines de ces unités peuvent provenir de la thermochemiolyse des sucres et des protéines. Les profils chromatographiques obtenus pour les extraits issus des différentes parcelles étant qualitativement comparables, seules les empreintes enregistrées pour les fractions qui proviennent de la parcelle associée au traitement T1 (plaques lysimétriques) sont présentées dans les figures 5.6a et 5.6b. La figure 5.7 montre les résultats obtenus avec les extraits de l'horizon 0-30 cm. Les différents pics identifiés pour l'ion $m/z = 77$ dans l'horizon profond et dans l'horizon de surface ont été regroupés dans le tableau 5.14

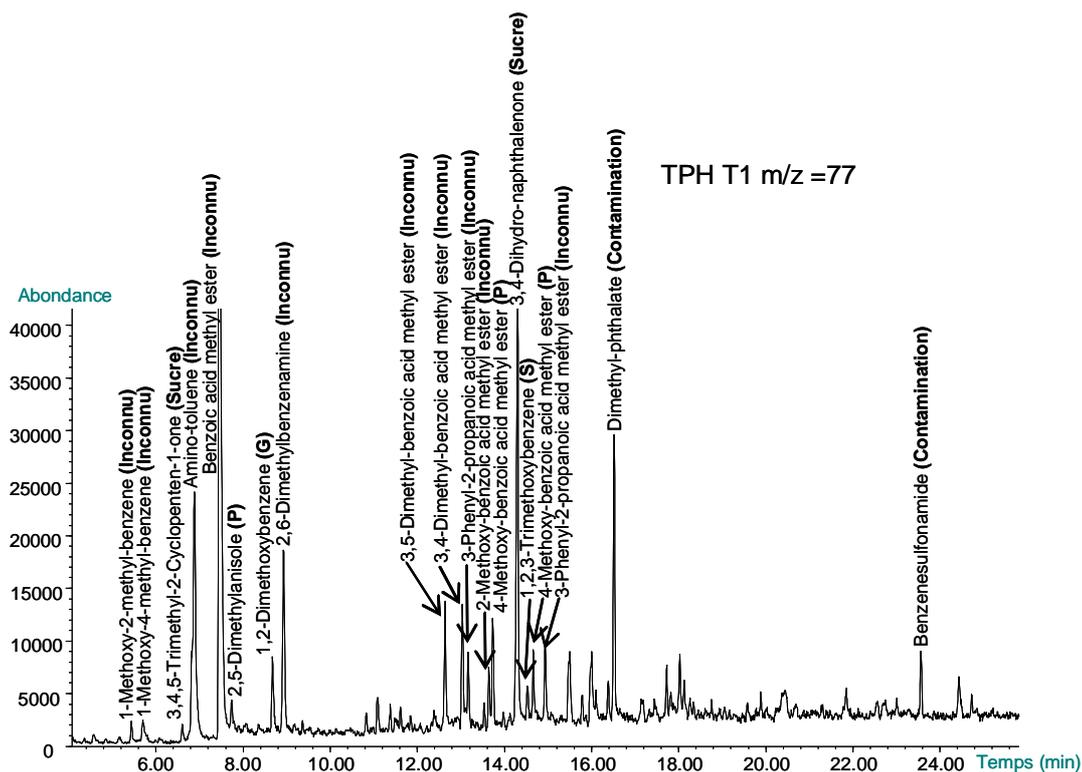
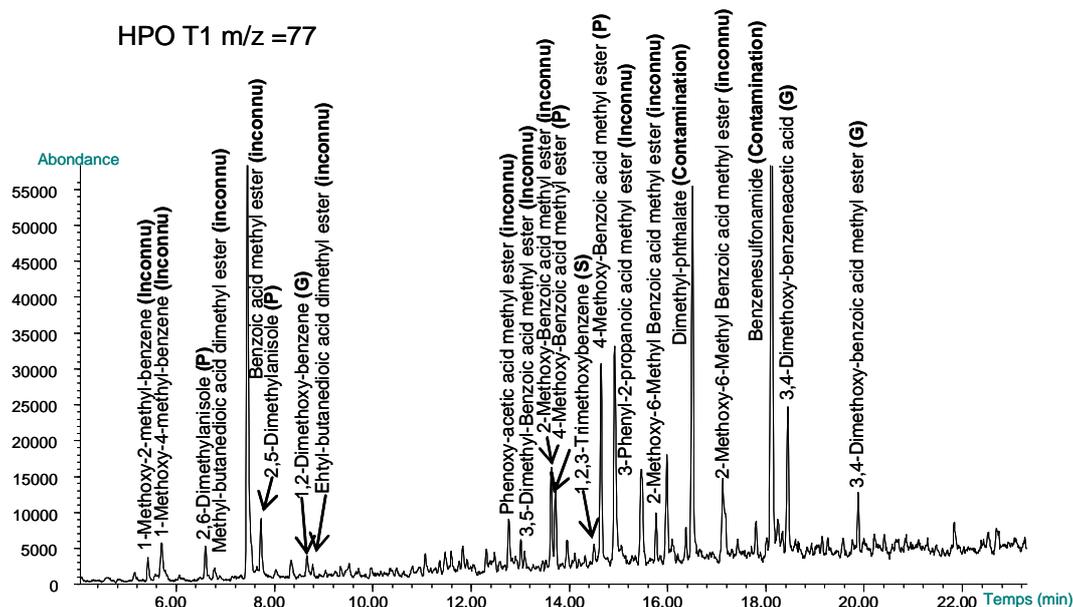


Figure 5.6a : Pyrolyse TMAH des extraits HPO et TPH de l'horizon profond et de surface (m/z =77 ; composés aromatiques)

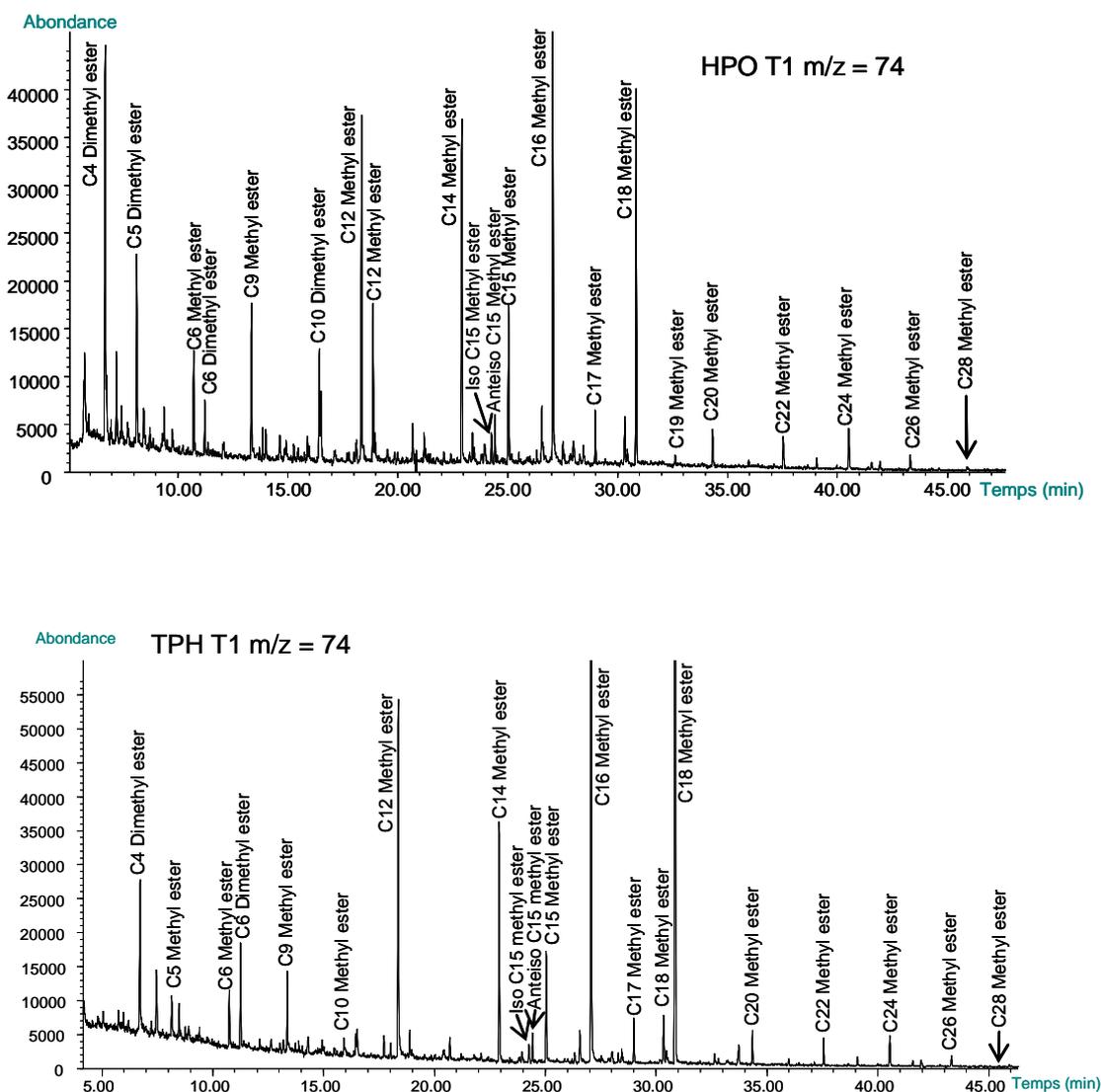
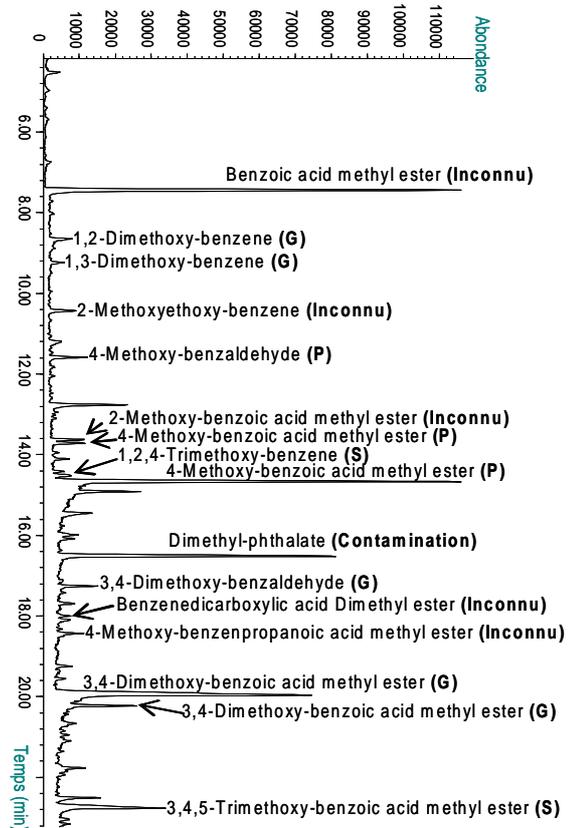
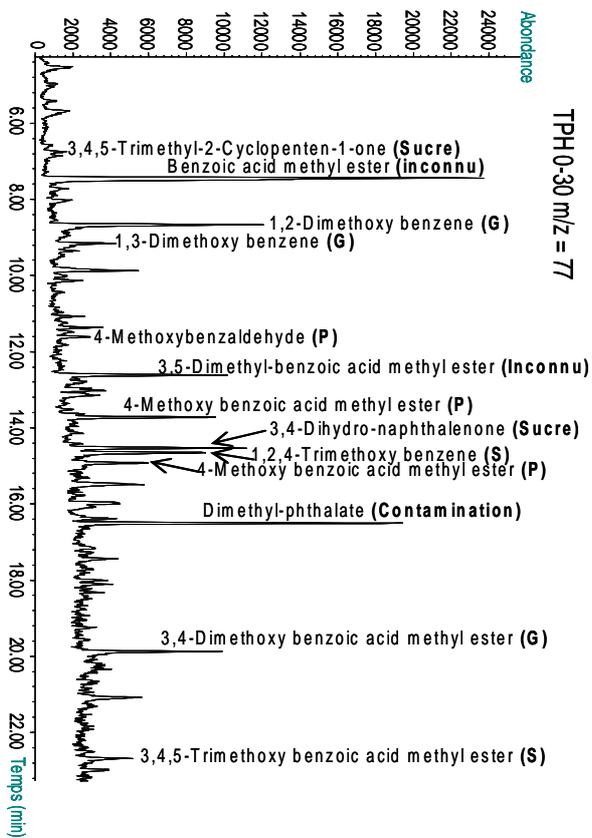


Figure 5.6b : Pyrolyse TMAH des extraits HPO et TPH de l'horizon profond et de surface (m/z =77 ; composés aromatiques)



HPO 0-30 m/z = 77

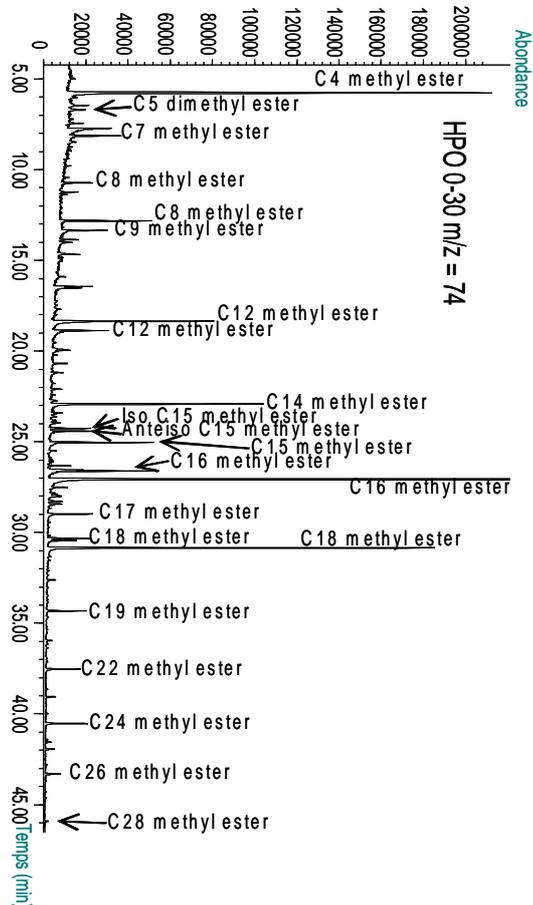
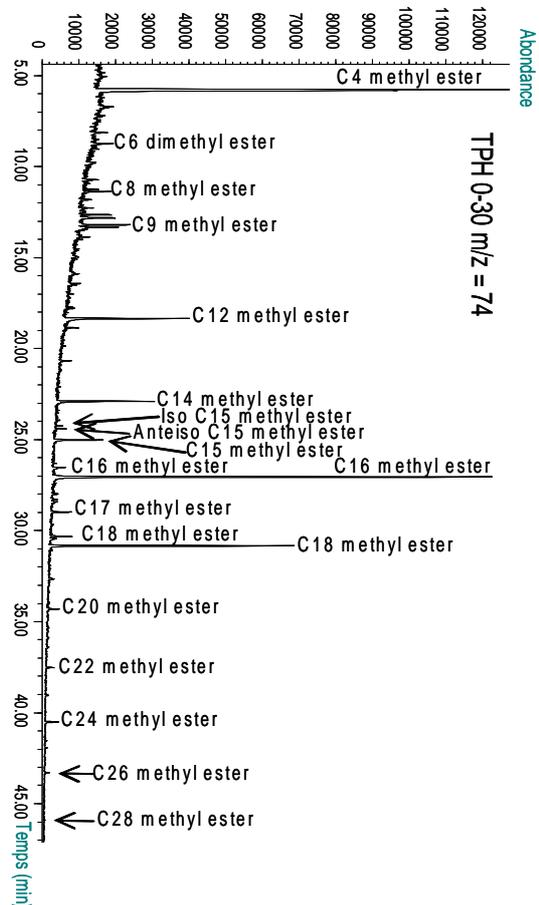


Figure 5.7 : Pyrolyse TMAH des extraits HPO et TPH de surface ($m/z = 77$; composés aromatiques et $m/z = 74$; acides gras)

Tableau 5.14 : Composés identifiés et origine dans les fractions HPO et TPH de l'horizon profond et de l'horizon de surface ($m/z = 77$) (P : p-hydroxyphenyles ; G : Guaiacyles ; S : Syringyles ; I : Inconnu)

Composés identifiés	origine	HPO horizon profond	HPO horizon de surface	TPH horizon profond	TPH horizon de surface
		Composés aromatiques ($m/z = 77$)			
1-methoxy-2-methyl-benzene	I	X		X	
1-methoxy-2-methyl-benzene	I	X		X	
2,6-Dimethylanisole	P	X			
Methyl-butanedioic acid dimethyl ester	I	X			
Benzoic acid methyl ester	I	X	X	X	X
2,5-Dimethylanisole	P	X		X	
1,2-Dimethoxybenzene	G	X	X	X	X
Ethyl-butanedioic acid methyl ester	I	X			
3,5-Dimethyl-benzoic acid methyl ester	I	X		X	X
Phenoxy-acetic acid methyl ester	I	X			
2-Methoxy-benzoic acid methyl ester	I	X	X	X	
4-Methoxy-benzoic acid methyl ester	P	X	X	X	X
1,2,3-Trimethoxybenzene	S	X	X	X	X
3-phenyl-2propanoic acid methyl ester	I	X		X	
2-Methoxy-6-methyl benzoic acid methyl ester	I	X			
Dimethyl-phthalate	Contamination	X	X	X	X
Benzenesulfonamide	Contamination	X	X	X	
3,4-Dimethoxybenzeneacetic acid	G	X			
3,4-Dimethoxy benzoic acid methyl ester	G	X	X	X	X
1,3-Dimethoxybenzene	G		X		X
2-Methoxy ethoxy benzene	I		X		
4-Methoxy benzaldehyde	P		X		X
3,4-Dimethoxy-benzaldehyde	G		X		
Benzene dicarboxylic acid methyl ester	I		X		
4-Methoxy-benzene propanoic acid methyl ester	I		X		
3,4,5-Trimethoxy-benzoic acid methyl ester	S		X		X
3,4,5-Trimethyl-2-cyclopenten-1-one	Sucre			X	X
Aminotoluene	I			X	
2,6-Dimethyl-benzenamine	I			X	
3,4-Dihydro-naphthalenone	Sucre			X	X

Le tableau 5.14 permet de montrer que 50 % des pics répertoriés pour l'ion $m/z = 77$ dans l'horizon profond et dans l'horizon de surface sont d'origine inconnue. Ces composés non identifiés varient généralement avec l'origine de la matière organique (FRAZIER et al. 2003). Dans tous les chromatogrammes étudiés on remarquera également la présence du Dimethyl-phthalate et Benzenesulfonamide attribué à des contaminations extérieures pouvant provenir du mode de stockage (flacons) ou des solvants utilisés pour l'extraction. Les pics les plus abondants identifiés dans les fractions HPO et TPH de l'horizon de surface se retrouvent respectivement dans les fractions HPO et TPH de l'horizon profond. On retrouve notamment le 4-méthoxy benzoïque acide méthyle ester en quantité importante dans tous les chromatogrammes HPO et TPH. Ces groupements méthoxy-méthyle ester proviennent d'unités p-hydroxyphenyles (P), guaiacyles (G) et syringyles (S) (CLIFFORD et al. 1995). Ces unités sont connues pour provenir des dérivés ligneux mais aussi des sucres (Hydrate de carbone) ou des dérivés de protéines (FRAZIER et al. 2003). Cependant, certains composés identifiés (P, G et S) ou non identifiés (I) sont uniques aux extraits de surface ou de profondeur mais ne permettent pas de différencier radicalement la MO organique de ces deux horizons. La comparaison des fractions HPO et TPH montrent une différence notable. En effet, les pyrochromatogrammes des fractions TPH semblent montrer la présence de dérivés de sucres (3,4,5-Triméthyl-2-cyclopenten-1-one et 3,4-Dihydro-naphthalenone) non identifiés dans les fractions HPO. Au contraire, les fractions HPO semblent être constituées d'une proportion plus importante d'unités P, G et S.

Les pyrochromatogrammes de l'ion 74 (acides gras) ne permettent pas de mettre en évidence de différence notable entre les fractions HPO et TPH de l'horizon de surface et de l'horizon profond. Les profils chromatographiques montrent la présence de chaîne allant de C4 à C28 dans tous les pyrochromatogrammes. Aucune différence n'est visible entre l'horizon profond et l'horizon de surface. Dans la littérature, la prédominance des faibles masses moléculaires saturées et des acides gras insaturés (C16 et C18) est généralement attribuée à des structures microbiennes, alors que les acides gras avec des masses moléculaires supérieures sont attribués aux plantes (C26, C28) (CLIFFORD et al. 1994). Enfin, on remarque dans tous les profils chromatographiques des structures C15 iso et anteiso couramment identifiées dans l'étude de la matière organique d'eau surface (FRAZIER et al. 2003).

L'analyse en pyrolyse TMAH ($m/z = 77$; composés aromatiques et $m/z = 74$; acides gras) ne permet pas de mettre en évidence des différences significatives entre l'horizon profond et l'horizon de surface malgré la présence de composés différents identifiés en surface ou en profondeur. Les unités P, S et G sont présentes dans tous les extraits HPO et TPH de l'horizon de surface et de l'horizon profond. Cependant, on remarque la présence de dérivés de sucres dans les fractions TPH non identifiées dans les fractions HPO, résultats en accord avec les résultats RMN ^{13}C et IR montrant une abondance plus importante de structures issues des sucres dans les fractions TPH.

II-10. Pyrolyse MSSV (Micro Scale Sealed Vessel)

Les analyses effectuées en pyrolyse MSSV ont été effectuées en Australie à l'Université de Curtin (Curtin Water Quality Research Center) à Perth. Deux échantillons ont été analysés, un échantillon HPO de la Gartempe et un échantillon HPO d'un horizon profond. Les chromatogrammes d'ions totaux obtenus en pyrolyse MSSV sont présentés figure 5.8. Les deux extraits ont conduit à l'obtention de profils distincts bien que de nombreuses similitudes qualitatives aient été observées, y compris des concentrations élevées en produits de pyrolyse aromatiques.

Les principaux produits de la fraction HPO de la Gartempe sont des alkyl-phénols $\text{C}_1\text{-C}_3$ (APs), des alkyl-benzènes $\text{C}_1\text{-C}_3$ et des alkyl-furanes. Ces produits aromatiques sont les plus susceptibles d'être dérivés de précurseurs de type ligno-cellulosique, des résultats qui appuient la signature des lignines déduites par thermochemiolyse GC/MS.

Les alkyl-phénols ont également été produits par la pyrolyse de la fraction HPO d'un horizon profond. Toutefois, alors que la fraction HPO de la Gartempe est dominée par le phénol et le phénol monosubstitué, avec des concentrations décroissantes en phénol $\text{C}_2\text{-C}_4$, la fraction HPO de l'horizon profond est caractérisée par des proportions beaucoup plus élevées en isomères alkylés $\text{C}_3\text{-C}_5$. Cette substitution phénolique distincte observée en pyrolyse MSSV de la MOD des horizons profonds des sols, reflète une origine différente à partir de précurseurs non-humiques/non-ligneux tels que pourraient l'être les tannins et les terpénoïdes.

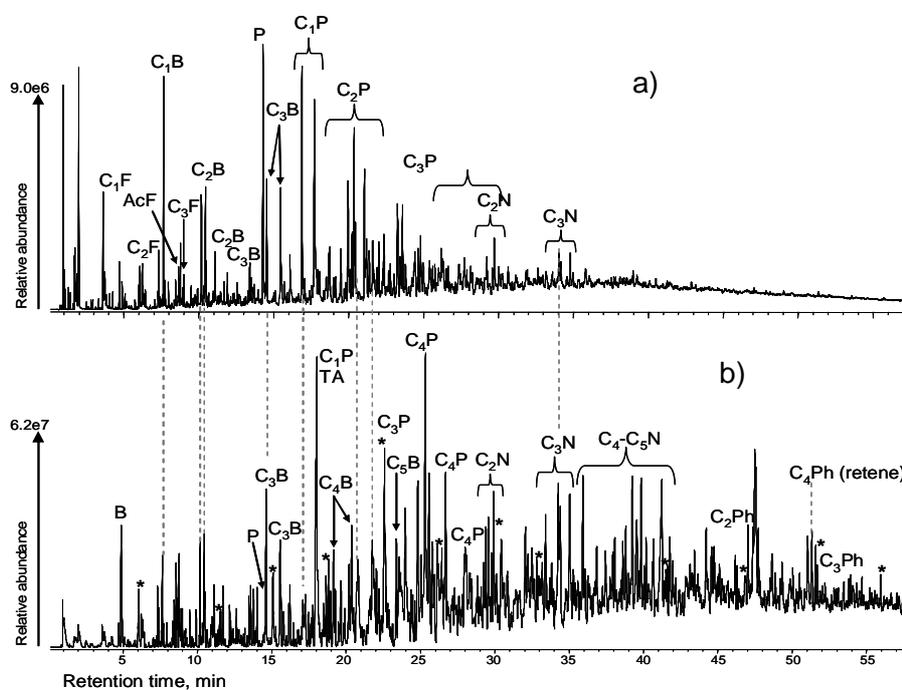


Figure 5.8: Chromatogramme global obtenu à 300°C pendant 72h en pyrolyse MSSV a) d'un extrait HPO de la Gartempe et b) d'un extrait HPO d'un horizon profond. B-benzènes, F-furanes, P-phenols, N-naphthalenes, Ph-phenanthrenes, TA-thioanisole, * n-alkanes.

III. Discussion

La partie présentation des résultats s'est appuyée sur une large diversité d'outils analytiques, outils qui sont classiquement utilisés pour la caractérisation des matières organiques naturelles extraites de milieux aquatiques divers. Toutefois, à notre connaissance, il n'existe pas de données structurales concernant des fractions de MOD isolées d'eaux collectées par des systèmes types plaques lysimétriques ou bougies poreuses. Nous n'avons pas trouvé non plus de données relatives à la caractérisation de MOD d'eaux souterraines. Nos données de référence se limitent donc aux eaux de surface qui ont fait l'objet de très nombreuses études. Des eaux d'origine et de caractéristiques différentes ont été étudiées. Dans ce domaine le LCME a participé à quelques projets internationaux (projets American Water Works Association Research Fondation) et nationaux qui ont permis d'accumuler une quantité de résultats importante sur des matrices organiques diverses. Notre discussion va s'appuyer en grande partie sur ces données.

Lorsque l'on s'intéresse aux matières organiques des sols, la notion de matières humiques en est presque indissociable. Les travaux relatifs aux substances humiques font alors souvent appel à l'étude des structures aromatiques dont on trouve l'origine notamment dans les lignines et tannins. L'identification et la quantification des unités monomériques constitutives des lignines (unités para-hydroxyphenyles, syringyles et guaiacyles) font partie des travaux souvent développés dans l'étude des substances humiques des sols.

Le caractère aromatique des matières organiques dissoutes des eaux naturelles est également un paramètre de référence dans l'étude structurale de ces matrices complexes. Le caractère aromatique des MOD est un paramètre auquel on aime corréler taille moléculaire, caractère hydrophobe/hydrophile mais aussi réactivité (sorption, oxydation,...). Le critère SUVA est un paramètre couramment utilisé pour décrire le caractère aromatique ou humique des MOD des eaux. C'est souvent à l'appui de ce critère structural que les scientifiques comparent différentes eaux ou différents extraits (après remise en solution) issus d'un même milieu ou de différentes ressources. Le caractère aromatique des MOD des eaux de surface est associé à une origine terrestre, origine allochtone. On considère que les MOD des eaux de

surface proviennent d'ailleurs majoritairement des sols, fraction soluble des MOS entraînée par lessivage ou infiltration des eaux de pluie (THURMAN, 1985).

Le caractère aromatique des MOD peut donc être considéré comme un paramètre de référence. C'est ce paramètre que nous avons choisi d'utiliser comme initiateur et fils directeur de notre discussion.

L'objectif de cette discussion est de mettre en avant les différences structurales qui existent entre les MO solubles isolées de l'horizon profond du sol étudié de celles isolées à partir de l'horizon de surface. Compte tenu du manque de données bibliographiques relatives à l'étude structurale des MO solubles des sols, nous nous attacherons également à comparer nos données à celles relevées sur des extraits issus d'eaux de surface.

Avant d'aborder notre discussion sur des aspects purement structuraux nous avons choisi de conduire une étude statistique à partir de nos données analytiques. Cette étude modeste à eu pour but :

- De valider l'intérêt de notre protocole de fractionnement et discriminer les différents extraits les uns par rapport aux autres,
- De valider sur un plan statistique les différences structurales évidentes relevées entre les MO solubles de surface et celles des horizons profonds
- Et enfin de confirmer que les différentes pratiques culturales mises en place pendant cette courte période d'étude n'ont pas eu d'impacts significatifs sur la nature des MO isolées en profondeur comme l'ont suggéré les données analytiques présentées.

III-1. Comparaison globale des extraits et de leur origine par une approche multi variable : ACP

L'analyse par composante principale (ACP) est un outil statistique intéressant permettant de corréler ou d'anti-corréler les paramètres étudiés. Elle est utilisée dans ce manuscrit afin de discriminer les échantillons au regard de leur origine. L'ACP mis au point par Karl Pearson en 1901 permet de transformer des variables liées entre elles (dites "corrélées") en nouvelles variables indépendantes les unes des autres (donc "non corrélées"). L'ACP est une méthode dite « factorielle » qui permet la réduction du nombre de variables initiales par un nombre plus limité de variables appelées « composantes principales ». Cette

réduction du nombre de variables consiste à éliminer les variables les moins explicatives ou apportant une information redondante. Les résultats obtenus (logiciel XLSTAT09) sur les différents extraits de l'horizon profond et de l'horizon de surface sont présentés dans les figures 5.9, 5.10 et 5.11. Notons que les données obtenues précédemment au laboratoire sur un extrait HPO d'eau de surface (rivière Gartempe) ont été ajoutées aux résultats de notre étude.

III-1-1. Corrélation entre les différents paramètres

La figure 5.9 permet de présenter les différentes corrélations pouvant exister entre les paramètres étudiés en pyrolyse, en chromatographie d'exclusion de taille et en RMN ^{13}C .

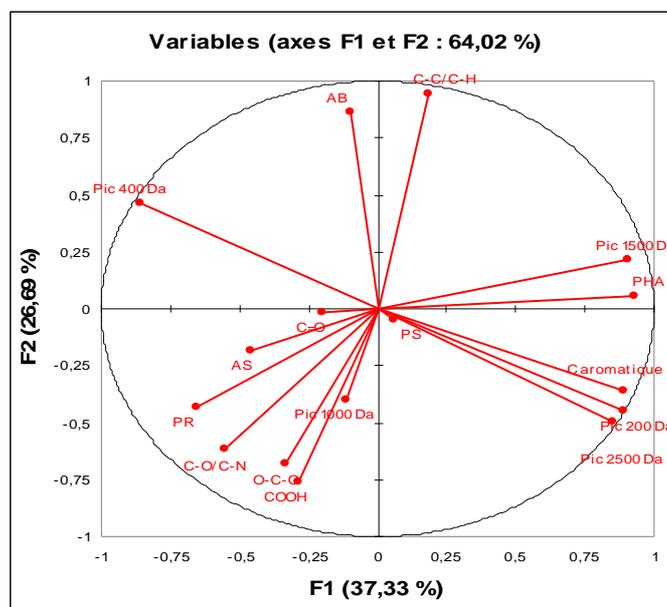


Figure 5.9 : Corrélation entre les différents paramètres étudiés

Les résultats obtenus montrent dans un premier temps, que les fractions HPO (Gartempe), HPO 0-30 sont les plus discriminées par les variables C aromatique, le pic à 2500 Da et le pic à 200 Da. Les fractions les plus hydrophobes (eaux de surface, horizon de surface) sont caractérisées par le carbone aromatique et les composés de haut poids moléculaire. Ces résultats montrent également que les fractions TPH des plaques lysimétriques (PL) (tous les traitements) et l'extrait HPI (cercle bleu figure 5.10) sont discriminées par les variables COOH, O-C-O, C-O/C-N, Pr (Protéines) et AS (Aminosucre). Les fractions plus hydrophiles (TPH et HPI) sont caractérisées par l'azote et les fonctions

oxygénées. Enfin, les fractions HPO des PL (cercle vert figure 5.10) sont discriminées par les variables AB (alkyl-benzènes) et C-C/C-H. La fraction HPO de l'horizon profond serait caractérisée par des composés aliphatiques.

III-1-2. Corrélation entre les fractions

Les figures 5.10 et 5.11 permettent de montrer si les extraits étudiés peuvent être discriminés entre eux, notamment si l'on arrive à voir des différences entre les fractions HPO et TPH issues de l'horizon profond et de l'horizon de surface.

a) Pyrolyse, chromatographie d'exclusion de taille et RMN ¹³C

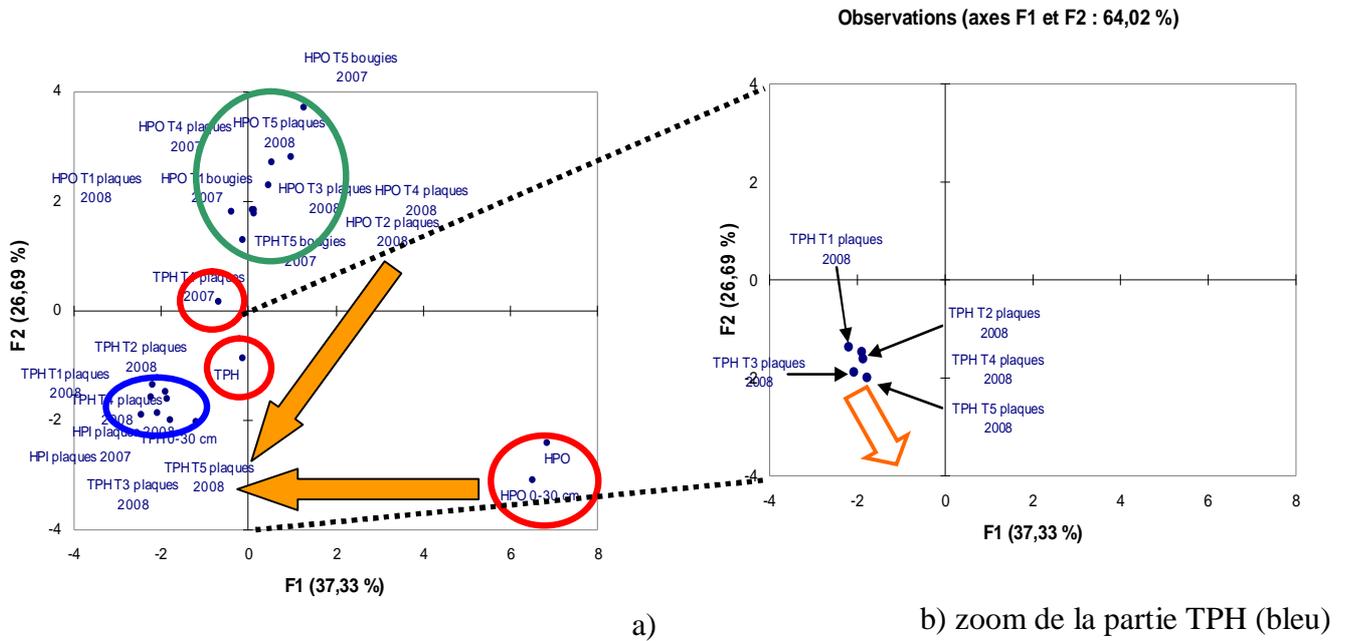


Figure 5.10 : Discrimination des échantillons étudiés en fonction de composantes principales (Pyrolyse, chromatographie d'exclusion de taille et RMN ¹³C)

Les résultats de la figure 5.10 semblent montrer que l'on distingue 3 grands groupes. Les extraits HPO (Gartempe) et HPO 0-30 se distinguent des autres extraits HPO et TPH des PL et des BP. Il est à noter également que les extraits HPO des PL et des BP sont significativement différents des extraits TPH des PL et des BP. Les extraits HPO et TPH des PL et des BP semblent se rapprocher des extraits TPH (Gartempe) et TPH 0-30 cm de l'horizon de surface donc avoir une nature plus hydrophile qu'en surface. Ces résultats ont

également permis de montrer que les échantillons des PL et des BP ne sont pas significativement différents, ils présentent de fortes similitudes. La même conclusion a été observée entre les échantillons de 2007 et de 2008.

La figure 5.10a) permet également de mettre en avant un résultat intéressant. Tous les échantillons semblent évoluer, converger dans la même direction (flèches jaunes- figure 5.10a). En effet, même si les échantillons HPO de l'horizon profond et de l'horizon de surface ont une origine différente, ils semblent converger vers le même point. Plus les extraits seraient hydrophiles plus ils auraient des caractéristiques similaires. Les fractions HPO (les plus hydrophobes) auraient donc une plus grande variabilité que les fractions TPH, elles mêmes plus variables que les fractions HPI (les plus hydrophiles). Cette tendance serait à confirmer avec l'ajout d'autres échantillons, notamment de la fraction HPI.

b) Pyrolyse et RMN ¹³C

En réduisant le nombre de variables, en enlevant notamment les résultats obtenus en chromatographie d'exclusion de taille et en se focalisant sur des paramètres structuraux (pyrolyse et RMN ¹³C), il a été possible de montrer une tendance entre les extraits HPO et TPH des différents traitements (T1 à T5). Les résultats sont présentés dans la figure 5.11.

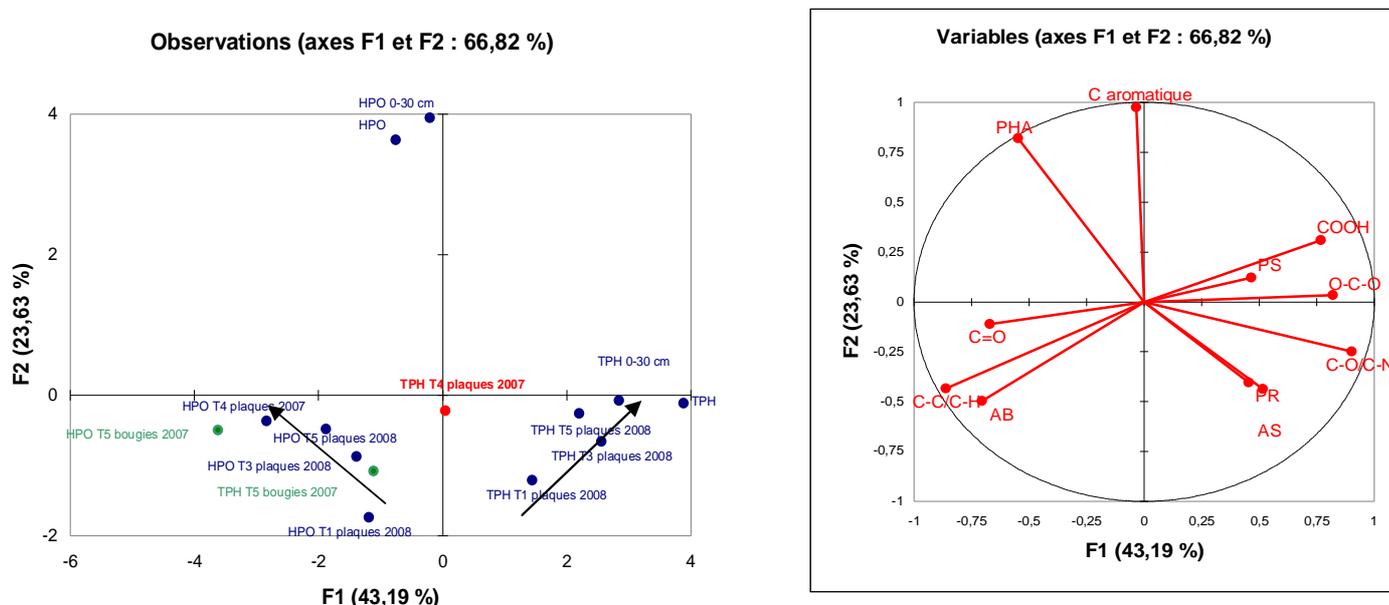


Figure 5.11 : Discrimination des échantillons étudiés en fonction de composantes principales (Pyrolyse et RMN ¹³C)

Les résultats semblent montrer une évolution allant de T1 à T5 pour les extraits HPO et TPH de l'horizon profond (figures 5.11 et 5.10b). Les extraits HPO montrent une évolution de T1 à T5 en fonction du carbone aliphatique et des alkyl-benzènes alors que les extraits TPH montrent une évolution de T1 à T5 en fonction de l'azote. Pour les extraits TPH, un point particulier est à remarquer, il s'agit de l'extrait TPH du traitement T4. Cet extrait ne semble pas suivre l'évolution observée en fonction des composés azotés. Ce résultat paraît logique puisque le traitement T4 ne subit pas d'amendement azoté régulier.

Même si des différences sont visibles (les points ne sont pas superposés), ces différences sont très faibles et ne permettent pas de différencier radicalement les traitements. Cependant, le système mis en place il y a quelques années (dispositif assez récent) semble commencer à évoluer.

Les faibles différences observées entre les traitements mais aussi entre les années (2007 et 2008) nous conduisent à regrouper les résultats obtenus afin de déterminer des moyennes, ceci dans le but de faciliter par la suite la discussion des résultats. Le tableau 5.15 montre la moyenne des résultats obtenus pour les échantillons de 2007 et 2008.

Tableau 5.15 : Moyenne des résultats obtenus pour les extraits de 2007 et 2008

Echantillons	HPO 2007	TPH 2007	HPI 2007	HPO 2008	TPH 2008	HPI 2008	HPO 0-30	TPH 0-30
Distribution sur résines XAD	45	19	36	46	18	36	60	22
Paramètres								
SUVA	1,3	1,2	0,8	1,3	1,2	0,7	2,4	1,5
C/N	13,9	4,7	3,9	13,5	4,8	4,4	15,1	11,2
RMN ¹³ C (distribution relative moyenne %)								
C-C/C-H	53	47	28	50	36	30	33	29
C-O/C-N	16	21	20	17	24	22	16	29
O-C-O	4	4	7	6	10	7	8	13
C aromatique	13	11	10	10	10	10	22	13
COOH	10	13	20	13	17	22	17	14
C=O	4	4	8	4	3	9	4	2
Pyrolyse GC-MS (Distribution relative moyenne %)								
PS	30	31	-	33	31	-	34	43
PHA	27	18	-	19	12	-	43	6
PR	18	32	-	18	32	-	15	20
AS	8	11	-	13	18	-	4	25
AB	19	9	-	18	8	-	4	6
Delta ¹³ C	-29,4	-27,2	-	-27,8	-26,8	-	-31,3	-24,4

III-2. Distribution des substances humiques et non humiques : corrélation avec l'aromaticité

Le protocole d'extraction sur résines XAD-8 et XAD-4 offre un outil de caractérisation simple des eaux par la détermination des proportions relatives des MO adsorbées sur chacune des résines. On parle de la distribution substances humiques / substances non humiques.

Les travaux réalisés préalablement au LCME sur des eaux de surface ont montré qu'il existe une relation entre l'adsorption des MOD à pH acide sur les résines et le SUVA des eaux étudiées (CROUE, 2004), un SUVA élevé s'associant à une forte proportion de substances humiques (adsorbables sur résine XAD-8). La figure 5.12 reprend les résultats des travaux menés au LCME sur les eaux de surface en y ajoutant les données moyennes obtenues en 2007 et 2008 sur les eaux collectées à 105 cm de profondeur et celles correspondant à la solution de l'horizon de surface. Les moyennes prennent en compte les eaux de plaques et les eaux de bougies de façon indifférenciée.

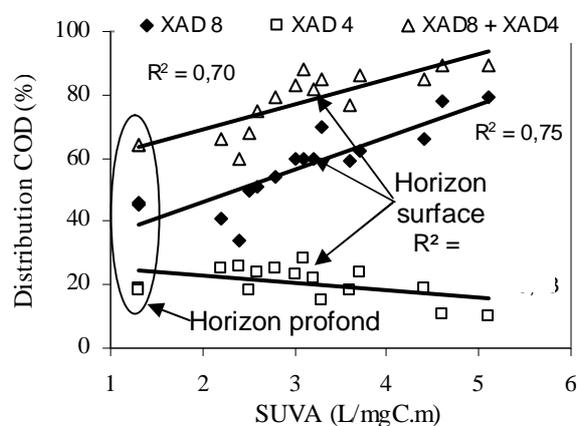


Figure 5.12 : Corrélation entre le SUVA et la distribution des fractions HPO, TPH et HPI adsorbées sur résine XAD

Les valeurs obtenues sont en parfait accord avec les corrélations préalablement établies. La matrice organique des eaux de sol collectées en profondeur présente des propriétés d'adsorption vis-à-vis des résines qui sont celles attendues en référence à leur SUVA. En profondeur les MO solubles des sols sont dominées par des structures à caractère non humique (non adsorbable sur XAD-8), résultats déjà abordés dans le chapitre 4 dont les

propriétés de sorption s'approchent de celles d'eaux de surface à faible COD et forte conductivité. Forte conductivité s'apparente le plus souvent à forte teneur en Ca, élément qui favorise, par pontage, l'adsorption des substances humiques sur les matières particulaires et leur soustraction de la phase soluble. Les eaux de surface à forte conductivité sont des eaux généralement incolores caractérisées par des valeurs de COD faibles. Les différences de comportement vis-à-vis des résines enregistrées pour les MOS solubles de l'horizon profond et de l'horizon de surface rappellent donc les différences relevées entre les eaux de surface colorées riches en substances humiques (SUVA élevé) et les eaux de surface incolores pauvres en substances humiques (faible SUVA).

III-3. L'azote organique dissous : Abondance relative et distribution moléculaire

Si l'on observe la relation entre le rapport C/N et le SUVA présentée dans la figure 5.13, on remarque qu'à nouveau les résultats obtenus sur les extraits de l'horizon profond et de l'horizon de surface s'accordent avec la relation qui associe ces deux paramètres obtenus sur les extraits d'eaux de surface. A savoir, un faible SUVA correspond à un faible rapport C/N donc à une forte teneur relative en azote.

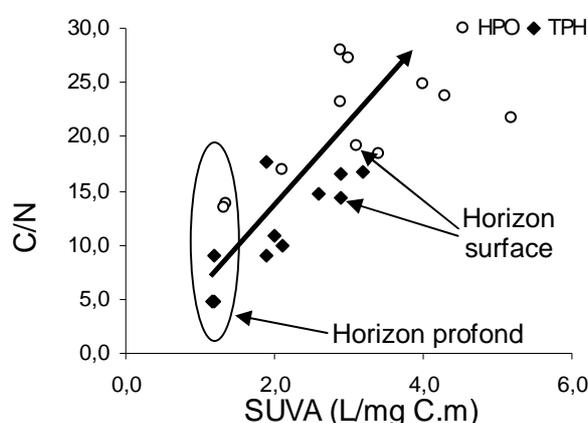


Figure 5.13 : Corrélation entre le SUVA et le rapport C/N d'échantillons d'eau de surface, d'horizons profonds et de surface

Des travaux (non publiés) effectués au LCME ont permis de déterminer la distribution moléculaire du NOD pour des extraits isolés de la Loire. Les extraits étudiés possèdent des caractéristiques proches de celles observées sur les extraits de l'horizon de surface (Extraits de Loire : HPO SUVA : 2,9 et C/N=19,1 ; TPH SUVA : 1,9 et C/N =9,0). Les profils

chromatographiques obtenus sont présentés dans la figure 5.14. Aucune analyse n'a pu être réalisée sur des extraits d'eau de surface présentant des caractéristiques proches de celles (valeurs faibles) rencontrées dans les extraits de l'horizon profond.

Si l'on regarde ces résultats, on remarque que les profils des extraits d'eaux de surface se rapprochent de ceux obtenus pour les fractions isolées de l'horizon de surface (II-4). L'azote est proportionnellement plus abondant dans les faibles masses moléculaires qui se caractérisent également par un caractère peu aromatique.

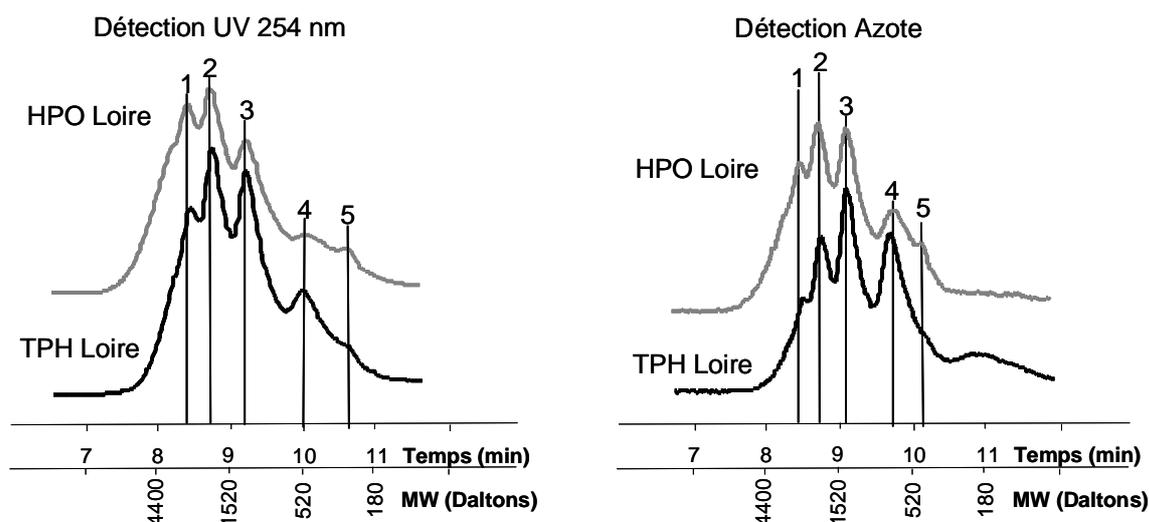


Figure 5.14 : Chromatogrammes obtenus avec le détecteur UV à 254 nm et azote pour les extraits HPO et TPH isolés de la Loire

L'intégration des profils chromatographiques de la Loire a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 5.16.

Tableau 5.16 : Abondance relative (%) des pics identifiés dans les extraits HPO et TPH de Loire, de l'horizon de surface et de l'horizon profond (moyenne) (détection UV et azote)

Echantillons	Distribution relative (%)									
	Pic 1		Pic 2		Pic 3		Pic 4		Pic 5	
	2500 Da		1500 Da		1000 Da		400 Da		200 Da	
	UV	N	UV	N	UV	N	UV	N	UV	N
HPO _{moy} horizon profond	15	0	22	12	28	21	34	67	1	0
TPH _{moy} horizon profond	2	0	14	5	35	29	46	66	2	0
HPO Loire	51	40	18	19	22	27	7	11	2	3
TPH Loire	41	12	20	10	27	18	11	60	1	0
HPO 0-30	47	36	26	20	17	26	10	8	1	10
TPH 0-30	39	10	20	9	25	11	15	70	1	0

La distribution moléculaire du NOD de la Loire se rapproche de celle obtenue pour l'horizon de surface. Encore une fois, les résultats de l'horizon de surface sont similaires à ceux de l'eau de surface. L'horizon de surface et l'eau de surface présentent des structures insaturées (carbone aromatique) prédominantes au niveau des hautes masses moléculaires (pics 1 et 2) et une proportion très élevée de structures azotées de faibles masses moléculaires pour l'extrait TPH (pic 4, 60-70 %).

Les extraits de MOD d'horizon profond présentent globalement des proportions plus fortes en structures aromatiques et azotées de faibles masses moléculaires que ceux obtenus au niveau de l'horizon de surface et de l'eau de surface.

A partir des analyses en pyrolyse, il a également été possible d'étudier l'azote organique dans les extraits de l'horizon profond et de l'horizon de surface en comparaison à l'azote organique retrouvé classiquement dans les extraits d'eau de surface. Des travaux effectués au LCME ont permis d'analyser par pyrolyse flash plusieurs extraits d'eau de surface. Les résultats obtenus ont permis de déterminer la corrélation pouvant exister entre le rapport C/N des extraits et l'abondance relative en protéines + aminosucre calculée à partir des pyrochromatogrammes. La figure 5.15 montre la relation obtenue entre ces deux paramètres.

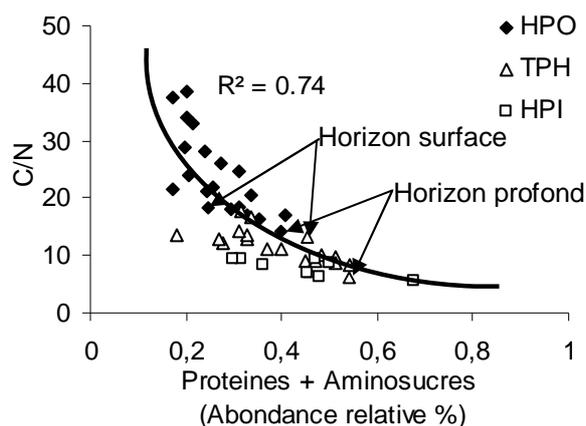


Figure 5.15 : Corrélation entre le rapport C/N et l'abondance relative en protéines + aminosucres (%) obtenue par pyrolyse

Les extraits de l'horizon profond et de l'horizon de surface sont de nouveau en accord avec la corrélation. Plus le rapport C/N est petit (plus de composés azotés) plus l'abondance relative en protéines + aminosucres est importante. Les extraits de l'horizon profond se situent dans la partie basse de la corrélation, leurs faibles rapports C/N correspondent à des abondances relatives en protéines + aminosucres plus importantes par rapport aux résultats classiquement observés dans les eaux de surface. La matière organique soluble des horizons profonds serait donc constituée d'une proportion de structure azotée plus importante que la matière organique des eaux de surface.

La bonne corrélation entre le rapport C/N et l'abondance en protéines + aminosucres ne permettant pas de différencier fondamentalement les extraits d'eau de surface et ceux de l'horizon profond, il est également possible de comparer le rapport entre les protéines et les aminosucres. Le tableau 5.17 présente les résultats obtenus pour les extraits de la Gartempe, une rivière à caractère humique qui coule en Vienne, ceux des extraits de la Seine, du Ribou, de l'horizon de surface et les valeurs moyennes obtenues pour les fractions isolées des eaux collectées en profondeur i.e. horizon profond.

Tableau 5.17 : Rapport entre les protéines et les aminosucre

Echantillons	Rapport Protéines/Aminosucre
HPO _{moy} horizon profond	2,3
TPH _{moy} horizon profond	2,1
HPO 0-30 cm	2,8
TPH 0-30 cm	0,8
HPO Ribou	3,8
TPH Ribou	2,9
HPO Gartempe	3,1
HPO Seine	4,0
TPH Seine	2,8

Les résultats obtenus montrent que la fraction HPO de l'horizon profond possède un rapport protéines/aminosucres inférieur à ceux obtenus en surface indiquant une plus grande proportion relative en aminosucres. Pour la fraction TPH, le rapport de l'horizon profond est comparable à celui obtenu pour les eaux de surface mais différent de celui de l'horizon de surface. En effet, le rapport de l'horizon profond est beaucoup plus grand que celui de l'horizon de surface montrant une plus grande proportion de protéines dans l'horizon profond et d'aminosucres en surface. Cette proportion relative importante en aminosucres dans l'extrait TPH de l'horizon de surface traduit une forte activité biologique car il est admis que les aminosucres proviennent généralement de résidus de parois bactériennes. En général, les aminosucres sont retrouvés dans la fraction de très haute masse moléculaire. L'extrait TPH de surface possédant une forte proportion d'aminosucres semble être particulier puisque la SEC/NOD (II-4) montre une forte abondance de structures de faibles masses moléculaires.

Enfin, il est possible d'appréhender l'azote organique dissous en déterminant la relation entre le rapport C/N et le $\delta^{13}\text{C}$. La figure 5.16 montre la corrélation obtenue.

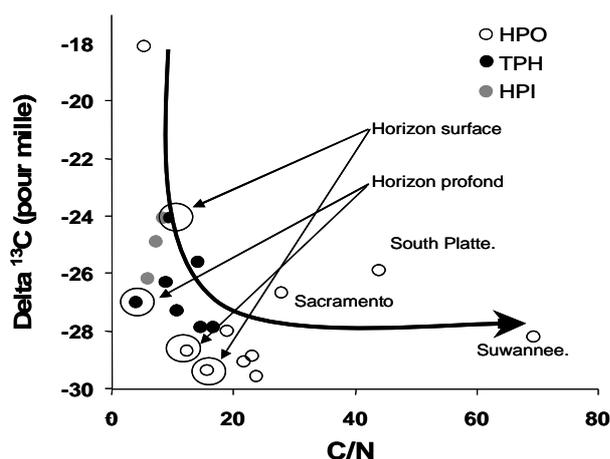


Figure 5.16 : relation entre le delta ^{13}C et le rapport C/N

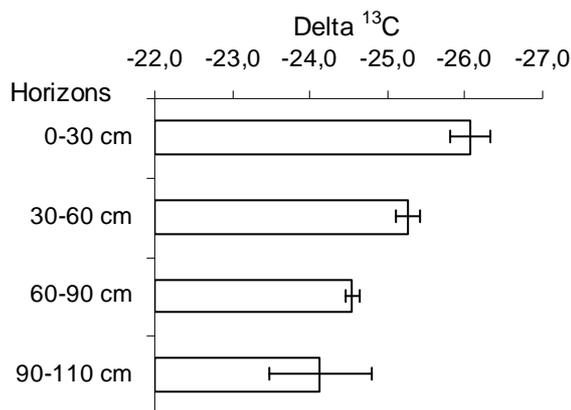


Figure 5.17 : relation entre le delta ^{13}C et la profondeur des horizons

Les résultats montrent que les extraits de l'horizon profond et de l'horizon de surface s'accordent avec la relation déterminée à partir d'eau de surface d'origines diverses. Cette relation met en avant que les fractions les plus hydrophiles (faible C/N) sont plus enrichies en ^{13}C . Les extraits de l'horizon profond avec des faibles C/N sont enrichis en ^{13}C .

La figure 5.17 montre l'évolution du $\delta^{13}\text{C}$ en fonction de la profondeur. Les résultats présentés ont été obtenus sur la MO globale, sans fractionnement. Ils montrent dans un premier temps que la MO est plus enrichie en ^{13}C en profondeur qu'en surface. Résultats observés dans tous les extraits hormis l'extrait TPH de l'horizon de surface qui encore une fois est particulier. Enfin, les valeurs obtenues sur les extraits montrent un appauvrissement plus fort en ^{13}C par rapport aux mesures effectuées sur le sol. Cette observation est logique car l'extraction sur résine permet d'extraire préférentiellement les structures les plus hydrophobes, les plus aromatiques avec un C/N faible.

Les multiples analyses effectuées afin de caractériser l'azote organique dissous des horizons profonds, nous ont permis de montrer que les extraits de l'horizon profond et de l'horizon de surface suivent les corrélations établies à partir d'eau de surface. Les extraits de l'horizon profond sont enrichis en structures azotées et ont un caractère hydrophile plus marqué. Ce caractère hydrophile implique un enrichissement en ^{13}C . Ces structures organiques azotées sont globalement de plus faibles masses moléculaires par rapport à celles de l'horizon de surface et des eaux de surface.

III-4. Des matières organiques dissoutes plus âgées en profondeur (Datation au ^{14}C)

L'accès à des mesures de datation au ^{14}C est une opportunité que nous avons saisie pour cette étude de caractérisation même s'il est important de souligner que l'interprétation des données peut être délicate surtout pour le type d'échantillons qui nous intéresse dans ce travail. En effet le fractionnement isotopique qu'accompagne potentiellement notre méthode d'extraction sur résine ainsi que la possibilité de contamination par du carbone récent (produits chimiques utilisés) sont des éléments à garder en mémoire. La tentation était également trop grande de comparer ce type de données avec celles obtenues au laboratoire il y a quelques années sur les extraits isolés de la Loire à l'appui du même protocole que celui mis en place dans notre étude. Les résultats obtenus sur les extraits de la Loire ainsi que ceux de l'horizon profond sont présentés dans le tableau 5.18. Nous avons choisi de présenter à nouveau les deux séries de résultats obtenus sur nos extraits pour confirmer une nouvelle fois la reproductibilité des mesures. Les valeurs obtenues sur les extraits de l'horizon de surface n'ont pas été pris en compte puisqu'elles ont confirmé la contamination par des molécules marquées utilisées sur le site de l'ORE.

Tableau 5.18 : Datation au ^{14}C des extraits HPO, TPH et HPI d'une eau de surface et de l'horizon profond

Echantillons	HPO		TPH		HPI	
	Corrected pMC	Age conventionnel	Corrected pMC	Age conventionnel	Corrected pMC	Age conventionnel
Loire	102,8	-	106,5/105,1	-	109,1	-
Horizon profond 2007	95,52 ± 0,28	370 ± 25 BP	91,29 ± 0,33	730 ± 30 BP	-	-
Horizon profond 2008	94,30 ± 0,28	470 ± 25 BP	92,46 ± 0,30	630 ± 25 BP	-	-

BP : Before present ; pMC : pourcent Modern Carbon

Les travaux de datation au ^{14}C effectués sur la Loire permettent de montrer que la matière organique de la fraction HPO est plus ancienne que celle de la fraction TPH qui elle-même est plus ancienne que la fraction HPI. Rappelons que le CO_2 atmosphérique présente

une valeur de 108-109 pMC qui correspond à la valeur enregistrée pour la fraction HPI. Le carbone de nos extraits a bien une origine atmosphérique (carbone terrestre). Ces résultats semblent être en accord avec la théorie de l'humification (Thurman, 1985) qui suggère une maturation plus avancée de matières humiques (fraction HPO) comparativement aux matières dites non humiques (TPH et surtout HPI). La teneur en ^{14}C des échantillons de Loire semble évoluer avec le degré d'aromaticité de la matrice organique.

En conservant à l'esprit cette tendance, la matière organique soluble des horizons profonds, en particulier la fraction HPO moins aromatique que la fraction équivalente isolée d'eau de surface devrait présenter des valeurs plus fortes en ^{14}C . C'est la tendance inverse qui est observée, les extraits de MOD (HPO et TPH) de l'horizon profond affichent des valeurs de ^{14}C beaucoup plus faibles. Ce carbone organique soluble peu aromatique serait du carbone organique plus ancien que celui isolé d'eau de surface et vraisemblablement plus ancien que la fraction soluble du carbone extractible d'horizon superficiel. Ces observations et hypothèses sont en accord avec les données obtenues par CHABBI et al. (2009) sur les différents horizons du sol de Lusignan. (tableau 5.19). Ces données montrent en effet que le carbone du sol à des profondeurs proches de celle étudiée est de nature ancienne.

Tableau 5.19 : Age en ^{14}C d'échantillons de sols de l'ORE d'après CHABBI et al. en 2009

Horizons	Profondeur (cm)	^{14}C âge (année BP)
SFe (langues)	100	750
C (langues)	110-140	Récent
SFe (matrice)	100	4296
C (matrice)	110-140	5805

La datation au ^{14}C carbone permet donc de différencier la matière organique soluble présente en profondeur de celle retrouvée en surface.

III.5. L'aromaticité : un paramètre discriminant ?

III-5-1. Analyse Globale

Le SUVA paramètre rendant compte du degré d'aromaticité des échantillons peut être mis en relation avec le pourcentage de carbone aromatique déterminé par RMN ^{13}C . La figure 5.18 montre la corrélation obtenue entre ces deux paramètres.

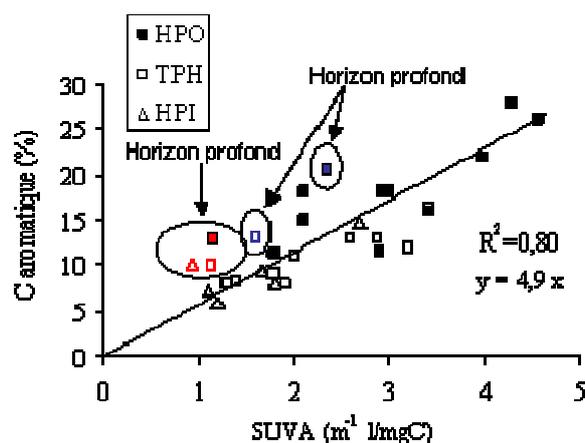


Figure 5.18 : Corrélation entre le SUVA et la quantité de C aromatique détecté par RMN ^{13}C

La relation établie montre que plus le SUVA est élevé plus le pourcentage de carbone aromatique est important. Les extraits HPO avec des SUVA plus élevés possèdent des pourcentages en carbone aromatique plus importants que les fractions TPH quel que soit l'origine. Les extraits de l'horizon de surface et de l'horizon profond sont en accord avec cette corrélation. Le faible SUVA des extraits de l'horizon profond coïncide avec un pourcentage de carbone aromatique plus faible que celui observé dans l'horizon de surface et dans les eaux de surface qui présentent un SUVA plus fort. On sait par ailleurs que la nature des substituants des cycles aromatiques peut influencer de manière notable le coefficient d'extinction molaire de ces dérivés aromatiques et par conséquent leur SUVA. Nos résultats tendent donc à suggérer que les structures aromatiques présentes dans la MO soluble de l'horizon profond ne diffèrent pas significativement de celles incorporées dans les MO solubles de l'horizon de surface ou des eaux de surface.

Même si les structures aromatiques semblent être globalement de même nature (accord avec la corrélation $SUVA = f(C \text{ aromatique})$), les caractéristiques de fluorescence des extraits de l'horizon de surface et de l'horizon profond montrent des différences importantes dans la nature des chromophores ; différences identifiées par les longueurs d'onde d'excitation et d'émission correspondant au maximum d'intensité de fluorescence (positionnement des chromophores dans les spectres EEM). Les figures 5.19 et 5.20 présentant respectivement les spectres d'émission ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$) et d'excitation ($\lambda_{em} = 410 \text{ nm}$) permettent de mieux appréhender ces différences.

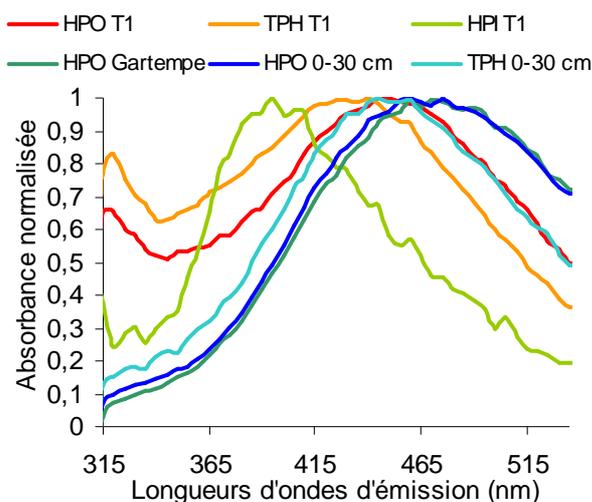


Figure 5.19 : Spectres d'émission des extraits HPO, TPH et HPI de l'horizon profond et de surface (excitation 280 nm)

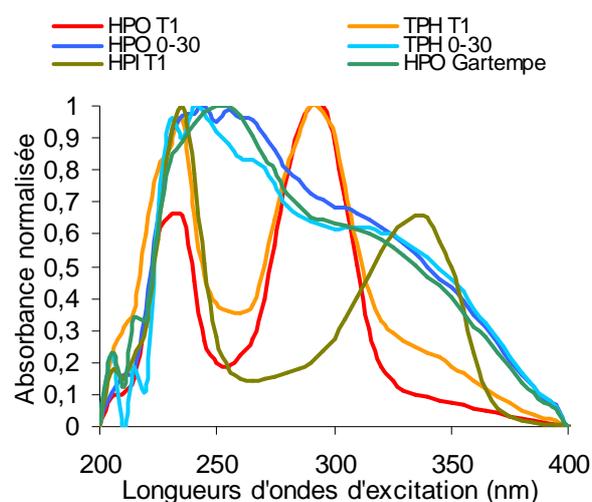


Figure 5.20 : Spectres d'excitation des extraits HPO et TPH de l'horizon profond et de surface (émission 410 nm)

Les MO de l'horizon profond seraient constitués, comme celles de l'horizon de surface, de deux fluorophores principaux.

La figure 5.16 met en évidence un déplacement significatif des spectres d'émission vers les plus fortes longueurs d'onde pour les fractions de l'horizon de surface et de l'eau de surface (Gartempe) par rapport à celles de l'horizon profond. D'après COBLE (1996) et COBLE et al. (1990), ces observations confirment la présence de chromophores de plus faibles masses moléculaires dans les horizons profonds par rapport aux eaux de surface. Enfin les spectres d'excitation confirment ce décalage et mettent clairement en évidence des chromophores dans les horizons profonds qui se caractérisent par des bandes d'absorption beaucoup moins larges que celles enregistrées pour les autres extraits. Ce résultat permet de relever que ces chromophores s'apparentent donc à des structures plus simples que celles que

l'on retrouve dans la MO soluble de surface. Ce constat est en accord avec les données obtenues par chromatographie d'exclusion stérique SEC/COD sur les eaux collectées en profondeur.

La fluorescence apporte donc pour la première fois des éléments d'information permettant de différencier les extraits de l'horizon profond de ceux isolés de l'horizon de surface ou d'eaux de surface.

III-5-2. Présence de structures à caractère humique dans la matrice organique soluble des horizons profonds

Parmi les analyses moléculaires à notre disposition, nous pouvons nous appuyer sur les techniques pyrolytiques pour essayer de différencier les structures aromatiques présentes dans les différents extraits.

Les analyses en pyrolyse TMAH ont permis une étude qualitative des structures aromatique présentes dans les extraits. Les résultats montrent qu'on retrouve les mêmes composés aromatiques dans les fractions de l'horizon de surface et de l'horizon profond avec la présence des unités p-hydroxyphenyles, guaiacyles et syringyles attribuées plus généralement aux dérivés ligneux. Rappelons toutefois que la pyrolyse TMAH des sucres peut conduire à la production de dérivés semblables (FRAZIER et al. 2003). La présence de matières dites humiques ou à caractère humique dans l'horizon profond semble donc vérifiée. L'analyse des acides gras par l'ion m/z 74 permet d'identifier des acides gras avec des chaînes carbonées allant jusqu'à C28 dans tous les extraits, information que les spécialistes des sols utilisent généralement pour justifier l'origine terrestre, humique, de la matière organique.

Toutefois il est clair que si les matières humiques sont présentes dans l'horizon profond, elles se caractérisent par structures de masses moléculaires apparentes plus faibles, et de complexité moléculaire moindre. De plus, les données obtenues en pyrolyse flash, technique que l'on peut considérer comme semi-quantitative (BRUCHET et al. 1990), montrent des abondances relatives plus faibles en dérivés phénoliques. Les dérivés de type méthoxy-phénol, produits de pyrolyse caractéristiques des substances humiques comme l'atteste le pyrochromatogramme enregistré pour la fraction HPO de la rivière Gartempe (figure 5.22) ne sont pas identifiables dans les pyrochromatogrammes des extraits des horizons profonds

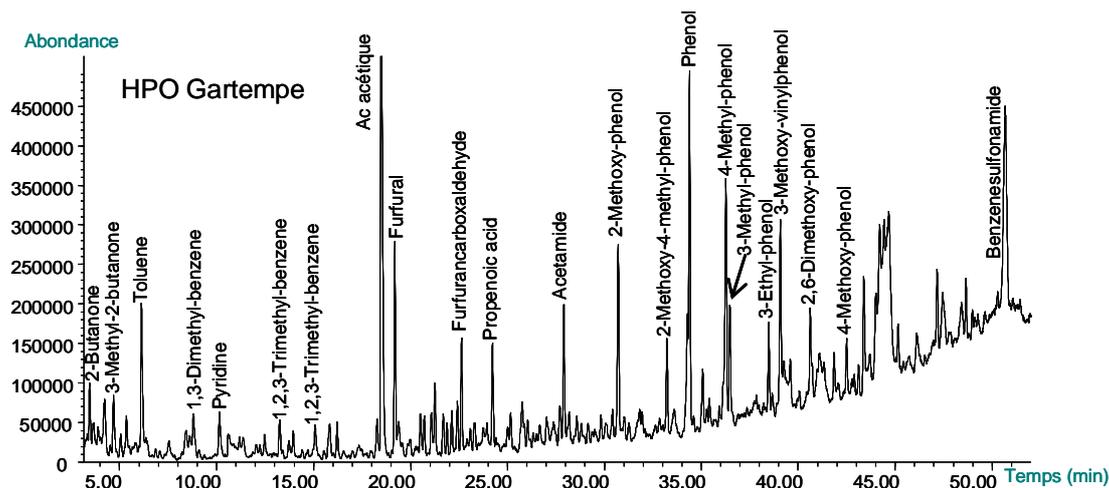


Figure 5.21 : Pyrochromatogramme d'un extrait HPO d'une eau de surface (Gartempe) obtenu en pyrolyse flash

III-5-3. Identification de structures dérivées des terpènes

Les données obtenues par pyrolyse MSSV ont permis une avancée majeure dans la recherche d'identification de structures aromatiques dans les MOD des horizons profonds. La caractéristique la plus frappante des produits de pyrolyse de la fraction HPO de l'horizon profond a été la plus forte proportion en alkyl-naphtalènes (ANs), en particulier les isomères alkylés C₄-C₅. La figure 5.22 montre la répartition des ANs C₁-C₅ détectés par pyrolyse MSSV sur la fraction HPO de l'horizon profond. Ces composés ne sont pas détectés en pyrolyse flash, les conditions thermiques plus douces de la pyrolyse MSSV permettent la libération de ces constituants biochimiques permettant ainsi la préservation de leurs modes de substitution.

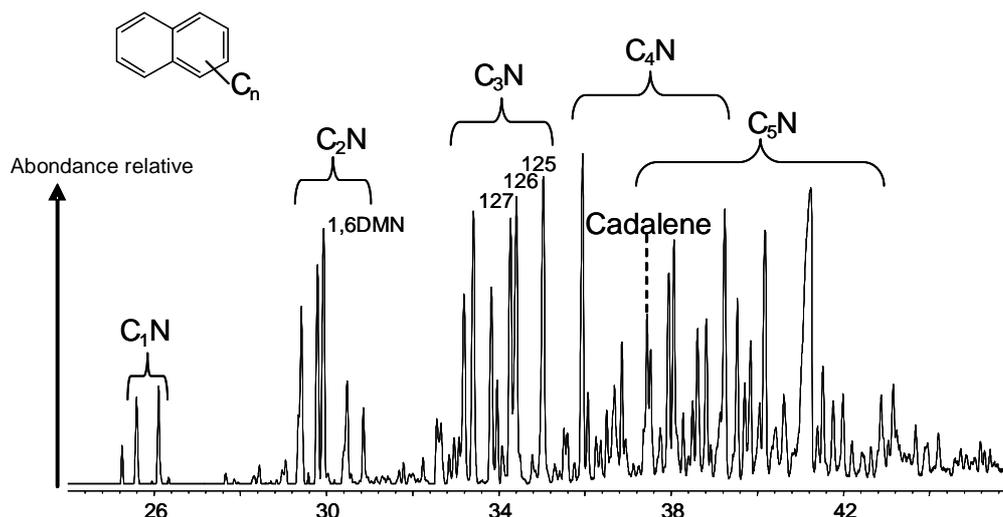


Figure 5.22 : Chromatogramme des ions m/z 142+156+170+184+198 montrant la répartition des alkyl-naphtalènes C1-C5 détecté par pyrolyse MSSV de la fraction HPO de l'horizon profond

Enfin, plusieurs phénanthrènes alkylés (figure 5.23) ont également été identifiés, ils fournissent des preuves complémentaires de la présence de matières organiques dérivées de terpénoïdes dans la fraction HPO de l'horizon profond.

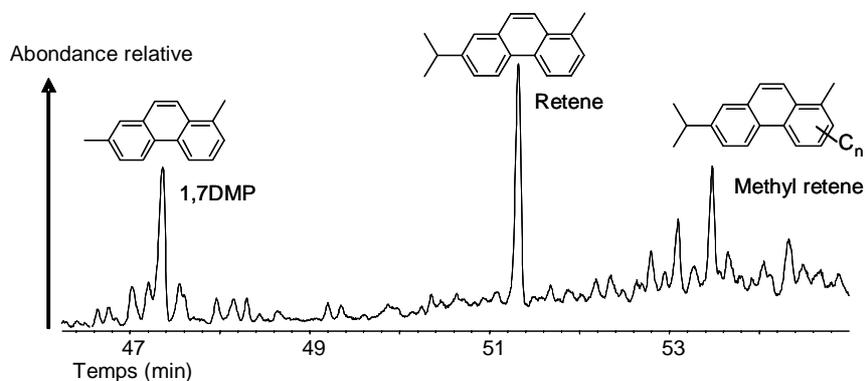


Figure 5.23 : Chromatogramme des ions m/z 206+219+233 montrant la répartition des bio-marqueurs alkyl-phénanthrène (1,7DMP, rétène et méthyl-rétène) détecté par pyrolyse MSSV de la fraction HPO de l'horizon profond

Les techniques pyrolytiques permettent de différencier la MO de l'horizon profond et celle de l'horizon de surface et des eaux de surface. La pyrolyse flash montre que la MO de surface serait constituée d'une plus grande proportion de méthoxy-phénol issue de dérivés de la lignine, alors que la pyrolyse MSSV confirme la présence de dérivés de terpénoïdes dans la MO des horizons profonds.

III-6. Analyse structurale : confirmation de la présence de terpènes

Cette partie repose sur les travaux effectués par LEENHEER en 2000. Le protocole d'extraction des MO a été appliqué sur une eau de surface à caractère non humique, pauvre en MOD et de faible SUVA. L'absence de matériel humique dans ces eaux est associée à des phénomènes d'adsorption, de complexation sur des colloïdes minéraux (complexes argilo-humiques) de hautes masses moléculaires. Les eaux pauvres en MOD et à faible SUVA sont souvent des eaux de forte conductivité, propriété favorisant la coagulation/floculation des matières organiques chargées de hautes masses moléculaires i.e substances humiques. Ces caractéristiques se rapprochent de celles de nos eaux collectées au niveau des horizons profonds. Pour cela, LEENHEER utilise les mêmes résines XAD que nous avons utilisées dans ce travail. Cependant, il utilise une double élution de la MO organique adsorbée. Dans un premier temps, il élue les deux résines XAD avec de la soude 0,1 N afin d'extraire les composés acides (fraction dite ionisée) puis il utilise un solvant acétonitrile/eau afin de récupérer la fraction neutre de la matière organique non adsorbée en milieu alcalin. Il obtient ainsi quatre fractions, les fractions HPO acide et neutre et les fractions TPH acide et neutre. Dans nos travaux, nous avons réalisé uniquement l'étape d'élution par le mélange acétonitrile/eau permettant d'extraire la totalité de la matière organique sans distinction des composés acides et neutres. Les résultats obtenus sur les différentes fractions en RMN ^{13}C pour l'horizon profond, l'horizon de surface, une eau de surface étudiée au LCME et l'eau de surface faiblement chargée étudié par LEENHEER sont présentés dans la figure 5.24.

Il faut tout d'abord noter que les fractions HPO et TPH de l'horizon profond possèdent des profils RMN ^{13}C similaires avec une bande des composés aliphatiques majoritaire. Les profils des extraits de l'horizon de surface et de l'eau de surface (Réservoir du Ribou) sont également comparables avec une plus grande abondance relative en composés aromatiques. Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus par LEENHEER (2000), on remarque que les profils des extraits isolés des eaux collectées au niveau de l'horizon profond semblent comparables au profil obtenu par LEENHEER pour la fraction HPO neutre alors que les profils des MOD de l'horizon de surface et de l'eau du Ribou semblent plus se rapprocher des profils des fractions HPO et TPH acide. La matière organique de l'horizon profond serait donc constituée de composés à caractère neutre alors que la MOD des eaux de surface et de l'horizon de surface de composés à caractère acide.

D'après LEENHEER (2000), la fraction HPO neutre serait dérivée de composés de type tannins et terpénoïdes. Les dérivés de terpénoïdes seraient des constituants majeurs de la

MOD des eaux souterraines, ce sont des structures ubiquistes des eaux naturelles (LEENHEER, 2005).

Pour appuyer cette hypothèse, on peut citer les résultats obtenus en infrarouge montrant une plus grande proportion en groupement CH_3 dans les extraits de l'horizon profond. Ces groupements CH_3 sont généralement caractéristiques des terpènes comparativement aux substances humiques plus riches en groupements carboxyles.

La disparition des SH dans les horizons profonds pourrait s'expliquer en partie par la technique du chaulage. En effet, tous les 10 ans, afin de réguler le pH des sols, un apport en carbonate de calcium est effectué sur les parcelles. Le calcium apporté pourrait donc par des phénomènes d'adsorption retenir les SH dans les horizons supérieurs.

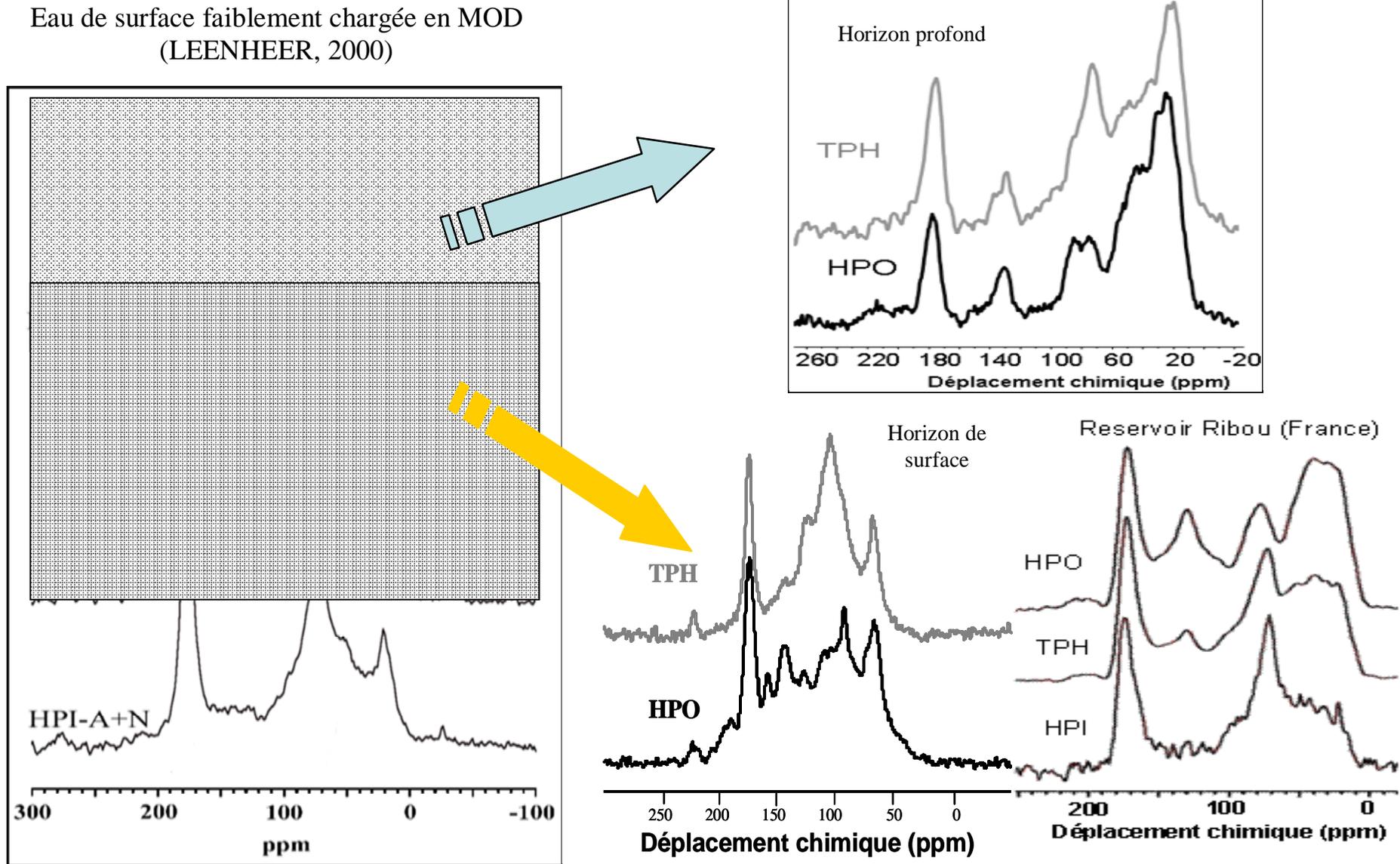


Figure 5.24 : Spectres RMN ^{13}C des fractions HPO, TPH et HPI de l'horizon profond, de l'horizon de surface, d'une eau de surface étudiée au LCME et d'une eau de surface faiblement chargée en MOD étudiée par LEENHEER, 2000.

CONCLUSION GENERALE

Les objectifs de ce mémoire étaient d'optimiser le protocole d'extraction des MOS par ultrasons ainsi que de caractériser le carbone organique dissous (COD) collecté des différents horizons via le dispositif de collecte mis en place sur le site de l'ORE-ACBB de Lusignan. Ce dispositif comporte des plaques lysimétriques, des bougies poreuses ainsi que des monolithes. Le sol étudié est un sol arable de type Cambisol avec une concentration en carbone total de l'ordre de 9 à 10 mg.g⁻¹ en surface et de 1,5 à 2,7 mg.g⁻¹ en profondeur. Les analyses que nous avons réalisées ont montré que les concentrations en COD sont de l'ordre de 10 mg.L⁻¹ en surface et comprises entre 1,5 et 2 mg.L⁻¹ en profondeur. Ces valeurs mesurées ici sont très proches de celles qui sont rapportées en générale sur les sols arables français.

Le protocole d'extraction optimisé à l'eau de la MO des différents horizons a permis de montrer que la concentration en COD décroît avec la profondeur des horizons du profil. L'étude sur le monolithe montre également une diminution de la concentration en COD avec la profondeur. Comparativement à l'eau pure (pH voisin de la neutralité) et comme attendu, les techniques d'extraction avec NaOH et CaCl₂ permettent d'extraire des quantités de MO plus importantes (et comparables) quel que soit l'horizon retenu. Dans l'horizon de surface, la fraction de MO solubles dans l'eau pure représente environ la moitié (44%) du carbone organique extractible à la soude, cette contribution chute à 10-20 % pour les horizons profonds. Le protocole d'extraction utilisé joue donc un rôle important dans la quantité de matière organique soluble extraite. La comparaison des concentrations en COD par rapport à celles en carbone organique total des différents horizons montrent que la fraction soluble de la matière organique (COD) ne représente qu'une proportion infime de la MO, entre 1,3 % dans l'horizon supérieur et 0,5 % dans les horizons profonds.

Le suivi des eaux collectées au niveau des PL et des BP a permis de mettre en évidence une évolution significative des teneurs en COD au cours du temps dans tous les traitements. Des variations cycliques des concentrations en COD ont été observées, avec une augmentation pendant l'hiver jusqu'au milieu du printemps suivie d'une diminution en fin d'année. En été après plusieurs mois d'une pluviosité insuffisante pour permettre un échantillonnage en profondeur, on observe une augmentation très significative du COD jusqu'à 4-5 mg.L⁻¹. Cette valeur plus forte en COD s'associe à une augmentation de la proportion relative en structures de hautes masses moléculaires i.e. substances humiques. L'étude de l'impact des cycles de sécheresse-réhumidification à partir des monolithes peut expliquer en partie cette augmentation. En effet, la réhumidification brutale qui pourrait correspondre aux premières pluies après un été sec s'accompagne de changements

qualitatifs et quantitatifs importants sur la matière organique soluble des sols. Les premières eaux collectées montrent une augmentation significative des concentrations en COD, observée au niveau de tous les horizons. Cette matière organique est composée majoritairement de molécules hydrophiles de petite taille, qui semble être très biodégradable (disparition du pic en chromatographie d'exclusion de taille au bout de 10 jours). De nombreux travaux restent encore à réaliser pour pouvoir comprendre ce phénomène. Dans cette étude, seule une séquence d'assèchement-réhumidification a pu être réalisée.

Les analyses réalisées sur les solutions de sol (protocole eau + US) et sur les eaux collectées par les PL et les BP ont permis d'aboutir aux mêmes conclusions. Le COD présente une forte diminution du SUVA avec la profondeur. Les valeurs en surface sont caractéristiques d'eaux riches en matériel humique, celles en profondeur caractéristiques d'eaux souterraines (faible teneur en COD, absence de couleur) confirmant la présence de structures non humiques à caractère moins aromatique dans les horizons profonds. Les analyses en chromatographie d'exclusion de taille ont permis d'appuyer les résultats observés avec le SUVA. Ainsi, une bande large centrée au voisinage de 40 minutes correspondant aux substances humiques, fraction de haute masse moléculaire (domaine de temps de rétention plus faibles) est majoritaire dans les horizons 0-20 cm et 20-30 cm par rapport aux horizons les plus profonds. Le résultat le plus marquant est l'augmentation proportionnelle des molécules de plus petites tailles moléculaires avec la profondeur de l'horizon considéré. Comparativement aux horizons supérieurs riches en substances humiques (plus aromatique) les horizons profonds 60-100 cm et surtout 100-140 cm se caractérisent par une proportion importante de molécules de plus petites tailles i.e. masses moléculaires (moins aromatique).

Le fractionnement sur résine XAD a ensuite permis de mieux appréhender les caractéristiques structurales du COD de l'horizon profond en permettant l'utilisation de techniques d'analyses plus poussées.

La distribution du COD établie pour les eaux des PL et pour des BP est relativement comparable à celle retrouvée pour les eaux naturelles. Le COD de l'horizon profond (105 cm) est proportionnellement un peu plus riche en substances non humiques (i.e. fractions TPH + HPI) que les extraits des eaux de surface et de l'horizon de surface. En accord avec la littérature relative aux eaux de surface (CROUE, 2004), l'extrait HPO i.e. substances humiques présente un rapport massique C/N ($C/N_{HPO} = 14$) supérieur à celui obtenu pour l'extrait TPH ($C/N_{TPH} = 5$). La fraction TPH est donc proportionnellement plus riche en structures azotées que la fraction HPO. Résultat confirmé par la chromatographie d'exclusion de taille détection UV et azote qui montre

non seulement une proportion plus importante de composés azotés dans la fraction TPH mais également une plus grande abondance de structures azotées de faibles masses moléculaires en profondeur par rapport à la surface. Ces résultats confirment une nouvelle fois ceux obtenus directement sur les eaux, avec une présence plus importante de structures non humiques.

La caractérisation des différentes fractions HPO, TPH et HPI de la MO de l'horizon profond a ensuite été possible en s'appuyant sur des travaux effectués précédemment sur des eaux de surface au LCME.

Les différentes corrélations établies (partie discussion chapitre 5) montrent que les extraits de l'horizon profond sont en accord avec les relations établies à partir d'eau de surface. Cependant, les extraits de l'horizon profond montrent encore une fois, une plus faible aromaticité avec un faible SUVA et un décalage des chromophores vers les plus faibles longueurs d'ondes, décalage montrant la présence de structures de plus faibles masses moléculaires en profondeur (COBLE (1996) et COBLE et al. (1990)). Cette faible aromaticité de la MO des horizons profonds peut s'expliquer par des processus de biodégradation (microorganismes...) ou « chimique » engendrant la simplification de molécules complexes (fortement aromatiques) en molécules plus simples (faiblement aromatiques). Les analyses IR sont elles aussi en accord avec la littérature, montrant une abondance importante de structures carboxyliques (COOH), confirmant la forte solubilité des MO dans l'eau. Ces résultats ont montré également une plus grande proportion de sucres dans les fractions TPH et une proportion plus importante de composés aliphatiques dans l'horizon profond confirmant la plus faible aromaticité et la présence de structures de plus petites tailles.

La thermochemiolyse qui est une analyse quantitative ne permet pas encore une fois d'observer de différences significatives entre l'horizon profond et l'horizon de surface. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux observés sur les eaux de surface et sur l'horizon de surface avec la présence dans tous les profils de dérivés d'acide gras à longue chaîne (jusqu'à C28) et d'unités p-hydroxyphenyles, syringyles et guaiacyles connues pour provenir majoritairement de dérivés ligneux mais également de dérivés de sucre. On observe également une proportion plus importante de dérivés de sucre dans les fractions TPH en accord avec les analyses infrarouges et la littérature.

Bien que la thermochemiolyse ne permette pas de montrer de différences significatives entre la MO de surface et de profondeur, les autres analyses moléculaires telles que la pyrolyse flash, la MSSV et la RMN ^{13}C montrent certaines propriétés différentes.

La pyrolyse flash qui est une analyse semi-quantitative semble en effet différente en fonction de l'origine des extraits. Les spectres de l'horizon profond montrent une proportion beaucoup moins importante de composés phénoliques notamment de méthoxy-phénols. Ces dérivés

sont connus pour provenir de la pyrolyse des structures de type lignine présentes dans la matrice organique des sols. Ces composés méthoxy-phénols non visibles en pyrolyse flash sont certainement présents dans l'horizon profond mais en moins grande quantité puisque la méthylation en pyrolyse TMAH permet de retrouver les unités p-hydroxyphenyles, guaiacyles et syringyles issues de la dégradation de composés de type ligneux.

Les résultats en RMN ^{13}C obtenus par LEENHEER (2000) sur des extraits d'une eau de surface faiblement chargée se rapprochant des propriétés des eaux collectées en profondeur ont permis de mettre en avant une caractéristique importante du COD de l'horizon profond par rapport à la surface. Le fractionnement employé dans ces travaux a permis de séparer les composés acides et neutres de chacune des fractions HPO, TPH et HPI. La comparaison des résultats RMN ^{13}C de ces travaux avec ceux obtenus dans ce manuscrit montre clairement que les profils de l'horizon profond semblent comparables au profil obtenu pour la fraction HPO neutre alors que le profil d'une eau de surface (Ribou) semble se rapprocher du profil des fractions HPO et TPH acides. La matière organique de l'horizon profond serait donc constituée de composés à caractère neutre alors que la MO des eaux de surface et l'horizon de surface de composés à caractère acides. Résultats appuyés par les résultats en IR montrant la présence plus importante de groupement CH_3 en profondeur par rapport à la surface.

Selon la littérature (LEENHEER, 2005), les fractions neutres seraient dérivées de composés de type tanins et terpénoïdes. Ces dérivés de terpénoïdes sont des constituants majeurs de la MOD des eaux souterraines. La MOD de l'horizon profond posséderait donc des similitudes avec les eaux souterraines. Les analyses en pyrolyse MSSV montrent la présence de composés de type phénanthrènes confirmant la présence de dérivés de terpénoïdes dans les horizons profonds.

Par ailleurs les résultats de l'analyse de l'activité ^{14}C des différentes fractions de COD (400-700 ans) des horizons profonds peuvent s'expliquer par différents processus à savoir, par la déstabilisation du carbone ancien à travers le phénomène de minéralisation et/ou par la remobilisation des molécules anciennes préalablement adsorbées dans la phase minérale.

Au stade actuel, le mode d'occupation (culture/prairie) ne semble pas influencer ni la dynamique du COD, ni sa composition chimique. Ceci est probablement dû à l'inertie du système. En effet le faible temps écoulé depuis l'installation du dispositif ne permet pas de dégager des différences significatives en termes de concentration et de structure du COD des horizons profonds des systèmes arables. Néanmoins, ces résultats peuvent être considérés aujourd'hui comme une caractérisation d'un état initial du COD et une valeur scientifique ajoutée incontestable surtout lorsque les variables de forçage appliquées au système auront fait suffisamment diverger les variables d'état du système (~10 ans).

La disparition des SH dans les horizons profonds pourrait s'expliquer en partie par la technique du chaulage. En effet, tous les 10 ans afin de réguler le pH des sols, un apport en carbonate de calcium est effectué sur les parcelles. Le calcium apporté pourrait donc par des phénomènes d'adsorption retenir les SH dans les horizons supérieurs.

De nombreux travaux doivent encore être effectués pour caractériser la MO soluble des horizons profonds et étudier l'impact des traitements sur le COD des sols.

Dans un premier temps, des analyses complémentaires pour confirmer l'impact des cycles de sécheresse-réhumidification doivent être réalisées pour comprendre l'augmentation du COD en période estivale. Dans un second temps des analyses supplémentaires devront être menées afin de confirmer les résultats obtenus dans ce manuscrit, et caractériser ainsi l'état initial du COD du site de l'ORE. Il sera nécessaire également de continuer à suivre les caractéristiques structurales des extraits HPO, TPH et HPI de la MO des horizons profonds, afin de comprendre l'impact des différents traitements sur le COD lorsque le système commencera à évoluer. Enfin, la compréhension de la disparition des SH dans les horizons profonds pourrait être étudiée en s'appuyant sur des travaux de chaulage de différentes parcelles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aiken G.R. et Leenheer J., 1993.** Isolation and chemical characterization of dissolved and colloidal organic matter. *Chemistry & Ecology*, 8 (3), pp. 135-151.
- Aiken G.R., McKnight D.M., Thorn K.A. et Thurman E.M., 1992.** Isolation of hydrophilic organic acids from water using nonionic macroporous resins. *Organic Geochemistry*, 18 (4), pp. 567-573.
- Alberts J.J. et Takács M., 2004.** Comparison of the natural fluorescence distribution among size fractions of terrestrial fulvic and humic acids and aquatic natural organic matter. *Organic Geochemistry*, 35 (10), pp. 1141-1149.
- Amelung W., Cheshire M.V. et Guggenberger G., 1996.** Determination of neutral and acidic sugars in soil by capillary gas liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 28 (12), pp. 1631-1639.
- Amery F., Degryse F., Cheyns K., De Troyer I., Mertens J., Merckx R. et Smolders E., 2008.** The UV-absorbance of dissolved organic matter predicts the fivefold variation in its affinity for mobilizing Cu in an agricultural soil horizon. *European Journal of Soil Science*, 59 (6), pp. 1087-1095.
- Andersen J.M., 1976.** An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. *Water Research*, 10(4), pp. 329-331.
- Andreux F., Bruckert S., Correa A. et Souchier B., 1980.** Sur une méthode de fractionnement physique et chimique des agrégats des sols : origines possibles de la matière organique des fractions obtenues. *Académie des sciences, Paris*, 291, série D, pp. 381-384.
- Artinger R., Buckau G., Geyer S., Fritz P., Wolf M. et Kim J.I., 2000.** Characterization of groundwater humic substances : influence of sedimentary organic carbon. *Applied Geochemistry*, 15(1), pp. 97-116.
- Baize D. et Jabiol B., 1995.** Guide pour la description des sols, Collection techniques et pratiques, INRA, Paris.
- Baker A. et Genty D., 1999.** Fluorescence wavelength and intensity variations of cave waters. *Journal of Hydrology*, 217 (1-2), pp. 19-34.
- Banaitis M.R., Waldrip-Dail H., Diehl M.S., Holmes B.C., Hunt J.F., Lynch R.P. et Ohno T., 2006.** Investigating sorption-driven dissolved organic matter fractionation by multidimensional fluorescence spectroscopy and PARAFAC. *Journal of Colloid and Interface Science*, 304 (1), pp. 271-276.
- Barancíková G., Senesi N. et Brunetti G., 1997.** Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types. *Geoderma*, 78 (3-4), pp. 251-266.
- Bear J. et Dagan G., 1965.** The relationship between solutions of flow problems in isotropic and anisotropic soils. *Journal of Hydrology*, 3(2), pp. 88-96.
- Belin C., Quellec C., Lamotte M., Ewald M. et Simon Ph., 1993.** Characterization by fluorescence of the dissolved organic matter in natural water. Application to fractions obtained by

tangential ultrafiltration and XAD resin isolation. *Environmental Technology*, 14 (12), pp. 1131-1144.

Berwick L., Greenwood P., Kagi R. et Croué J-P., 2007. Thermal release of nitrogen organics from natural organic matter using micro scale sealed vessel pyrolysis. *Organic geochemistry*, 38 (7), pp. 1073-1090.

Biber M.V., Gulacar F.O. et Buffle J., 1996. Seasonal variations in principal groups of organic matter in a eutrophic lake using pyrolysis/GC/MS. *Environmental Science and Technology*, 30 (12), pp. 3501-3507.

Blaser P., Heim A. et Luster J., 1999. Total luminescence spectroscopy of NOM-typing samples and their aluminium complexes. *Environment International*, 25 (2-3), pp. 285-293.

Boyer J.N. et Groffman P.M., 1996. Bioavailability of water extractable organic carbon fractions in forest and agricultural soil profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 28 (6), pp. 783-790.

Boyle E., Collier R., Dengler A.T., Edmond J.M. et Stallard R.F., 1974. On the chemical mass-balance in estuaries. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 38 (11), pp. 1719-1728.

Brady N.C. et Weil R.R., 2002. The nature and properties of soils, Prentice Hall, New Jersey, 13^{ème} édition, pp. 960.

Bruchet A., Rousseau C. et Mallevalle J., 1990. Pyrolysis-GC-MS for investigating high-molecular-weight THM precursors and other refractory organics. *Journal American Water Works Association*, 82, pp. 66-74.

Bruckert S., 1979. Analyse des complexes organo-minéraux des sols. Dans : Bonneau M. et Souchier S., Edition., *Pédologie*, 2, Masson, Paris, France, pp. 187-209.

Bruckert S., Andreux F., Correa A., Amboutta K.J.M. et Souchier B., 1978. In Proc. 11^{ème} congrès AISS, Edmonton, Canada.

Chabbi A., Kögel-Knabner I. et Rumpel C., 2009. Stabilised carbon in subsoil horizons is located in spatially distinct parts of the soil profile. *Soil Biology and Biochemistry*, 41 (2), pp. 256-261.

Chantigny M.H., 2003. Dissolved and water-extractable organic matter in soils: A review on the influence of land use and management practices. *Geoderma*, 113 (3-4), pp. 357-380.

Chen W., Westerhoff P., Leenheer J.A. et Booksh K., 2003. Fluorescence Excitation-Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter. *Environmental Science and Technology*, 37 (24), pp. 5701-5710.

Chen W., Zhao Z., Koprivnjak J-F. et Perdue E.M., 2002. A mechanistic study of the high-temperature oxidation of organic matter in a carbon analyzer. *Marine Chemistry*, 78(4), pp.185-196.

Cheshire M.V., 1979. Nature and Origin of Carbohydrates in Soils. pp. 216.

Chin Y-P., Aiken G. et O'Loughlin E., 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology*, 28 (11), pp. 1853-1858.

- Chorover J. et Amistadi M.K., 2001.** Reaction of forest floor organic matter at goethite, birnessite and smectite surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65 (1), pp. 95-109.
- Christy A.A., Bruchet A. et Rybacki D., 1999.** Characterization of natural organic matter by pyrolysis/GC-MS. *Environment International*, 25 (2-3), pp. 181-189.
- Clark J.M., Chapman P.J., Heathwire A.L. et Adamson J.K., 2005.** Temperature and water table controls on dissolved organic carbon in peat soil.
- Clifford D.J., Carson D.M., McKinney D.E., Bortiatynski J.M. et Hatcher P.G., 1995.** A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: Thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry*, 23 (2), pp. 169-175.
- Coble G. P., 1996.** Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51, pp. 325-346.
- Coble P.G., Green S.A., Blough N.V. et Gagosian R.B., 1990.** Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature*, 348 (6300), pp. 432-435.
- Corvasce M., Zsolnay A., D'Orazio V., Lopez R. et Miano T.M., 2006.** Characterization of water extractable organic matter in a deep soil profile. *Chemosphere*, 62 (10), pp. 1583-1590.
- Croué J-P., 2004.** Isolation of humic and non-humic NOM fractions: Structural characterizations. *Environmental Monitoring and Assessment*, 92 (1-3), pp. 193-207.
- Croué J-P., Martin-Mousset B., Lefebvre E., Deguin A. et Legube B., 1997.** Evolution of the humic/non humic natural organic matter distribution and its biodegradable fraction during drinking water treatments [Impact des traitements de potabilisation sur le CODB et la distribution des substances humiques et non humiques de la matière organique naturelle]. *Revue des Sciences de l'Eau*, 10 (1), pp. 63-81.
- Croué J-P., Violleau D., Bodaire C. et Legube B., 1999.** Removal of hydrophobic and hydrophilic constituents by anion exchange resin. *Water Science and Technology*, 40 (9), pp. 207-214.
- Croué J-P., Violleau D. et Labouyrie L., 2000.** Disinfection by-product formation potentials of hydrophobic and hydrophilic natural organic matter fractions: A comparison between a low- and a high-humic water. *ACS Symposium Series*, 761, pp. 139-153.
- Dabin B., 1976.** Méthode d'extraction et de fractionnement des matières humiques du sol, application à quelques études pédologiques et agronomiques dans les sols tropicaux. *Cahier ORSTOM Série Pédologique*, XIV, pp. 287-297.
- David M., Vance G. et Kahl J., 1999.** Chemistry of dissolved organic carbon at Bear Brook Watershed, Maine: Stream water response to (NH₄)₂SO₄ additions. *Environmental Monitoring and Assessment*, 55 (1), pp. 149-163.
- Delprat L., Chassin P., Linères M. et Jambert C., 1997.** Characterization of dissolved organic carbon in cleared forest soils converted to maize cultivation. *European Journal of Agronomy*, 7 (1-3), pp. 201-210.
- Ding G., Liu X., Herbert S., Novak J., Amarasiriwardena D. et Xing B., 2006.** Effect of cover crop management on soil organic matter. *Geoderma*, 130 (3-4), pp. 229-239.

- Dupouey J.L., 1999.** Stocks et flux de carbone dans les forêts françaises, comptes-rendus de l'académie d'agriculture de France, 85 (6).
- Edwards A.P. et Bremmer J.M., 1967.** Dispersion of soil particles by sonic vibration. *Journal Soil Science*, 18, pp. 47-63.
- Edzwald J.K., 1993.** Coagulation in drinking water treatment: Particles, organics and coagulants. *Water Science and Technology*, 27 (11), pp. 21-35.
- Ellerbrock R.H., Hohn A. et Rogasik J., 1999.** Functional analysis of soil organic matter as affected by long-term manurial treatment. *European Journal of Soil Science*, 50, pp. 65-71.
- Embacher A., Zsolnay A., Gattinger A. et Munch J.C., 2007.** The dynamics of water extractable organic matter (WEOM) in common arable topsoils : I. Quantity, quality and function over a three year period. *Geoderma*, 10, pp. 1016
- Evans C.D., Monteith D.T. et Cooper D.M., 2005.** Long-term increases in surface water dissolved organic carbon: Observations, possible causes and environmental impacts
- Ewald M., Belin C., Berger P. et Weber J.H., 1983.** Corrected fluorescence spectra of fulvic acids isolated from soil and water, *Environmental Science and Technologie*, 17, pp. 201-504.
- Eyheraguibel B., Silvestre J. et Morard P., 2008.** Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology*, 99 (10), pp. 4206-4212.
- Feller C., 1979.** Une méthode de fractionnement granulométrique de la matière organique des sols. *Cahier ORSTOM, Série Pédologique*, XVII (4), pp. 339-346.
- Fengel D. et Wegener G., 1979.** Hydrolysis of polysaccharides with trifluoroacetic acid and its application to rapid wood and pulp analysis. *Hydrolysis of Cellulose : Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*, (181), pp. 145-158.
- Filley T.R., Minard R.D. et Hatcher P.G., 1999.** Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis : Proposed mechanisms based upon the application of ¹³C-labeled TMAH to a synthetic model lignin dimer. *Organic Geochemistry*, 30 (7), pp. 607-621.
- Frazier S.W., Nowack K.O., Goins K.M., Cannon F.S., Kaplan L.A. et Hatcher P.G., 2003.** Characterization of organic matter from natural waters using tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis GC-MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 70 (1), pp. 99-128.
- Freeman C., Evans C.D., Monteith C.D., Reynolds B. et Fenner N., 2001.** Export of organic carbon from peat soils. *Nature*, 412 (785).
- Frimmel F.H. et Abbt-Braun G., 1999.** Basic characterization of reference NOM from Central Europe - Similarities and differences. *Environment International*, 25 (2-3), pp. 191-207.
- Fröberg M., Berggren D., Bergkvist B., Bryant C. et Knicker H., 2003.** Contributions of Oi, Oe and Oa horizons to dissolved organic matter in forest floor leachates. *Geoderma*, 113 (3-4), pp. 311-322.

- Fröberg M., Berggren D., Bergkvist B., Bryant C. et Mulder J., 2004.** Concentration and fluxes of dissolved organic carbon (DOC) in three Norway spruce stands along a climatic gradient in Sweden. *Biogeochemistry*, 77 (1-23).
- Gadel F. et Bruchet A., 1987.** Application of pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry to the characterization of the humic substances resulting from decay of aquatic plants in sediments and waters. *Water Research*, 21 (10), pp. 1195-1206.
- Glazer A.W. et Nikaido H., 1995.** *Microbial Biotechnology : fundamentals of applied microbiology*. San Francisco : W.H. Freeman, pp. 340.
- Goh K.M. et Pullar W.A., 1977.** Radiocarbon dating techniques for tephra in central North Island, New Zealand. *Geoderma*, 18 (4), pp. 265-278.
- Goñi M. A. et Gardner L. R., 2003.** Seasonal dynamics in dissolved organic carbon concentrations in a coastal water-table aquifer at the forest-marsh interface. *Aquatic Geochemistry*, 9, pp. 209-232.
- González Pérez M., Martin-Neto L., Saab S.C., Novotny E.H., Milori D.M.B.P., Bagnato V.S., Colnago L.A., Melo W.J. et Knicker H., 2004.** Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. *Geoderma*, 118 (3-4), pp. 181-190.
- Greenwood P.F., Leenheer J.A., McIntyre C., Berwick L. et Franzmann P.D., 2006.** Bacterial biomarkers thermally released from dissolved organic matter. *Organic Geochemistry*, 37 (5), pp. 597-609.
- Gregorich E.G., Beare M.H., Stoklas U. Et St-Georges P., 2003.** Biodegradability of soluble organic matter in maize-cropped soils. *Geoderma*, 113, pp. 237-352.
- Griffith S.M. et Schnitzer M., 1975.** Analytical Characteristics of Humic and Fulvic Acids Extracted from Tropical Volcanic Soils. *Soil Science Society of America, Journal* 39, pp. 861-867.
- Grim R.E., 1968.** Atlas of electron microscopy of clay minerals and their admixtures. Elsevier, *Earth-Science Reviews*, 4(2), pp. A109-A110.
- Grinhut T., Hadar Y. et Chen Y., 2007.** Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi : processes and mechanisms. *Fungal Biology Reviews*, 21 (4), pp. 179-189.
- Guggenberger G., Kaiser K. et Zech W., 1998.** Organic colloids in forest soils: I. Biochemical mobilization in the forest floor. *Physical Chemical Earth*, 23, pp. 141-146.
- Guggenberger G. et Zech W., 1994.** Dissolved organic carbon in forest floor leachates: simple degradation products or humic substances. *The Science of The Total Environment*, 152 (1- 25), pp. 37-47.
- Hammond A.P., Goh K.M., Tonkin P.J. et Manning M.R., 1991.** Chemical pretreatments for improving the radiocarbon dates of peats and organic silts in a gley podzol environment : Grahams Terrace, North Westland. *New Zealand Journal of Geology & Geophysics*, 34 (2), pp. 191-194.
- Hatcher P.G., 1987.** Chemical structural studies of natural lignin by dipolar dephasing solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance. *Organic Geochemistry*, 11 (1), pp. 31-39.

- Haynes R.J., 2000.** Labile organic matter as an indicator of organic matter quality in arable and pastoral soils in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, pp. 211-219.
- Hedges J.I. et Ertel J.R., 1982.** Characterization of lignin by gas capillary Chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry*, 54, pp. 174-178.
- Her N., Amy G., Foss D. et Cho J., 2002.** Variations in molecular weight estimation by HP-size exclusion chromatography with UVA versus online DOC detection. *Environmental Science and Technology*, 36, pp. 3393-3399.
- Hernández D., Fernández J.M., Plaza C. et Polo A., 2007.** Water-soluble organic matter and biological activity of a degraded soil amended with pig slurry. *Science of The Total Environment*, 378 (1-2), pp. 101-103.
- Hessen D.O., Gjessing E.T., Knulst J. et Fjeld E., 1997.** TOC fluctuations in a humic lake as related to catchment acidification, season and climate. *Biogeochemistry*, 36 (1), pp. 139-151.
- Huber S.A. et Frimmel F.H., 1991.** Flow injection analysis of organic and inorganic carbon in the low-ppb range. *Analytical Chemistry*, 63 (19), pp. 2122-2130.
- Huguet A., Balmann H.R. et Parlanti E., 2009.** Fluorescence spectroscopy applied to the optimisation of a desalting step by electro dialysis for the characterisation of marine organic matter. *Journal of Membrane Science*, 326 (1), pp. 186-196.
- Hur J. et Schlautman M.A., 2004.** Influence of humic substance adsorptive fractionation on pyrene partitioning to dissolved and mineral-associated humic substances. *Environmental Science and Technology*, 38 (22), pp. 5871-5877.
- Hurrass J. et Schaumann G.E., 2005.** Is glassiness a common characteristic of soil organic matter? *Environmental Science and Technology*, 39 (24), pp. 9534-9540.
- Jaap S., Damsté S., Van Duin A.C.T., Hollander D., Kohnen M.E.L. et De Leeuw J.W., 1995.** Early diagenesis of bacteriohopanepolyol derivatives : Formation of fossil homohopanoïds. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59 (24), pp. 5141-5157.
- Janssens I.A., Freibauer A., Ciais P., Smith P., Nabuurs G.-J., Folberth G., Schlamadinger B., Hutjes R.W.A., Ceulemans R., Schulze E.D., Valentini R. et Dolman A.J., 2003.** Europe's terrestrial biosphere absorbs 7 to 12% of European anthropogenic CO₂ emissions. *Science*, 300 (5625), pp. 1538-1542.
- Jardine P.M., Weber N.L. et McCarthy J.F., 1989.** Mechanisms of dissolved organic carbon adsorption on soil. *Soil Science Society of America Journal*, 53 (5), pp. 1378-1385.
- Kaiser K. et Guggenberger G., 2000.** The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils. *Organic Geochemistry*, 31 (7-8), pp. 711-725.
- Kalbitz K., Geyer W. et Geyer S., 1999.** Spectroscopic properties of dissolved humic substances - A reflection of land use history in a fen area. *Biogeochemistry*, 47 (2), pp. 219-238.
- Kalbitz K., Schwesig D., Rethemeyer J., Matzner E., 2005.** Stabilization of dissolved organic matter by sorption to the mineral soil, 37, pp. 1319-1331.

- Kalbitz K., Solinger S., Park J.H., B. Michalzik B. et Matzner E., 2000.** Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils : A review. *Soil Science*, 165, pp. 277-304.
- Kang H., Freeman C., 1999.** Phosphatase and arylsulphatase activities in wetland soils: annual variation and controlling factors. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, pp. 449-454.
- Keil R.G. et Hedges J.I., 1995.** Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis. *Marine Chemistry*, 49 (2-3), pp. 81-115.
- Kennedy J., Billett M.F., Duthie D., Fraser A.R. et Harrison A.F., 1996.** Organic matter retention in an upland humic podzol; The effects of pH and solute type. *European Journal of Soil Science*, 47 (4), pp. 615-625.
- Khan M., Mostofa G., Yoshioka T., Konohira E. et Tanoue E., 2007.** Dynamics and characteristics of fluorescent dissolved organic matter in the groundwater, river and lake water. *Water Air soil Pollution*, 184, pp. 157-176.
- Klinkhammer G.P., Chin C.S., Wilson C., Rudnicki M.D. et German C. R., 1997.** Distribution of dissolved manganese and fluorescent dissolved organic matter in the Columbia River estuary and plume as determined by in situ measurement. *Marine Chemistry*, 56, pp. 1-14.
- Knicker H., 2000.** Biogenic nitrogen in soils as revealed by solid-state carbon-13 and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Environmental Quality*, 29 (3), pp. 715-723.
- Kogel I., Hempfling R., Zech W., Hatcher P.G. et Schulten H-R., 1988.** Chemical composition of the organic matter in forest soils : 1. Forest litter. *Soil Science*, 146 (2), pp. 124-136.
- Kogel-Knabner I., 1997.** ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. *Geoderma*, 80 (3-4), pp. 243-270.
- Kogel-Knabner I., 2002.** The macromolecular organic composition of Plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 34 (2), pp. 139-162.
- Kononova M.M., 1966.** *Soil Organic Matter, Its Nature, Its Role. Soil Formation and Soil Productivity*, 2nd Edition.
- Labouyrie-Rouillier L., 1997.** Extraction et caractérisation des matières organiques naturelles dissoutes d'eaux de surface : étude comparative des techniques de filtration membranaire et d'absorption sur résines macroporeuses non-ioniques, Thèse de doctorat, Université de Poitiers.
- Larré-Larrouy M.C., Albrecht A., Blanchart E., Chevallier T. et Feller C., 2003.** Carbon and monosaccharides of a tropical Vertisol under pasture and market-gardening : Distribution in primary organomineral separates. *Geoderma*, 117 (1-2), pp. 63-79.
- Larré-Larrouy M.C., Blanchart E., Albrecht A., Feller C., 2004.** Carbon and monosaccharides of a tropical Vertisol under pasture and market-gardening : Distribution in secondary organomineral separates. *Geoderma*, 119 (3-4), pp. 163-178.
- Larre-Larrouy M-C. et Feller C., 1997.** Determination of carbohydrates in two ferrallitic soils : Analysis by capillary gas chromatography after derivatization by silylation. *Soil Biology and Biochemistry*, 29 (9-10), pp. 1585-1589.

- Larson R.A., 1997.** Naturally occurring antioxidants, New York : Lewis Publishers.
- Leenheer J.A., Croue J.P., Benjamin M., Korshin G.V., Hwang C.J., Bruchet A. et Aiken G.R., 2000.** Comprehensive isolation of natural organic matter for spectral characterization and reactivity testing, In : Barrett S., Krasner S.W., Amy G.L. eds. Natural organic matter and disinfection by-products, American chemical society Symposium Series 761, Washington DC : American chemical Society, pp. 68-83.
- Leenheer J.A., Dotson A. et Westerhoff P., 2007.** Dissolved organic nitrogen fractionation. *Environmental Science*, 1, pp. 45-56.
- Leenheer J.A., Ferrer I., Furlong E.T. et Rostad C.E., 2003.** Charge characteristics and fragmentation of polycarboxylic acids by electrospray ionization-multistage tandem mass spectrometry. In Ferrer I., Thurman E.M. Eds, liquid chromatography/Mass spectrometry, MS/MS and time of flight MS, Analysis of Emerging contaminants. ACS Symposium Series 850, Washington DC : American Chemical Society, pp. 312-324.
- Leenheer J.A., Izbicki J.A. et Aiken G.R., 2005.** Characterization of organic matter in stormflow in the Santa Ana river and selected tributaries (2003-2004), Fountain Valley, CA, organic county water district, 2005.
- Leenheer J.A. et Rostad C.E., 2004.** Tannins and terpenoids as major precursors of Suwannee River fulvic acid, US Geological Survey scientific investigations report, 5276.
- Lehtonen T., Peuravuori J. et Pihlaja K., 2000.** Characterisation of lake-aquatic humic matter isolated with two different sorbing solid techniques : Tetramethylammonium hydroxide treatment and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 424 (1), pp. 91-103.
- Lichtfouse E., 2000.** Molecular fossils. Applications to microbiology, petroleum geochemistry, agronomy and environment [Fossiles moléculaires d'intérêt microbiologique, pétrolier, agronomique et environnemental]. *Actualité Chimique*, (4), pp. 5-19.
- Lowe L.E., 1978.** Chapter 2 Carbohydrates in Soil. *Developments in Soil Science*, 8, pp. 65-93.
- Lundquist E.J., Jackson L.E. et Scow K.M., 1999.** Wet-dry cycles affect dissolved organic carbon in two California Agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, pp. 1031-1038.
- MacCarthy P., 2001.** The principles of humic substances. *Soil Science*, 166, pp. 738-751.
- Malcolm R.L., 1989.** In proceedings of the Fifth international soil correlation meeting dealing with Spodosols, SCD-USDA publication, in press.
- Malcolm R.L. et MacCarthy P., 1992.** Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water. *Environment International*, 18 (6), pp. 597-607.
- Martin A. et Nolin M.C., 1991.** Étude Pédologique du Comté de Chambly (Québec). 1, Description et Interprétation des Unités Cartographiques.

- Martin B., 1995.** La matière organique naturelle dissoute des eaux de surface : fractionnement, caractérisation et réactivité. Thèse de doctorat, Université de Poitiers.
- Matlou M.C. et Haynes R.J., 2006.** Soluble organic matter and microbial C and N in soils under pasture and arable management and the leaching of organic C, N and nitrate in a lysimeter study. *Soil Ecology*.
- Marschner B. et Kalbitz K., 2003.** Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma*, 113 (3-4), pp. 211-235.
- Mauchien P., Remy B. et Verhaeghe I., 1990.** Real sample analysis by ETA-LEAFS with background correction. Application to gold determination in river water. *Applied Spectroscopy*, 44 (10), pp. 1633-1638.
- McDowell W.H. et Likens G.E., 1988.** Origin, composition, and flux of dissolved organic carbon in the Hubbard Brook Valley. *Ecology Monogr*, 58 (3), pp. 177-195.
- Michalzik B. et Matzner E., 1999.** Dynamics of dissolved organic nitrogen and carbon in a Central European Norway spruce ecosystem. *European Journal of Soil science*, 50, pp. 579-590.
- Mertens J., Vanderborcht J., Kasteel R., Puñtz T., Merckx R., Feyen J. et Smolders E., 2007.** Dissolved organic carbon fluxes under bare soil. *Journal of Environmental Quality*, 36 (2), pp. 597-606.
- Michel K. et Ludwig B., 2005.** Modelling of seepage water composition from experiments with an acid soil and a calcareous sediment. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 33 (6), pp. 595-604.
- Milori D.M.B.P., Martin-Neto L., Bayer C., Mielniczuk J. et Bagnato, V.S., 2002.** Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, 167 (11), pp. 739-749.
- Murayama S., 1984.** Changes in the monosaccharide composition during the decomposition of straws under field conditions. *Soil Science Plant Nutriment*, 30, pp. 367-381.
- Nadeau M-J., Grootes P.M., Schleicher M., Hasselberg P., Rieck A. et Bitterling M., 1998.** Sample throughput and data quality at the Leibniz-Labor AMS facility *Radiocarbon*, 40 (1), pp 239-245.
- Neff J.C. et Asner G.P., 2001.** Dissolved organic carbon in terrestrial ecosystems: Synthesis and a model. *Ecosystems*, 4 (1), pp. 29-48.
- Nelson P.N., Dictor M-C. et Soulas G., 1994.** Availability of organic carbon in soluble and particle-size fractions from a soil profile. *Soil Biology and Biochemistry*, 26 (11), pp. 1549-1555.
- Nierop K.G.J. et Buurman P., 1999.** Water-soluble organic matter in incipient podzols : Accumulation in B horizons or in fibres? *European Journal of Soil Science*, 50 (4), pp. 701-711.
- Nierop K.G.J, Van Lagen B. et Buurman P., 2001.** Composition of plant tissues and soil organic matter in the first stages of a vegetation succession. *Geoderma*, 100 (1-2), pp. 1-24.
- Nimz H.H., 1981.** The occurrence of non-cyclic benzyl ether bonds in lignin. *Wood Science and Technology*, 15 (4), pp. 311-316.

- Oades J.M., 1984.** Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant and Soil*, 76 (1-3), pp. 319-337.
- Oades J.M. et Wagner G.H., 1970.** Incorporation of ^{14}C into sugars in a soil incubated with ^{14}C glucose. *Geoderma*, 4 (4), pp. 417-423.
- Ohno T., Chen P., Jefts S.S., Mallory E. et McCormick E.K., 2004.** Sorption of crop residue-derived dissolved organic matter by soils and its effect on allelopathic expression. *Allelopathy Journal*, 14 (1), pp. 13-21.
- Ohno T., Griffin T.S., Liebman M. et Porter G.A., 2005.** Chemical characterization of soil phosphorus and organic matter in different cropping systems in Maine, U.S.A. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 105 (4), pp. 625-634.
- Page D.W., Van Leeuwen J.A., Spark K.M. et Mulcahy D.E., 2003.** Application of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry for characterisation of dissolved organic matter before and after alum treatment. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 67 (2), pp. 247-262.
- Perrin R.M.S., Willis E.H. et Hodge C.A.H., 1964.** Dating of humus podzols by residual radiocarbon activity. *Nature*, 202 (4928), pp. 165-166.
- Peterson M.L., Lang S.Q., Aufdenkampe A.K. et Hedges J.I., 2003.** Dissolved organic carbon measurement using a modified high-temperature combustion analyzer. *Marine Chemistry*, 81 (1-2), pp. 89-104.
- Preston C.M., 1992.** The application of NMR to organic matter inputs and processes in forest ecosystems of the Pacific Northwest. *Science of the Total Environment*, 113 (1-2), pp. 107-120.
- Preston C.M., Trofymow J.A., Sayer B.G. et Niu J., 1997.** ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy with cross-polarization and magic-angle spinning investigation of the proximate-analysis fractions used to assess litter quality in decomposition studies. *Canadian Journal Botanic*, 75, pp. 1601-1613.
- Prokushkin A.S., Kajimoto T., Prokushkin S.G., McDowell W.H., Abaimov A.P. et Matsuura Y., 2005.** Climatic factors influencing fluxes of dissolved organic carbon from the forest floor in a continuous-permafrost Siberian watershed. *Canadian journal of forest research*, 35, pp. 2130-2140.
- Qualls R.G., 2000.** Comparison of the behavior of soluble organic and inorganic nutrients in forest soils. *Forest Ecology and Management*, 138 (1-3), pp. 29-50.
- Repeta D.J., Tracy M., Quan, Lihini I., Aluwihare et Accardi A-M., 2002.** Chemical characterization of high molecular weight dissolved organic matter in fresh and marine waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66 (6), pp. 955-962.
- Robinson T., 1991.** The organic constituents of higher plants 6th Edition, North Amherst, MA : cordus Press.
- Römken P., Hoenderboom G. et Dolfing J., 1999.** Copper solution geochemistry in arable soils: Field observations and model application. *Journal of Environmental Quality*, 28 (3), pp. 776-783.

- Rumpel C. et Dignac M-F., 2006.** Gas chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profile: Analysis by gas chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis and reduction-acetylation. *Soil Biology and Biochemistry*, 38 (6), pp.1478-1481.
- Rumpel C., Kögel-Knabner I. et Bruhn F., 2002.** Vertical distribution, age, and chemical composition of organic carbon in two forest soils of different pedogenesis. *Organic Geochemistry*, 33 (10), pp. 1131-1142
- Saiz-Jimenez C., 1995.** The origin of alkylbenzenes and thiophenes in pyrolysates of geochemical samples. *Organic Geochemistry*, 23 (1), pp. 81-85.
- Saiz-Jimenez C. et de Leeuw J.W., 1984.** Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of isolated, synthetic and degraded lignins. *Organic Geochemistry*, 6 (C), pp. 417-422.
- Schaefer J. et Stejskal E.O., 1976.** Carbon-13 nuclear magnetic resonance of polymers spinning at the magic angle [11]. *Journal of the American Chemical Society*, 98 (4), pp. 1031-1032.
- Schnitzer M., 1982.** Organic matter characterization. In : *Methods of soil analysis, part 2 chemical and microbiological properties*, 2nd edition, MILLER R.H. et KEENEY D.R., (Ed.), Agronomy monograph N°9, Am. PSoc. of Agronomy, Madison, Wisconsin USA, pp. 581-593
- Schnitzer M. et Khan S.U., 1972.** The retention of hydrophobic organic compounds by humic acid *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 36 (7), pp. 745-754.
- Schnitzer M. et Neyroud J.A., 1975.** The alkaline hydrolysis of humic substances. *Geoderma*, 13 (3), pp.171-188.
- Schollenberger C.J.A., 1927.** Rapid approximate method for determining soil organic matter. *Soil science*, 24, pp. 65-68.
- Schulten H-R., 1987.** Pyrolysis and soft ionization mass spectrometry of aquatic/terrestrial humic substances and soils. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 12 (2), pp. 149-186.
- Schulten H-R. et Leinweber P., 1996.** Characterization of humic and soil particles by analytical pyrolysis and computer modeling. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 38 (1-2), pp. 1-53.
- Senesi N., Miano T.M., Provenzano M.R. et Brunetti G., 1991.** Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, 152 (4), pp. 259-271.
- Siemens J., Haas M. et Kaupenjohann M., 2003.** Dissolved organic matter induced denitrification in subsoils and aquifers? *Geoderma*, 113 (3-4), pp. 253-271.
- Sowden F.J. et Ivarson K.C., 1962.** Decomposition of forest litters - III. Changes in the carbohydrate constituents. *Plant and Soil*, 16 (3), pp. 389-400.
- Sposito G., 1984.** *The Surface Chemistry of Soils*. Oxford University, New York, pp. 234, Press.
- Sposito G., 1989.** *The Chemistry of Soils*. Oxford University, New York, pp. 277, Press.
- Steelink C., 1985.** Implications of elemental characteristics of humic substances. *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*, pp. 457-476.

- Stevenson F.J., 1982.** Humus chemistry: genesis, composition, reactions. , Wiley-Interscience, New York.
- Stuiver M. et Polach H.A., 1977.** Discussion: Reporting of ¹⁴C Data. Radiocarbon 19, no.3. pp. 355-363.
- Swincer G.D., Oades J.M. et Greenland D.J., 1969.** The Extraction, Characterization, And Significance Of Soil Polysaccharides. Advances in Agronomy, 21, pp. 195-235.
- Tegelaar E.W., Hollman G., Van Der Vegt P., De Leeuw J.W. et Holloway P.J., 1995.** Chemical characterization of the periderm tissue of some angiosperm species: recognition of an insoluble, non-hydrolyzable, aliphatic biomacromolecule (Suberan). Organic Geochemistry, 23 (3), pp. 239-251.
- Temminghoff E.J.M., Van Der Zee S.E.A.T.M. et De Haan F.A.M., 1998.** Effects of dissolved organic matter on the mobility of copper in a contaminated sandy soil. European Journal of Soil Science, 49 (4), pp. 617-628.
- Theng B.K.G., 1976.** Inorganic components. Volume 2 of soil components : J.E. Gieseking (Editor). Agro-Ecosystems, 2 (3), pp. 246-248.
- Thurman P.C., 1985.** Wastewater treatment plants. Landscape Architecture, 75 (6), pp. 52-54.
- Tipping E., Woof C., Rigg E., Harrison A.F., Ineson P., Taylor K., Benham D., Poskitt J., Rowland A.P., Bol R. et Harkness D.D., 1999.** Climatic influence on the leaching of dissolved organic matter from upland UK moorland soils, investigated by a field manipulation experience. Environmental International, 25 (1), pp. 83-95.
- Traversa A., D’Orazio V. et Senesi N., 2008.** Properties of dissolved organic matter in forest soils: Influence of different plant covering. Forest Ecology and Management, 256 (12), pp. 2018-2028.
- Trudgill P.W., 1984.** Microbial degradation of the alicyclic ring : Structural relationships and metabolic pathways, In : Gibson, DT ed. Microbial degradation of organic compounds. New York : Dekker, pp. 131-180.
- Ussiri D.A.N. et Johnson C.E., 2002.** Sorption of Organic Carbon Fractions by Spodosol Mineral Horizons. Soil Science Society of America Journal, 68 (1), pp. 253-262.
- Vance G.F. et David M.B., 1989.** Effect of acid treatment on the leachate chemistry of a New England spodosol: importance of the B horizon on dissolved organic carbon retention. Soil Science Society of America Journal, 53, pp. 1242-1247.
- Van der Heijden E. et Boon J.J., 1994.** A combined pyrolysis mass spectrometric and light microscopic study of peatified Calluna wood isolated from raised bog peat deposits. Organic Geochemistry, 22 (6), pp. 903-919.
- Vanhala P., Karhu K., Tuomi M., Bjorklof K., Fritze H. et Liski J., 2008.** Temperature sensitivity of soil organic matter decomposition in southern and northern areas of the boreal forest zone. Soil Biology and Biochemistry, 40 (7), pp. 1758-1764.

- Van Heemst J.D.H., Van Bergen P.F., Stankiewicz B.A. et De Leeuw J.W., 1999.** Multiple sources of alkylphenols produced upon pyrolysis of DOM, POM and recent sediments. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 52 (2), pp. 239-256.
- Vartiainen T., Liimatainen A. et Kauranen P., 1987.** The use of TSK size exclusion columns in determination of the quality and quantity of humus in raw waters and drinking waters. *Science of the Total Environment*, Vol. 62, pp. 75-84.
- Wang Y.P. et Polglase P.J., 1995.** Carbon balance in the tundra, boreal forest and humid tropical forest during climate change: scaling up from leaf physiology and soil carbon dynamics. *Plant, Cell & Environment*, 18 (10), pp. 1226-1244.
- Walkley A. et Black A., 1934.** An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and propose modification of the chromic acid titration method. *Soil science*, 37, pp. 29-38.
- Wershaw R.L., Leenheer J.A. et Kennedy K.R., 1998.** Use of ^{13}C -NMR and FTIR for elucidation of degradation pathways during senescence and litter decomposition of aspen leaves, characterization of leachate from different type of leaves. In Ghabbour, EA, Davies G, eds. *Understanding humic substances : Advanced methods, properties and applications* : Cambridge royal society of chemistry, pp. 47-60.
- Wershaw R.L., Leenheer J.A. et Kennedy K.R., 1999.** Use of ^{13}C -NMR and FTIR for elucidation of degradation pathways during senescence and litter decomposition of aspen leaves, characterization of leachate from different type of leaves. In Ghabbour, EA, Davies G, eds. *Understanding humic substances : Advanced methods, properties and applications* : Cambridge royal society of chemistry, pp. 19-30.
- White A., Handler P. et Smith E.L., 1964.** *Principles of biochemistry*, 3rd ed, New York : McGraw-Hill.
- Wilson Henry F. et Xenopoulos Marguerite A., 2008.** Ecosystem and Seasonal Control of Stream Dissolved Organic Carbon along a Gradient of Land Use. *Ecosystems*, 11, pp. 555-568.
- Wilson M.A., Vassallo A.M., Perdue E.M. et Reuter J.H., 1987.** Compositional and solid-state nuclear magnetic resonance study of humic and fulvic acid fractions of soil organic matter. *Analytical Chemistry*, 59 (4), pp. 551-558.
- Wilson K.P. et Williams D.D., 2006.** Response of dissolved organic carbon in a shallow groundwater ecosystem to a simulated global warming experience. *Geo-environment and Landscape Evolution II*, pp. 163-173.
- Wilson M.A. et Hatcher P.G., 1988.** Detection of tannins in modern and fossil barks and in plant residues by high-resolution solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Organic Geochemistry*, 12 (6), pp. 539-546.
- Zhou L.X. et Wong J.W.C., 2000.** Microbial decomposition of dissolved organic matter and its control during sorption experiment. *Journal Environmental Quality*, 29(6), pp. 1852-1856.
- Zsolnay A., 2003.** Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions. *Geoderma*, 113, pp. 187-209.

Zsolnay A., Baigar E., Jimenez M., Steinweg B. et Saccomandi F., 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere*, 38 (1), pp. 45-50.

Zsolnay A. et Görlitz H., 1994. Water extractable organic matter in arable soils: effects of drought and long-term fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, pp. 1257-1261.