

## Influence des méthodes d'extraction et de purification sur la nature des acides humiques de la cédraie au Petit Lubéron

R. NÈGRE\*, Cl. GHIGLIONE\*\*, T. PUGNET\*\*\*  
et M. GIRAUD\*\*\*

\* *Professeur, Laboratoire de Taxinomie  
et Ecologie végétales, Faculté des Sciences  
de Saint-Jérôme, Marseille*

\*\* *Professeur, Laboratoire de Chimie Organique,  
Faculté de Pharmacie de Marseille*

\*\*\* *Maître-Assistant, Laboratoire de Chimie Organique,  
Faculté de Pharmacie de Marseille*

### RÉSUMÉ

Le matériel humique de différents horizons de litières et de sols de deux cédraies (âgées respectivement de 20 et de 100 ans) a été extrait par la solution 0,1 N de soude ou par la solution 0,1 M de pyrophosphate de sodium. Les substances organiques ont été purifiées par précipitation en milieu chlorhydrique (acides humiques : AH) et par dialyse (composés non dialysables : CND). La filtration sur gel de Séphadex G-25 suivie par la détermination des absorptions à 280 nm montre la présence de deux fractions (une lourde A et une légère B) dans les AH et seulement d'une fraction A dans les CND. La composition en amino-acides des fractions protéiques liées aux AH et aux CND, montre que pour chaque échantillon, les AH et les CND diffèrent selon le procédé d'extraction et de purification. Nos résultats montrent que le plus haut rendement d'extraction est obtenu dans le cas des horizons supérieurs de sol par l'utilisation de la solution pyrophosphorique alors que la solution de soude donne de meilleurs résultats pour les horizons de litière. La comparaison de nos résultats est discutée en rapport avec le problème relatif aux acides humiques et aux acides fulviques.

### ABSTRACT

Humic material has been extracted from different litters and soils of the upper horizons of two Cedrus forests (20 years and 100 years old respectively) by 0,1 N NaOH and 0,1 M Na pyrophosphate. Organic substances have been purified by HCl precipitation (Humic acids: AH) and by dialysis (non dialysing compounds: CND). Gel filtration analysis on Sephadex G-25 with absorbancy measurement at 280 nm revealed that two fractions (heavy A and light B) were present in AH and only subfraction A was present in NDC. Amino acid composition of HA and NDC linked proteins have indicated, for each sample, that AH and CND were different, as expected from and purification procedure. This investigation suggested that a high yield could be obtained by pyrophosphoric extraction for soil samples and by NaOH extraction for litter horizons. The comparison of results is discussed in relation with the problem of humic acids and fulvic acids.

## SOMMAIRE

## INTRODUCTION

1. RENDEMENT DES MÉTHODES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES ACIDES HUMIQUES
2. FILTRATIONS MOLÉCULAIRES SUR GEL DE SEPHADEX G. 25
3. COMPOSITION EN AMINO-ACIDES
  - 3.1. Teneurs globales
  - 3.2. Teneurs élémentaires
  - 3.3. Comparaison entre cédraie jeune et cédraie âgée
4. CONCLUSIONS
5. BIBLIOGRAPHIE

Pendant l'étude de l'influence que le cèdre de l'Atlas, introduit au Petit-Luberon aux environs de 1874, pouvait avoir, cent ans après l'introduction, sur les milieux naturels, une particulière attention a été réservée aux litières de cédraies jeunes et âgées.

Les publications consacrées pendant la dernière décennie aux analyses de litières (*cf. bibl. importante dans Bruckert et al., 1971 ; Gloaguen et al., 1974 ; Rapp, 1971 ; Ulrich et al., 1973*) permettaient de conclure qu'un début d'humification se produisait non seulement au cours de la maturation des feuilles sur l'arbre même, mais également dans les pluviocissivats écoulés et égouttés, tout autant qu'au cours du vieillissement des litières. On pouvait donc se demander s'il était possible d'appliquer aux litières les procédés d'extraction de la matière humique d'ordinaire employés pour les sols, et spécialement le traitement par les solutions de soude et de pyrophosphate de sodium (Duchaufour, 1965 ; Dabin, 1971 ; Dabin, 1977). Il convenait aussi d'examiner, parce que cela n'avait jamais encore été fait d'une manière rigoureuse et parce que les remarques de divers auteurs (Dommergues et Mangenot, 1970 p.e.)

LF : litière brute sous la cédraie ;

Lf<sub>1</sub> : partie supérieure de la litière stratifiée, déjà riche en mycélium sur quelques centimètres ;

Lf<sub>2</sub> : partie inférieure fibreuse de la litière stratifiée, comportant un feutrage de mycélium ;

AC : horizon organo-minéral sous végétation jeune ;

A<sub>1</sub>C et A<sub>2</sub>C : horizons organo-minéral et minéral sous la cédraie âgée ;

ACT : horizon organo-minéral du sol témoin sous pelouse claire à brome.

laissaient supposer que les résultats variaient avec les techniques d'analyse utilisées, la valeur des méthodes de purification soit par précipitation en milieu acide, soit par dialyse, des produits humiques isolés. Cette recherche a porté sur les mêmes échantillons que ceux des précédentes publications consacrées au même sujet (Nègre, Ghiglione *et al.*, 1972). Pour les litières, ont été examinés : LF, Lf<sub>1</sub>, Lf<sub>2</sub> des cédraies jeunes et Lf<sub>1</sub> et Lf<sub>2</sub> des cédraies âgées et pour les horizons minéraux : AC en cédraies jeunes, A<sub>1</sub>C et A<sub>2</sub>C en cédraies âgées et AC pour le témoin (ACT), choisi sous une pelouse à brome.

Pour ce type de travail, c'est évident, l'élimination de la matière fraîche (Duchaufour et Jacquin, 1966) contenue dans les horizons minéraux non seulement ne s'imposait pas, mais encore il était nécessaire de la conserver, d'une part pour comparer les litières entre elles, et d'autre part, parce que l'influence du cèdre se manifeste puissamment dans le sol par la présence d'une foule de petites racines mortes tout autant que par leurs produits d'excrétion : seule la matière organique totale a donc été prise en considération.

La valeur des méthodes d'extraction de la matière humique a été étudiée des deux points de vue quantitatif et qualitatif ; ont été envisagés successivement : le rendement des méthodes d'extraction et de purification des acides humiques, la nature des produits ainsi isolés. Les conclusions traitent d'une part de l'humification globale en cédraie, d'autre part des aspects techniques et fondamentaux de l'étude.

## 1. RENDEMENT DES MÉTHODES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES ACIDES HUMIQUES

Dans un premier temps, la matière organique de nos échantillons a été extraite par la solution 0,1 N de soude et par la solution 0,1 M de pyrophosphate de sodium (1 g d'échantillon pour 10 ml de solution d'extraction, agitation 12 h). Le rendement de la solubilisation de la matière organique a été apprécié par dosage du carbone (méthode de Anne) passé en solution (C. soluble). Classiquement, on admet que les acides humiques constituent la fraction du matériel organique soluble dans les liqueurs alcalines mais insoluble en milieu acide, alors que les acides fulviques sont solubles à la fois en milieu alcalin et en milieu acide. Les uns et les autres

contiennent des noyaux aromatiques, des carbones aliphatiques, des hydroxyles et de l'azote ; mais les acides fulviques sont plus riches en carbones aliphatiques, plus pauvres en noyaux aromatiques et en hydroxyles. Depuis les travaux de Laatch (1948), Kononova et Belchikova (1960), Seidel (1966) on sait que ces deux types d'acides semblent ne constituer que deux groupes d'éléments au sein d'un même ensemble.

De même on sait que la dialyse des solutions (à l'aide d'un sac à dialyse Visking à pores de 24 A) permet d'éliminer les composés de poids moléculaires les plus faibles. Il a été également admis que les produits isolés étaient les acides humiques. Au cours de la dialyse, il semblerait en effet suivant plusieurs auteurs (en particulier Martin-Martinez, 1967) que les acides fulviques se transforment en acides humiques avec baisse de la teneur en carboxyles et du nombre des chaînes latérales, et augmentation corrélatrice de la teneur en hydroxyles et du nombre de noyaux aromatiques.

Devant ces conclusions, tirées d'analyses portant chaque fois sur des matériels différents, il a paru utile de conduire un protocole comparable de tous les points de vue sur un même matériel. Aussi les quantités de carbone correspondant au matériel organique précipitable en milieu acide (C. acides humiques) et les quantités de carbone correspondant aux composés non dialysables (C. non dialysable) de ces liqueurs, ont-elles été d'abord déterminées.

Les résultats exprimés en g de carbone pour 100 g d'échantillon sec, sont présentés sous forme de graphiques dans la figure 1.

On constate que :

— Pour les horizons de litières, la solution de soude extrait plus de matériel organique que la solution de pyrophosphate. Par contre, pour les horizons minéraux de la cédraie âgée et pour le ACT, la solution de soude solubilise moins de composés organiques que la solution pyrophosphorique. C'est seulement pour l'horizon AC de la cédraie jeune que la solution de soude a un pouvoir de dissolution supérieur à la solution de pyrophosphate.

— En ce qui concerne les acides humiques, en litières de cédraie âgée (Lf<sub>1</sub> et Lf<sub>2</sub>) et en LF et Lf<sub>2</sub> de la cédraie jeune, la solution de soude permet de séparer plus de constituants que la solution pyrophosphorique. Pour tous les autres horizons, c'est la solution de pyrophosphate qui permet une meilleure solubilisation.

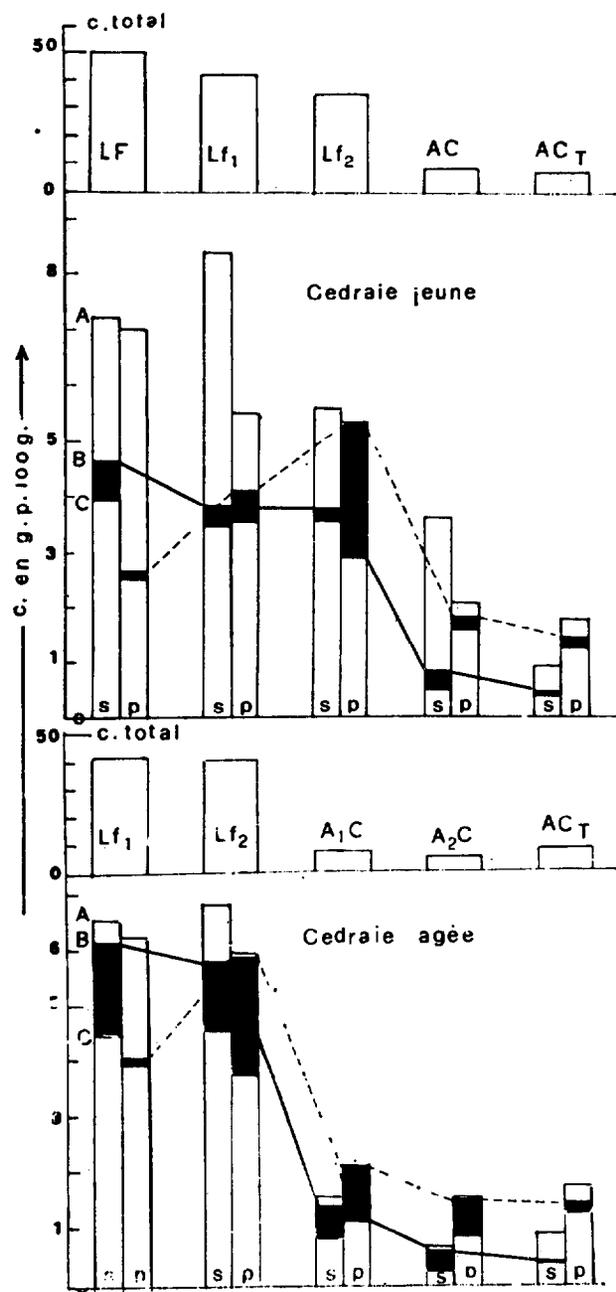


FIG. 1. — Carbone total, carbone extractible, carbone des acides humiques et carbone des composés non dialysables dans les différents horizons de cédraie jeune et de cédraie âgée par extraction au moyen de la solution de soude (s) et de la solution de pyrophosphate (p). (OA : carbone extractible - OB : carbone des composés non dialysables - OC : carbone des acides humiques) (pour les diverses valeurs, cf. tableau IV).

— La solution de soude contient plus de composés non dialysables en LF de la cédraie jeune et en Lf<sub>1</sub> et Lf<sub>2</sub> de la cédraie âgée que la solution pyrophosphorique.

— Si on considère les proportions entre acides humiques (OC) et composés non dialysables (OB) on note qu'après extraction à la soude, la différence (B-C) entre la quantité obtenue par les deux types de purification est plus élevée en Lf<sub>1</sub> et Lf<sub>2</sub> de la cédraie âgée que pour tous les autres échantillons. Lorsque l'extraction est réalisée au moyen de la solution de pyrophosphate, cette différence est consi-

dérablement plus grande en Lf<sub>2</sub> des deux litières que dans tous les autres cas.

Afin de mieux préciser ces données, ont été calculés tout d'abord les rendements d'extraction des deux solutions par rapport à la matière organique totale des échantillons (100 × C soluble/C total), puis les rendements d'extraction des acides humiques par rapport au matériel organique soluble (100 × C. ac. hum./C. sol.) et, enfin, les rendements en matériel organique non dialysable rapportés au matériel organique soluble (100 × C. non dial./C. sol.). L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau I.

TABLEAU I

Rendement de l'extraction du matériel organique solubilisé dans les solutions 0,1 N de soude et 0,1 M de pyrophosphate, précipitable et non-dialysable présent dans les deux solutions (cf. également fig. 1 et tableau IV)

	Cédraie jeune				Cédraie âgée				Témoin
	LF	Lf <sub>1</sub>	Lf <sub>2</sub>	AC	Lf <sub>1</sub>	Lf <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> C	A <sub>2</sub> C	AC
C. total (g/100 g) .....	50	42	35	8,3	41,5	40,3	6,9	4,7	7,1
C. soluble (% du C. total)									
ext. pyrophosphate .....	14,0	13,0	15,0	25,0	15,0	15,0	32,0	34,0	25,0
ext. soude .....	14,5	20,0	16,0	43,0	16,0	17,0	23,0	15,0	13,0
C. acides humiques (en % du C. soluble)									
ext. pyrophosphate .....	37,0	64,0	54,0	77,0	63,0	63,0	54,0	56,0	80,0
ext. soude .....	60,0	40,0	56,0	14,0	68,0	66,0	56,0	36,0	50,0
C. non dialysable (en % du C. soluble)									
ext. pyrophosphate .....	36,0	75,0	99,0	83,0	65,0	99,0	99,0	99,0	85,0
ext. soude .....	71,0	45,0	66,0	22,0	94,0	90,0	90,0	99,0	99,0

On voit que, compte tenu des erreurs expérimentales et pour les divers horizons de litières, les deux réactifs permettent de solubiliser des proportions très voisines de matériel organique (environ 15 à 20 % de la matière organique totale); pour les horizons minéraux et à l'exception du AC de la cédraie jeune, la solution de pyrophosphate se montre bien plus efficace que la solution de soude puisqu'elle solubilise de 25 à 35 % de la matière organique des échantillons contre 13 à 23 % pour la soude.

On constate également que pour les horizons de litières (sauf Lf<sub>1</sub> de la cédraie jeune), la solution

de soude extrait proportionnellement plus d'acides humiques que la solution pyrophosphorique. Au contraire, pour les horizons minéraux, elle en extrait moins (sauf pour A<sub>1</sub>C de la cédraie âgée pour laquelle les rendements d'extraction sont voisins).

Enfin, la solution pyrophosphorique extrait proportionnellement plus de matériel non dialysable que la soude — sauf en LF de la cédraie jeune. En cédraie âgée, soude et pyrophosphate extraient autant l'un que l'autre, à partir de tous les horizons, sauf en Lf<sub>1</sub> où la solution sodique se montre plus active. Aux erreurs expérimentales près, et sauf

pour les horizons LF de la cédraie jeune et Lf<sub>1</sub> des deux cédraies, le carbone solubilisé par le pyrophosphate se retrouve quantitativement en totalité dans les solutions de dialyse.

Après avoir précisé, du point de vue du rendement, la valeur des deux procédés d'extraction et de purification, il convenait de savoir si ceux-ci conduisaient à un matériel humique comparable. Pour ce faire, les extraits ont été soumis à la filtration moléculaire sur gel de Sephadex d'une part, et, d'autre part, après leur hydrolyse acide, ont été déterminées leurs compositions en amino-acides.

## 2. FILTRATIONS MOLÉCULAIRES SUR GEL DE SEPHADEX G-25

Après examen des divers gels (G-25, G-50, G-75, G-100), le Sephadex G-25 est apparu comme le plus convenable pour ce type de recherche. Les solutions d'acides humiques, après précipitation en milieu acide des extraits alcalins et resolubilisation par la solution N de soude, ont donc été soumises à la filtration moléculaire, ainsi que les produits dialysés. La séparation s'est effectuée sur colonne de 40 cm de long et 10 mm de diamètre, le solvant de migration étant l'eau distillée ; celle-ci a été préférée aux solutions salines parce qu'elle ne provoque pas l'adsorption de produits humiques sur les particules de gel, comme Lindqvist (1968) l'avait déjà indiqué. L'analyse des effluents a été obtenue en continu au moyen d'un détecteur LKB (absorption à 280 nm) et les réponses enregistrées. Cette méthode analytique permet d'apprécier non seulement la grosseur des molécules mais également les teneurs en structures aromatiques des fractions isolées.

La figure 2 illustre les schémas de séparation obtenus pour la cédraie jeune.

La filtration moléculaire des acides humiques isolés par précipitation en milieu acide met dans tous les cas en évidence deux groupes de constituants : une fraction lourde A et une fraction légère B. Par contre, les produits dialysés ne contiennent, quels que soient la solution d'extraction et l'échantillon, qu'une fraction lourde A. Cette fraction lourde A, ajoutée à une quantité aliquote d'acides humiques isolés par précipitation et soumise à la filtration moléculaire, se comporte comme la fraction lourde des acides humiques : elle peut donc être assimilée à cette dernière.

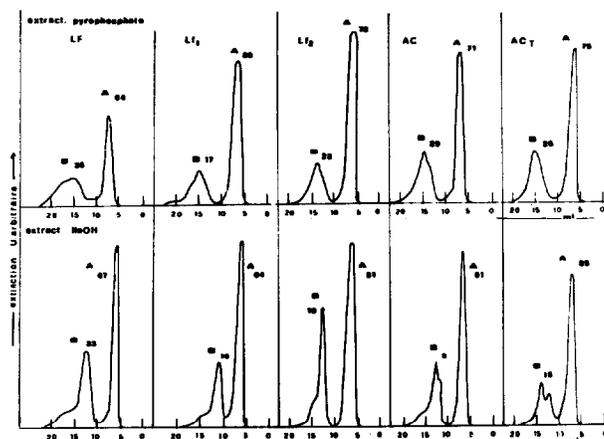


FIG. 2. — Schéma de sfiltrations moléculaires sur gel de Sephadex G-25 des acides humiques extraits par la solution 0,1N de soude et la solution 0,1M de pyrophosphate.

Or, on l'a vu ci-dessus (1, p. 339), cette fraction lourde contenue dans les produits de dialyse représente la totalité du carbone extrait. Cette remarque autorise trois hypothèses : ou bien, au cours de la dialyse, toutes les petites molécules se polymérisent et les acides fulviques se transforment spontanément en acides humiques, ou bien les molécules d'acides fulviques sont trop grosses pour pouvoir dialyser ou bien la précipitation acide scinde artificiellement

TABLEAU II

Comparaison entre les teneurs en fractions lourdes A et fractions légères B contenues dans les acides humiques extraits par la solution de pyrophosphate et la solution de soude [absorption (en % de D.O. à 280 nm) multipliée par la quantité de carbone (g) contenu dans l'échantillon]

Cédraie jeune	LF	Lf <sub>1</sub>	Lf <sub>2</sub>	AC	ACT
<b>Pyrophosphate</b>					
fraction A	64	83	78	71	75
fraction B	36	17	22	29	25
<b>Soude</b>					
fraction A	67	84	81	91	85
fraction B	33	16	19	9	15
<b>Cédraie âgée</b>					
	Lf <sub>1</sub>	Lf <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> C	A <sub>2</sub> C	ACT
<b>Pyrophosphate</b>					
fraction A	72	76	81	78	75
fraction B	28	24	19	22	25
<b>Soude</b>					
fraction A	71	66	79	92	85
fraction B	29	32	21	8	15

les grosses molécules en trois fractions A, B, acides fulviques. Dans les trois cas, s'impose la grande affinité physico-chimique de ce qu'il est convenu de nommer acides fulviques et acides humiques — ce qui était déjà connu — et l'idée que le processus de purification peut modifier la nature des produits finalement obtenus — ce qui est nouveau.

Le tableau II rassemble, pour les deux cédraies, les résultats relatifs aux teneurs en fraction A et B, par rapport à l'absorption totale de l'échantillon considéré (A + B).

Pour les deux cédraies et pour les horizons holorganiques, la proportion fraction A/fraction B est grossièrement identique quelle que soit la liqueur d'extraction. Pour les horizons minéraux, la soude fournit plus de fraction A que le pyrophosphate. Cependant, comme les rendements d'extraction ne sont pas les mêmes (on l'a souligné précédemment), il a paru logique de calculer des quantités en unités arbitraires et en fonction des différents éléments. Ces données sont rassemblées dans le tableau III.

L'examen de ces résultats montre, qu'en première approximation et compte tenu des erreurs expérimentales, la solution de soude extrait des divers horizons

holorganiques des deux cédraies autant de fraction A et de fraction B que la solution de pyrophosphate. Par contre, pour les horizons minéraux, la soude

TABLEAU III

Teneurs des acides humiques en fractions A et en fractions B. Extraction par la solution 0,1 N de soude et la solution 0,1 M de pyrophosphate (en unités arbitraires: densités optiques rapportées à la quantité d'acides humiques, exprimée en gramme de C, contenue dans 100 g d'échantillon analysé)

<i>Cédraie jeune</i> .....	LF	Lf <sub>1</sub>	Lf <sub>2</sub>	AC	—	ACT
<i>Pyrophosphate</i>						
fraction A .....	166	290	222	114	—	107
fraction B .....	93	60	62	46	—	35
<i>Soude</i>						
fraction A .....	291	282	254	46	—	75
fraction B .....	144	54	60	4	—	14
<i>Cédraie âgée</i> .....	—	Lf <sub>1</sub>	Lf <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> C	A <sub>2</sub> C	ACT
<i>Pyrophosphate</i>						
fraction A .....	—	282	290	96	70	107
fraction B .....	—	110	91	23	20	35
<i>Soude</i>						
fraction A .....	—	300	272	98	52	75
fraction B .....	—	123	128	26	5	14

TABLEAU IV

Teneurs en amino-acides totaux (en mEq/100 g d'échantillon sec) et en carbone (en g/100 g d'échantillon sec) et teneur en amino-acides (en mEq/g de carbone) des acides humiques et des composés non dialysables des horizons de cédraie jeune, de cédraie âgée et de témoin, après extraction par la solution 0,1 N de soude et 0,1 M de pyrophosphate (cf. également fig. 1)

	Cédraie jeune				Cédraie âgée				Témoin AC
	LF	Lf <sub>1</sub>	Lf <sub>2</sub>	AC	Lf <sub>1</sub>	Lf <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> C	A <sub>2</sub> C	
<b>EXTRACTION SOUDE</b>									
<i>Acides humiques</i>									
A. aminés (mEq/100 g) .....	3,33	3,24	3,06	0,40	2,50	5,18	1,36	0,70	0,61
Carbone (g/100 g) .....	3,90	3,40	3,50	0,40	4,50	4,60	0,90	0,25	0,46
A.A. (mEq/g de C) .....	0,85	0,95	0,87	1,00	0,56	1,13	1,51	2,80	1,33
<i>Composés non dialysables</i>									
A. aminés (mEq/100 g) .....	4,20	5,12	5,15	3,64	5,02	10,90	2,40	0,94	0,94
Carbone (g/100 g) .....	4,60	3,80	3,70	0,80	6,20	5,90	1,44	0,70	0,46
A.A. (mEq/g de C) .....	0,91	1,35	1,39	4,55	0,81	1,85	1,66	1,34	2,04
<b>EXTRACTION PYROPHOSPHATE</b>									
<i>Acides humiques</i>									
A. aminés (mEq/100 g) .....	1,07	1,75	2,21	1,27	0,87	1,89	0,57	0,29	0,63
Carbone (g/100 g) .....	2,60	3,50	2,90	1,60	4,0	3,80	1,20	0,90	1,40
A.A. (mEq/g de C) .....	0,41	0,50	0,76	0,79	0,22	0,50	0,48	0,32	0,45
<i>Composés non dialysables</i>									
A. aminés (mEq/100 g) .....	1,74	3,34	3,06	1,96	3,36	4,68	1,94	1,10	1,63
Carbone (g/100 g) .....	2,50	4,10	5,30	1,75	4,10	5,90	2,20	1,60	1,50
A.A. (mEq/g de C) .....	0,70	0,81	0,58	1,12	0,82	0,84	0,88	0,69	1,09

extrait beaucoup moins des deux fractions que le pyrophosphate, sauf pour l'horizon A<sub>1</sub>C de la cédraie âgée où les deux solvants produisent des résultats sensiblement identiques.

De ce point de vue, et pour les horizons minéraux, il apparaît que soude et pyrophosphate extraient des composés humiques de nature aromatique différente.

TABLEAU V

Composition en acides aminés (résidus pour 1 000 résidus) des acides humiques et des composés non dialysables extraits par la soude (S) et le pyrophosphate (P) des horizons du sol de la cédraie jeune

	LF				Lf <sub>1</sub>			
	Acides humiques		Comp. non dial.		Acides humiques		Comp. non dial.	
	S	P	S	P	S	P	S	P
Acide aspartique .....	112	133	119	134	123	131	128	130
Thréonine .....	60	61	60	65	64	59	66	64
Sérine .....	59	71	70	71	55	42	76	59
Acide glutamique .....	122	115	148	122	124	122	134	123
Proline .....	47	56	60	53	50	57	62	53
Glycine .....	118	123	116	143	129	140	132	164
Alanine .....	90	99	90	90	96	101	88	98
Valine .....	75	76	70	70	75	80	68	68
1/2 Cystine .....	6	—	—	—	tr	—	—	—
Méthionine .....	7	4	3	—	tr	—	3	—
Iso-Leucine .....	58	59	52	50	54	59	51	49
Leucine .....	85	89	74	67	79	83	66	58
Tyrosine .....	22	—	24	21	14	—	15	14
Phénylalanine .....	42	50	37	34	37	38	28	28
Lysine .....	40	38	33	33	47	46	38	38
Histidine .....	17	17	14	22	18	20	16	22
Arginine .....	40	25	30	25	35	22	29	32
	Lf <sub>2</sub>				AC			
	Acides humiques		Comp. non dial.		Acides humiques		Comp. non dial.	
	S	P	S	P	S	P	S	P
Acide aspartique .....	138	147	160	145	178	231	264	258
Thréonine .....	69	69	76	65	63	47	57	44
Sérine .....	64	59	74	63	48	37	51	44
Acide glutamique .....	118	123	115	117	127	144	145	158
Proline .....	49	54	57	50	43	35	42	31
Glycine .....	137	163	136	174	130	153	120	148
Alanine .....	98	94	90	97	92	91	87	84
Valine .....	79	76	72	65	78	77	61	67
1/2 Cystine .....	6	—	—	—	tr	—	—	—
Méthionine .....	4	—	—	—	tr	—	—	—
Iso-Leucine .....	47	45	53	48	46	37	40	30
Leucine .....	66	61	55	49	62	50	44	34
Tyrosine .....	9	—	12	10	12	—	11	5
Phénylalanine .....	32	32	25	24	31	24	17	14
Lysine .....	41	47	36	42	44	53	40	47
Histidine .....	15	19	14	22	14	9	17	11
Arginine .....	28	10	22	29	32	14	11	25

### 3. COMPOSITION EN AMINO-ACIDES

Après avoir isolé à l'état sec les acides humiques résultant des deux modes d'extraction et les composés non dialysables correspondants leurs compositions en amino-acides totaux ont été déterminées. Après hydrolyse chlorhydrique (HCl 6 N en tube scellé pendant 18 h) et les hydrolysats ayant été débarrassés de l'acide chlorhydrique, les produits ont été chromatographiés (Auto-Analyseur Technicon).

#### 3.1. Teneurs globales

On constate que, par rapport à 100 g d'échantillon, on trouve toujours plus d'acides aminés totaux dans les composés non dialysables que dans les acides humiques vrais, quelle que soit la solution d'extraction et que, sauf pour l'horizon A<sub>2</sub>C de la cédraie âgée (extraction soude) et Lf<sub>2</sub> cédraie jeune (extraction pyrophosphate), la quantité d'acides aminés rapportée à 1 g de carbone est toujours plus grande dans les composés non dialysables que dans les acides humiques.

#### 3.2. Teneurs élémentaires

Ces résultats globaux obtenus, il était nécessaire de savoir si les proportions des divers acides aminés entrant dans ces quantités globales étaient ou non identiques suivant d'une part les solutions d'extraction, d'autre part les procédés de purification utilisés. Les tableaux V à VII ci-dessous rassemblent les résultats obtenus.

De ces tableaux, on peut tirer les conclusions suivantes.

#### CÉDRAIE JEUNE

*Acides humiques* : les acides humiques extraits de tous les horizons par le pyrophosphate contiennent une proportion plus grande d'acide aspartique et de glycine que ceux extraits par la soude ; les teneurs en acide glutamique sont sensiblement égales pour les deux types d'extraction pour les horizons supérieurs, alors qu'elles sont plus élevées avec le pyrophosphate dans l'horizon minéral. L'arginine est en proportion supérieure dans les acides humiques

isolés par la soude dans tous les cas. Il n'y a pas de reste tyrosine dans les constituants des acides humiques extraits par le pyrophosphate alors qu'il y en a dans ceux extraits par la soude.

*Composés non dialysés* : il n'existe pas de règle en ce qui concerne les teneurs en acide aspartique. Les composés extraits par la soude contiennent une proportion d'acide glutamique plus grande que celle des composés extraits par le pyrophosphate. La glycine est plus abondante quand l'extraction est faite avec ce dernier réactif. Les teneurs en arginine et en tyrosine sont voisines pour les deux types d'extraits sauf pour l'horizon minéral où l'extraction par la soude conduit à des substances plus riches.

#### CÉDRAIE ÂGÉE

*Acides humiques* : les acides aspartique et glutamique sont en proportion quasiment identiques pour les acides humiques extraits par la soude et par le pyrophosphate, sauf pour les horizons A<sub>2</sub>C et ACT où le pyrophosphate conduit à des composés plus riches en acide dicarboxylique que ceux extraits par la soude. La glycine se trouve en proportion plus élevée dans les constituants extraits par le pyrophosphate de tous les horizons que dans ceux extraits par la soude. Pour l'arginine, les constituants extraits par la soude présentent une plus grande teneur que ceux extraits par le pyrophosphate. La tyrosine se trouve, elle, toujours en plus grande proportion dans les constituants extraits par la soude que dans ceux extraits par le pyrophosphate.

*Composés non dialysables* : les proportions d'acide aspartique sont voisines dans les composés extraits des différents horizons par la soude et par le pyrophosphate sauf en ce qui concerne l'horizon minéral A<sub>2</sub>C où la soude conduit à une substance plus riche en acide aspartique que celle isolée à partir de l'extraction par le pyrophosphate. Ce résultat est inversé dans les composés isolés de l'horizon minéral témoin ACT. L'acide glutamique se trouve dans les mêmes proportions dans les composés extraits par les deux réactifs de tous les horizons, à deux exceptions près : l'horizon Lf<sub>1</sub> où la soude en extrait plus, et l'horizon minéral témoin où, au contraire, elle en extrait moins.

De même, la glycine et l'arginine sont plus abondantes dans les substances isolées par le pyrophosphate. La tyrosine, quant à elle, est aussi abondante quel que soit le solvant.

TABLEAU VI

Composition en acides aminés (résidus pour 1 000 résidus) des acides humiques et des composés non dialysables extraits par la soude (S) et le pyrophosphate (P) des horizons du sol de la cédraie âgée

	Lf <sub>1</sub>				Lf <sub>2</sub>			
	Acides humiques		Comp. non dial.		Acides humiques		Comp. non dial.	
	S	P	S	P	S	P	S	P
Acide aspartique .....	134	138	142	139	155	149	162	153
Thréonine .....	61	60	84	68	62	53	81	75
Sérine .....	63	50	78	71	61	57	78	75
Acide glutamique .....	125	119	126	107	116	115	113	113
Proline .....	49	42	61	50	41	59	48	53
Glycine .....	133	144	137	146	142	163	149	153
Alanine .....	96	103	94	91	93	98	87	96
Valine .....	73	80	67	94	82	74	69	62
1/2 Cystine .....	7	—	1	—	—	—	—	—
Méthionine .....	4	—	3	4	—	—	4	—
Isoleucine .....	50	56	45	43	50	49	41	41
Leucine .....	73	82	60	58	67	65	55	51
Tyrosine .....	11	—	13	15	8	5	8	11
Phénylalanine .....	34	33	27	28	33	32	26	27
Lysine .....	43	47	31	35	46	50	39	38
Histidine .....	17	28	12	16	17	22	13	17
Arginine .....	27	18	19	35	27	29	27	35
	A <sub>1</sub> C				A <sub>2</sub> C			
	Acides humiques		Comp. non dial.		Acides humiques		Comp. non dial.	
	S	P	S	P	S	P	S	P
Acide aspartique .....	154	155	158	163	139	168	178	157
Thréonine .....	62	56	74	60	64	69	77	70
Sérine .....	55	46	74	83	56	69	73	83
Acide glutamique .....	124	130	123	131	117	117	130	130
Proline .....	46	55	54	28	50	46	51	36
Glycine .....	144	155	162	178	145	147	130	147
Alanine .....	91	97	100	90	96	94	126	100
Valine .....	73	73	67	67	72	69	74	72
1/2 Cystine .....	—	—	—	—	—	—	—	—
Méthionine .....	4	—	—	—	—	—	—	—
Isoleucine .....	48	49	38	43	49	59	52	39
Leucine .....	68	74	52	46	69	61	63	55
Tyrosine .....	10	—	12	4	14	—	16	tr
Phénylalanine .....	34	21	24	19	38	19	30	28
Lysine .....	40	53	23	37	41	50	tr	44
Histidine .....	17	24	10	12	17	19	tr	22
Arginine .....	30	12	29	44	33	13	tr	17

TABLEAU VII

Composition en acides aminés (résidus pour 1 000 résidus) des acides humiques et des composés non dialysables extraits par la soude (S) et le pyrophosphate (P) de l'horizon AC témoin

	Acides humiques		Composés non dial.	
	S	P	S	P
Acide aspartique ...	169	233	230	259
Thréonine .....	59	46	48	36
Sérine .....	45	33	39	50
Acide glutamique ..	128	150	152	164
Proline .....	45	49	37	31
Glycine .....	148	144	145	158
Alanine .....	91	91	96	92
Valine .....	73	71	61	57
1/2 Cystine .....	—	—	—	—
Méthionine .....	tr	—	—	—
Isoleucine .....	49	41	37	28
Leucine .....	65	60	48	36
Tyrosine .....	14	—	11	tr
Phénylalanine .....	34	17	24	16
Lysine .....	40	48	39	46
Histidine .....	11	11	11	7
Arginine .....	33	5	22	20

En conclusion, pour les deux cédraies et au plan général, on note une très grande variation du rapport acides aminés sur carbone sans qu'on puisse établir une corrélation satisfaisante entre les différents horizons aussi bien pour la cédraie jeune que pour la cédraie âgée. Il semble néanmoins que, dans l'ensemble, les acides humiques et les composés non dialysables des horizons minéraux soient plus riches en amino-acides que ceux isolés des horizons de litières.

Dans le détail, pour les deux cédraies, si l'on compare les compositions en amino-acides des composés non dialysables et des acides humiques, on voit que les différences les plus notables apparaissent dans les composés isolés des horizons inférieurs. Ainsi les acides aspartique et glutamique sont toujours plus abondants dans les composés non dialysables quel que soit le réactif d'extraction mis en œuvre, pour les horizons Lf<sub>2</sub> et AC de la cédraie jeune, AC de la cédraie âgée et AC du témoin. Pour les autres horizons, on observe qu'en cédraie jeune, les composés non dialysables sont proportionnellement plus riches en acide glutamique que les acides humiques lorsque l'extraction est faite par la soude ; en cédraie âgée, les composés non dialysables sont plus riches en arginine que les acides humiques lorsque l'extraction est faite au

pyrophosphate ; pour les autres amino-acides, les proportions n'offrent pas de variations significatives entre les deux types de produits extraits et purifiés.

En résumé, ces quelques résultats montrent à l'évidence que :

— la purification par dialyse isole toujours des composés globalement plus riches en amino-acides que la précipitation ;

— que les composés sont en outre toujours plus riches en acides aspartique et glutamique lorsqu'ils proviennent des horizons minéraux, quels que soient les solvants d'extraction, mais qu'ils sont de nature très variable suivant le solvant quand ils proviennent des horizons holorganiques.

### 3.3. Comparaison entre cédraie jeune et cédraie âgée

Bien qu'une telle comparaison paraisse ne pas avoir sa place dans une discussion de nature essentiellement théorique, elle est tout de même tentée ici car elle apporte de nouveaux éléments à la fois sur ce plan théorique et sur le plan pratique.

Le tableau VIII permet de constater à nouveau qu'avec un même solvant, le pyrophosphate, les composés extraits ont une composition en acides aminés bien différente suivant le procédé de purification.

Avec la dialyse, l'horizon AC de jeune cédraie est très voisin de l'AC témoin alors que les AC et A<sub>2</sub>C de la vieille cédraie portent nettement la marque des Lf : ils sont enrichis en acide aspartique, thréonine, sérine, acide glutamique, valine, isoleucine. En outre, et dans l'ensemble, en cédraie âgée il y a plus d'acide aspartique, de thréonine et de sérine qu'en cédraie jeune ; il y a aussi moins de tyrosine, histidine, isoleucine et leucine.

Avec la précipitation — et sans revenir sur l'absence de tyrosine — l'horizon AC de jeune cédraie est voisin de l'AC témoin, mais pas de la même manière : les taux de proline et de phénylalanine en particulier étant différents, alors que les taux d'alanine sont identiques et non divers. En outre, et dans l'ensemble, s'il y a encore davantage d'acide aspartique et moins de leucine en cédraie âgée qu'en cédraie jeune, il y a aussi plus de lysine et d'histidine et moins de thréonine et de phénylalanine.

Sur le plan théorique, cette comparaison met bien en évidence que dialyse et précipitation isolent des composés différents par leur nature intime.

TABLEAU VIII

Comparaison entre les acides aminés contenus dans les composés humiques extraits par le pyrophosphate des divers horizons de cédraies jeune et âgée et purifiés par dialyse et par précipitation (mêmes conventions qu'aux tableaux V à VII)

	Cédraie jeune				Cédraie âgée				Témoin
	LF	Lf <sub>1</sub>	Lf <sub>2</sub>	AC	Lf <sub>1</sub>	Lf <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> C	A <sub>2</sub> C	ACT
<b>a. Composés non dialysables</b>									
Acide aspartique .....	134	130	145	258	139	153	163	157	259
Thréonine .....	65	64	65	44	68	75	60	70	36
Sérine .....	71	59	63	44	71	75	83	83	50
Acide glutamique .....	122	123	117	158	107	113	131	130	164
Proline .....	53	53	50	31	50	53	28	36	31
Glycine .....	143	164	174	148	146	153	178	147	158
Alanine .....	90	98	97	84	91	96	90	100	92
Valine .....	70	68	65	67	94	62	67	72	57
1/2 Cystine .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Méthionine .....	—	—	—	—	4	—	—	—	—
Iso-Leucine .....	50	49	48	30	43	41	43	39	28
Leucine .....	67	58	49	34	58	51	46	55	36
Tyrosine .....	21	14	10	5	15	11	4	tr	tr
Phénylalanine .....	34	28	24	14	28	27	19	28	16
Lysine .....	33	38	42	47	35	38	37	44	46
Histidine .....	22	22	22	11	16	17	12	22	7
Arginine .....	25	32	29	25	35	35	44	7	20
<b>b. Acides humiques (précipitation acide)</b>									
Acide aspartique .....	133	131	147	231	138	149	155	168	233
Thréonine .....	61	59	69	47	60	53	66	69	46
Sérine .....	55	42	59	37	50	57	46	69	33
Acide glutamique .....	115	122	123	144	119	115	130	117	150
Proline .....	56	57	54	35	42	59	55	46	49
Glycine .....	123	140	163	153	144	163	155	147	144
Alanine .....	99	101	94	91	103	98	97	94	91
Valine .....	76	80	76	77	80	74	73	69	71
1/2 Cystine .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Méthionine .....	4	—	—	—	—	—	—	—	—
Iso-Leucine .....	59	59	45	37	56	49	49	59	41
Leucine .....	89	83	61	50	82	65	74	61	60
Tyrosine .....	—	—	—	—	—	5	—	—	—
Phénylalanine .....	50	58	32	24	33	32	21	19	17
Lysine .....	38	46	47	53	47	50	53	50	48
Histidine .....	17	20	19	9	28	22	24	19	10
Arginine .....	25	22	10	14	18	29	12	13	5

#### 4. CONCLUSIONS

##### 4.1. Conclusions concernant les cédraies

Seuls seront pris en compte les résultats concernant les produits extraits par le pyrophosphate et purifiés par dialyse. En simplifiant beaucoup, on peut dire que les teneurs en carbone total décrois-

sant de Lf à AC aussi bien en cédraie jeune qu'en cédraie âgée, celles-ci en contenant moins cependant que les premières. Les litières de cédraies âgées concentrent de haut en bas le carbone extractible alors qu'en cédraie jeune les litières gardent à peu près les mêmes teneurs : l'horizon A<sub>2</sub>C des cédraies âgées contient plus de carbone extractible que la pelouse à brome et il contient également plus de carbone non dialysable, alors que la cédraie jeune

en contient moins. C'est bien la marque de l'humification. Pour que celle-ci devienne sensible il faut, les âges respectifs des cédraies jeunes (30 ans) et âgées (100 ans) le prouvent, au moins un siècle. En outre, la matière humique contenue dans l'horizon AC de la cédraie âgée est beaucoup plus condensée (fraction A/fraction B = 3,6) que celle du AC de la cédraie jeune (fraction A/fraction B = 2,6) et un peu plus condensée que celle du AC de la pelouse à brome (fraction A/fraction B = 3,0). Par contre, elle est moins riche (1,10 mEq/100 g) en acides aminés totaux (surtout acides aspartique et glutamique) que celle du AC de la pelouse à brome (1,63 mEq/100 g) et de la cédraie jeune (1,96 mEq/100 g) ; dans le détail, il semble encore que cette matière humique soit un peu plus riche que celle du témoin en acides aminés aromatiques.

Ainsi se marque l'influence du cèdre sur la pédogenèse. Certes les quantités mises en jeu ne sont pas considérables, mais elles sont néanmoins sensibles. Pour peu spectaculaire qu'il soit, le phénomène valait tout de même d'être signalé : c'est la première fois en effet qu'il est permis de chiffrer en conditions naturelles les progrès et la nature de l'humification dans un laps de temps parfaitement connu.

#### 4.2. Conclusions d'ordre général

*Au plan quantitatif* — et étant bien entendu que, comme toujours, les échantillons traités renferment encore des résidus de microfaune et de microflore — la soude et le pyrophosphate ne se comportent pas de la même manière : ils extraient l'un et l'autre à peu près 15-20 % de carbone organique à partir des horizons holorganiques (y compris LF, feuilles fraîchement tombées), la soude extrait davantage d'acides humiques que le pyrophosphate ; cette particularité, jointe au fait que les feuilles vertes, aussi analysées par ailleurs, produisent également des « acides humiques » en grande quantité, laisse penser que ce solvant extrait une foule de corps qui précipitent à pH bas comme les acides humiques mais qui n'en sont pas forcément. D'ailleurs, le pyrophosphate, réputé meilleur décomplexant que la soude, extrait beaucoup plus de carbone organique (25-35 %) à partir des horizons minéraux que la soude, les composés organiques correspondants étant plus riches à la fois en acides humiques et en produits non dialysables, et ces derniers renfermant à peu près tout le carbone organique soluble. Ce comportement prouve, outre une meilleure apti-

tude à décomplexer, une meilleure sélectivité vis-à-vis des acides humiques.

Pour l'étude du contenu en acides humiques des litières, on peut donc utiliser le pyrophosphate, tout comme pour les sols, avec des réserves cependant sur la nature des « acides humiques » extraits.

*Au plan qualitatif*, le passage sur gel Sephadex a mis en évidence deux fractions d'importance inégale (une fraction B légère, et une fraction A, lourde) dans les acides humiques, une seule A, lourde, dans les composés non dialysables : les deux fractions A ayant le même comportement vis-à-vis du sol sont supposées être identiques. En valeurs globales, la soude et le pyrophosphate extraient des composés qui présentent les mêmes proportions A/B pour tous les horizons ; mais en valeurs calculées, si soude et pyrophosphate agissent encore de la même manière pour les horizons holorganiques, ce dernier est beaucoup plus actif pour les horizons minéraux : les teneurs en fraction A, lourde, sont plus importantes et les composés humiques correspondants sont beaucoup plus riches en noyaux aromatiques.

*Ces remarques* tendent à suggérer qu'au cours de la dialyse, soit les petites molécules se polymérisent, les acides fulviques se transformant en composés non dialysables (identifiés aux acides humiques), soit les molécules d'acides fulviques sont trop grosses pour dialyser. Dans les deux cas, d'une part, la grande affinité entre acides humiques et acides fulviques est soulignée, ce qui rejoint les données acquises par les auteurs antérieurs, d'autre part, l'idée se fait jour que le processus de purification pourrait modifier plus ou moins profondément la nature des produits isolés, ce qui est nouveau, la séparation entre fractions A, B, fulvique étant en outre fort artificielle.

*L'étude des acides aminés* montre que, globalement, les composés non dialysables sont toujours plus riches en amino-acides que les acides humiques précipités et que, dans le détail, ils contiennent toujours plus d'acides aspartique et glutamique pour les horizons minéraux (des teneurs variables pour les autres horizons) ; pour ces mêmes horizons et dans les composés extraits au pyrophosphate, ils sont même les seuls à contenir de la tyrosine, ce qui laisse conclure que celle-ci fait partie des corps (acides fulviques) restant en solution au cours de la précipitation acide : c'est la preuve que l'acidification dénature les composés humiques extraits. Par ailleurs, la nature des acides aminés contenus dans

les composés humiques varie en fonction du procédé d'extraction : ils sont plus riches en tyrosine et arginine lorsque la soude est utilisée, en glycine et acide glutamique lorsque c'est le pyrophosphate (surtout dans les horizons minéraux).

Au plan pratique, ces remarques montrent bien que les extractions à la soude et au pyrophosphate conduisent à des composés quantitativement et qualitativement différents (ce qui rejoint les suppositions de Dabin, 1977, fondées sur leur comportement différent), et que, de surcroît, le mode de purification en modifie la constitution à la fois qualitative et quantitative.

L'extraction au pyrophosphate et la dialyse paraissent être les meilleurs procédés d'obtention des composés humiques extractibles. C'est de ces composés humiques ainsi obtenus qu'il convient d'établir la nature intime : on sera tout naturellement tenté d'y distinguer d'abord les deux fractions lourdes (formée de polycondensats très aromatiques) et légère (formée de petits polymères, peptides, acides phénols même, etc.) qui, mais seulement dans certains cas, pourraient être identifiées aux acides humiques et aux acides fulviques et dont la composition devra être précisée. La proportion des deux fractions sera tout aussi utile à connaître que le rapport classique AF/AH, AH gris/AH bruns, etc. Il est fort possible qu'à chaque groupement végétal, c'est-à-dire à chaque milieu naturel, corresponde un complexe humique particulier : tous les moders, mulls, etc. n'étant pas identiques mais seulement analogues par des propriétés d'ensemble telles le pH, la structure, etc.

Au plan fondamental, cette recherche analytique ayant mis en évidence que les composés humiques isolés ont une nature intime variable suivant la liqueur d'extraction et la méthode de purification utilisées d'une part, suivant le type d'horizon, d'autre part, confirme non seulement l'idée qu'acides fulviques et acides humiques font partie d'un même ensemble et peuvent se transformer les uns dans les autres, mais prouve bien que les molécules protéiniques dont ces derniers sont constitués, entre autres choses, peuvent être soit adsorbées soit désorbées suivant les conditions de milieu ; ce qui à la fois rejoint les remarques de divers auteurs et les explique.

A ce sujet, on peut émettre trois hypothèses :

— les fractions protéiques font partie de la structure intrinsèque des acides humiques comme le pensait Naksman (1936),

— les fractions protéiques sont libres dans l'extrait alcalin et coprécipitent ou sont adsorbées sur les acides humiques,

— une fraction des composés protéiques fait partie de la structure intime des composés humiques, une autre est adsorbée sur celle-ci. Il est encore difficile de choisir, bien que la dernière des hypothèses soit la plus vraisemblable.

Les différences relevées dans le comportement de la soude et du pyrophosphate tiennent sans doute à ce que, en milieu alcalin, le pouvoir de dissolution des deux solvants n'est pas le même vis-à-vis des divers types de protéines. De même, au cours de la précipitation acide, il est probable qu'une partie des fractions protéiques ou peptidiques reste en solution, une autre précipitant soit par coprécipitation, soit par adsorption avec les acides humiques, ces deux phénomènes étant conditionnés par la taille et le point isoélectrique des produits en solution. Enfin, au cours de la dialyse, les protéines ne passent pas à travers les pores du sac et restent à côté des grandes molécules. C'est ce qui explique qu'il y ait plus d'azote protéique dans les composés non dialysables que dans les composés humiques précipités, et que la presque totalité du carbone extractible se retrouve dans les produits dialysés.

Ces conclusions expliqueraient de manière satisfaisante que les acides « fulviques » soient solubles dans l'eau, qu'ils soient réputés contenir beaucoup de carbones aliphatiques et peu de noyaux aromatiques, que leur constitution soit considérée comme très variable d'un échantillon à l'autre, et qu'au cours de la dialyse qui s'accompagne d'un retour progressif du milieu vers la neutralité, ces molécules protéiniques dépolymérisées lors de l'extraction alcaline puissent se repolymériser par simple rétablissement des liaisons CO-NH, tout à fait analogues aux liaisons peptidiques conduisant à la formation des acides nucléiques. Cette similitude serait de nature à faire admettre comme très probable la structure moléculaire proposée par Feebeck (1965) pour les acides humiques. Cela expliquerait aussi, d'une part qu'en sol très acide et primitif, les composés humiques soient surtout formés de petites molécules et qu'en sol moins acide plus évolué et soumis à des alternances saisonnières de dessiccation ou nycthémerales d'engel-dégel qui modifient les unes et les autres les réactions en fonction des points isoélectriques, la polymérisation soit plus poussée (Serve, 1976), et d'autre part qu'il y ait de nettes différences entre les composés passant dans les

solutions d'extraction bromoformo-éthanoliques des néo et paléorankers (Nègre et Ghiglione, 1976 ; Nègre, Ghiglione et Amouroux, 1975).

Ces quelques remarques dégagées, il semble bon de rappeler qu'elles ne concernent que des litières et des horizons bruts contenant toute leur matière organique fraîche et liée. Elles sont également vala-

bles, on a pu s'en assurer, pour des horizons débarrassés par densimétrie de la matière fraîche et il semble bien qu'elles le soient aussi pour les humines isolées du complexe minéral qui font actuellement l'objet de nos études.

Manuscrit reçu au S.C.D. de l'ORSTOM le 5 janvier 1977

#### BIBLIOGRAPHIE

- BRUCKERT (S.), TOUTAIN (F.), TCHICAYA (J.) et JACQUIN (F.), 1971. — Influence des pluvio-lessivats de hêtre et de pin sylvestre sur les processus d'humification. *Oec. Plant.*, 6 : 329-339.
- DABIN (B.), 1971. — Etude d'une méthode d'extraction de la matière humique du sol. *Sc. Sol.*, 1 : 47-63.
- 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. *Cah. ORSTOM, sér. Pédol.*, vol. XIV, 4 : 287-297.
- DOMMERMUES (Y.) et MANGENOT (F.), 1970. — Ecologie microbienne du sol. Masson, 796 p.
- DUCHAUFOR (Ph.), 1965. — Précis de pédologie. Masson, 422 p.
- DUCHAUFOR (Ph.) et JACQUIN (F.), 1966. — Nouvelles recherches sur l'extraction et le fractionnement des composés humiques. *Bull. ENSAN*, 8 : 1-24.
- FELBECK (V.), 1965. — *Adv. agr.*, 17 : 327-368.
- GLOAGUEN (J.-C.) et TOUFFET (J.), 1974. — Production de litière et apport au sol d'éléments minéraux dans une hêtraie atlantique. *Oec. Plant.*, 1 : 11-28.
- KONONOVA (M.) et BELCHIKOVA (N.), 1960. — A study of soil humus substances by fractionation. *Pochvoved II (I. Soils fertility*, 1961).
- LINDQVIST (I.), 1968. — On the extraction and fractionation of humic acids. *Landbruks högskolans Ann.*, 34 : 377.
- LAATSCH (W.), 1948. — Untersuchungen über die Bildung und Anreicherung von Huminstoffen. *Beitr. Agrarwiss.*, 9.
- MARTIN MARTINEZ (F.), 1967. — Fraktionierung von Huminstoffen eines Podzols durch Dialyse. *Zeitschr. Pflanzenernähr.*, 116,89.
- NEGRE (R.), GHIGLIONE (Cl.), GIRAUD (M.) et BAJOLLE (R.), 1972. — Evolution de quelques constituants minéraux des feuilles et des litières de cèdre au Petit Luberon. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 274, D ; 2455-2458.
- NEGRE (R.), GHIGLIONE (Cl.), GIRAUD (M.) et BAJOLLE (R.), 1972. — Evolution de quelques constituants organiques des feuilles et des litières de cèdre au Petit Luberon. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 274, D ; 3365-3367.
- NEGRE (R.), GHIGLIONE (Cl.) et BAJOLLE (R.), 1975. — Evolution des acides phénoliques dans les litières de cèdre au Petit Luberon. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 289, D, 1971-3.
- NEGRE (R.), GHIGLIONE (Cl.), 1976. — Recherche sur la matière organique de quelques rankers pyrénéens (2<sup>e</sup> note : les amino-acides libres). *Bull. Soc. Ec.*, VII, 2.
- NEGRE (R.), GHIGLIONE (Cl.), AMOUROUX (J.-M.), 1975. — Recherches sur la matière organique des rankers pyrénéens. *Rev. Ec. Biol. Sol.* 12 (3) : 531-542.
- RAPP (M.), 1971. — Cycle de la matière organique et des éléments minéraux dans quelques écosystèmes méditerranéens. RCP n° 40 CNRS, Paris.
- SEIDEL (H.), 1966. — Kolloides Verhalten Nativer Huminsäure. Diss. Göttingen.
- SERVE (L.), 1975. — Etudes par chromatographie sur gels de dextrane des acides humiques de quelques sols siliceux de haute montagne. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 280 D : 2317-2320.
- ULRICH (B.) et MAYER (R.), 1973. — Systemanalyse des Bioelement. Hanshalts von Waldökosystem. In *Ökosystemforschung* par ELLENBERG H. (Springer Verlag, Berlin p. 165-174).
- WAKSMANN (S.A.), 1936. — Humus. Williams et Wikins Co., Baltimore.