

N° d'ordre : 2158

THESE

Présentée
Pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Sciences des Procédés

Spécialité : Sciences des Agroressources

Par

Boris EYHERAGUIBEL

CARACTERISATION DES SUBSTANCES HUMIQUES BIOMIMETIQUES - EFFETS SUR LES VEGETAUX

Soutenue le 12 novembre 2004 devant le jury composé de :

M. E. PINELLI	Professeur, ENSAT, Toulouse	<i>Président</i>
M. C. MOULIS	Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse	<i>Rapporteur</i>
M. A. SEGUIN	Maître de conférences, Université de Perpignan	<i>Rapporteur</i>
M. P. MORARD	Professeur, ENSAT, Toulouse	<i>Directeur de thèse</i>
M J.SILVESTRE	Ingénieur d'études, ENSAT, Toulouse	<i>Membre</i>
M. G. MERLINA	Ingénieur de recherche, ENSAT, Toulouse	<i>Membre</i>

A mon grand père.

REMERCIEMENT

Je tiens tous d'abord à remercier le professeur Philippe Morard pour la confiance qu'il m'a accordé et pour m'avoir permis d'intégrer un projet à l'interface entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée. Ces trois années de travaux auront été une expérience unique et enrichissante, tant du point de vue scientifique qu'humain.

J'adresse ma gratitude au professeur Eric Pinelli pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse, pour son soutien, ses conseils avisés et nos longues discussions.

Je remercie également Messieurs Alain Seguin et Claude Moulis pour avoir accepté de juger ce travail et participer au jury de thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à Jérôme Silvestre pour sa disponibilité, ses conseils pratiques, techniques et scientifiques ainsi que pour son art de la multi-compétence.

Je remercie George Merlina de m'avoir encadré et prodigué avec passion ses connaissances de chimiste, sans jamais être avare de détails.

Merci aussi à Michel Kaemmerer d'avoir élargi mon champ d'investigation et fortement participé à mon enrichissement personnel.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur P. Gaillard de la société Gaillard Semences et à Messieurs F. Klabalzan et J.P. Péliissier de la société Diachem pour m'avoir permis de participer aux congrès IHSS, qui m'ont enrichi et donné de l'assurance.

Un grand merci à Claire-Sophie Haudin, Marianne Meric et Hubert Galy pour leur collaboration et leur contribution à l'avancement de ce travail.

Merci à Christophe et Jeff de m'avoir transmis leur expérience, à Adeline et Laurence d'avoir intimement partagé deux années de travail, à Annick pour son aide permanente et son soutien. Passe la balle à Marie, Geoffrey, Bertrand et ...Bala pour les années à venir. Merci à Ginger, John, Patoche, Françou et autres révoltés d'avoir réalisé la sINPThèse de nos vies de

doctorant. Merci à Jéré pour son éternel soutien et sa joie de partager et merci aux bougnats plus lointains mais toujours présents.

J'exprime également toute mon amitié et ma reconnaissance aux nombreuses personnes rencontrées au cours de ces trois années, étudiants, doctorants, personnels techniques et administratifs, qui m'ont motivé, soutenu, corrigé, amusé. Parmi tous ces gens merci aux riders, joggers, rafeurs, payeurs et autres frappeurs de balle qui m'ont permis de me défouler. Merci aussi aux gastronomes et aux épicuriens, aux adeptes de Bacchus, aux musiciens et aux métaphysiciens.

Merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées et qui ont de près ou de loin participé à la réalisation de ce travail. Merci pour leur sympathie et simplement pour le plaisir que j'ai eu à les côtoyer quotidiennement.

Enfin une pensée toute particulière à ma famille pour son soutien et l'intérêt que chacun à porter pour mon travail.

Merci ma Jane de m'avoir compris, supporté, remonté, corrigé, aidé, conseillé et motivé pour réaliser ce manuscrit. Merci à mon frère pour sa présence, son recul et son écoute.

Je voudrais finalement remercier mes parents à qui je dois tant. Merci de votre soutien, vos encouragements et votre présence tout au long de mon cursus. Merci de croire en moi. Trouvez dans ce travail accompli, tous le respect et l'amour que je vous porte.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	7
1 INTRODUCTION	8
2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	11
2.1 Définition et nature des substances humiques	12
2.1.1 Le sol et la matière organique	12
2.1.2 Les sources de substances humiques	18
2.2 Caractérisations chimique et structurale des substances humiques	21
2.2.1 Composition des substances humiques	21
2.2.2 Structure des substances humiques	24
2.2.3 Propriétés des substances humiques	27
2.3 Rôles et effets des substances humiques	28
2.3.1 Influences sur le sol	28
2.3.2 Influences sur les plantes	29
2.3.3 Conclusions	37
3 MATERIELS ET METHODES	38
3.1 Procédé de synthèse et extraction des substances humiques	39
3.2 Matière première utilisée et échantillons	41
3.2.1 La sciure	41
3.2.2 Les constituants primaires du bois	42
3.3 Méthodes de caractérisation des substances humiques	43
3.3.1 Préparation des échantillons	44
3.3.2 Analyses physico-chimiques	45
3.3.3 Techniques d'analyses moléculaires et structurales	49
3.4 Matériel végétal et conditions de culture	55
3.4.1 Le pélagonium	55
3.4.2 Le maïs	56
3.4.3 Technique culturale et mise en culture	57
3.5 Formulation des solutions nutritives	58
3.5.1 Formulation de la solution nutritive standard	58
3.5.2 Formulation des solutions nutritives avec substances humiques	59
3.6 Mesure de la croissance et du développement	61
3.6.1 Mesures biométriques	61
3.6.2 Analyse minérale	63
3.7 Plans expérimentaux	65
3.7.1 Effets des SHB sur la croissance et le développement du Pélagonium	67
3.7.2 Effets des SHB sur la croissance et le développement du maïs	68
3.8 Analyse statistique	71
4 CARACTERISATION ET ORIGINE DES SUBSTANCES HUMIQUES BIOMIMETIQUES	72
4.1 Caractérisation des substances humiques biomimétiques	73
4.1.1 Analyses physico-chimiques	73
4.1.2 Analyses moléculaires et structurales	79

4.2	Caractérisation des résidus solides de fabrication	91
4.2.1	Observation macroscopique	91
4.2.2	Poids sec des résidus solides	93
4.2.3	Transformation des fibres du bois	93
4.2.4	Observation microscopique	95
4.2.5	Lavage des résidus	97
4.3	Discussion	101
4.3.1	Transformation de la matière première	101
4.3.2	Origine et formation des substances humiques biomimétiques	102
5	<u>EFFETS DES SHB SUR PLANTES ENTIERES</u>	108
5.1	Objectifs de l'étude	109
5.2	Effets des substances humiques biomimétiques sur la croissance et le développement du pélagonium	110
5.2.1	Recherche de la dose efficace	110
5.2.2	Comparaison des effets des substances humiques biomimétiques et des fractions humiques et fulviques	121
5.3	Effets des substances humiques biomimétiques sur la croissance et le développement du maïs	133
5.3.1	Recherche de la dose efficace	133
5.3.2	Effets de la dose efficace de substances humiques biomimétiques	141
5.3.3	Comparaison des effets des substances humiques biomimétiques et des fractions humiques et fulviques	150
5.3.4	Effets sur la germination et la croissance racinaire	157
5.3.5	Expérimentation en pots	160
5.4	Discussion générale	163
5.4.1	Effets sur la croissance et le développement	163
5.4.2	Effet sur la nutrition hydrique et minérale	167
5.4.3	Effets des fractions humiques et fulviques	169
6	<u>CONCLUSION GENERALE</u>	171
6.1	Synthèse des résultats obtenus	172
6.2	Perspectives	175
7	<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	179
	Liste des tableaux	187
	Liste des figures	189
	Annexes	192

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: acide désoxyribo nucléique
AF	: acide fulvique
AH	: acide humique
AIA	: acide indol acétique
ARN	: acide ribo nucleique
atm	: atmosphère
ATP	: adénosine tri phosphate
C	: cellulose
CAH	: complexe argilo-humique
Da	: Dalton
EDTA	: acide ethylènediamine tétraacétique
Ec	: Electroconductivité
H	: hémicellulose
IR	: infrarouge
L	: lignine
M	: mélange
MEB	: Microscopie électronique à balayage
mf	: matière fraîche
mo	: matière organique
ms	: matière sèche
PM	: poids moléculaire
ppm	: partie par million
RMN	: résonance magnétique nucléaire
S	: sciure
SH	: substance humique
SHB	: substance humique biomimétique
SHC	: substance humique de cellulose
SHL	: substance humique de lignine
SHH	: substance humique d'hémicellulose
SHM	: substance humique du mélange
SHS	: substance humique de sciure
SN	: solution nutritive

1 INTRODUCTION

Les substances humiques (SH) sont les constituants majeurs de la matière organique. Elles sont présentes dans tous les écosystèmes, sous forme de macromolécules carbonées complexes provenant de la dégradation et de la transformation de la matière organique. Elles présentent de nombreux effets sur l'environnement au niveau du sol, des plantes ou des microorganismes. Elles sont décrites comme des molécules stimulantes. Elles ont une influence favorable sur la structure du sol, sur la croissance et sur le développement des plantes.

En raison de leurs propriétés, les substances humiques ont fait l'objet de nombreuses études développées autour de deux axes de recherche principaux. L'étude de la nature chimique et de la structure des molécules humiques constitue un premier axe fondamental pour comprendre leurs propriétés physiques, chimiques et agronomiques. Il permet de mieux appréhender un second axe d'étude traitant du rôle et des modes d'action des matières humiques sur les organismes et l'environnement.

L'étude des substances humiques s'avère complexe en raison de leur variabilité de structure, induite par l'origine et la nature du matériel humique ou par les conditions environnementales. Au-delà de cette variabilité, la genèse des substances humiques se heurte à un temps de dégradation très long et aux modalités d'extraction engendrant des variations de composition des produits obtenus.

Depuis plusieurs années, l'équipe du Professeur Morard (Laboratoire Agronomie Environnement Ecotoxicologie, INP-ENSAT) s'attache à produire des substances humiques biomimétiques à partir d'un procédé physico-chimique. L'objectif de ces études est de disposer de produits homogènes et reproductibles pour limiter les variabilités des molécules humiques et faciliter leur étude. Les substances humiques provenant par nature de la dégradation de la matière organique et au vu des nombreuses sources industrielles de déchets organiques, un procédé de fabrication de substances humiques a été développé. Il permet de valoriser, de manière innovante, des déchets lignocellulosiques issus des secteurs agricoles ou industriels tel que ceux de la filière bois. L'originalité du procédé permet de remplacer les lents processus de dégradation naturels de la matière organique par les microorganismes, par une rapide dégradation physique de la matière végétale. Il produit, de manière reproductible, des substances humiques liquides, les substances humiques biomimétiques (SHB), possédant des caractéristiques proches des substances naturelles (Richard, 2002).

L'objectif de cette thèse est de poursuivre les études entreprises sur la préparation et la caractérisation de substances humiques biomimétiques. De nombreux points de la thématique

des substances humiques sont abordés dans cette étude aussi bien par leur aspect fondamental qu'appliqué. Dans un premier temps, le but de ce travail est de confirmer la reproductibilité du procédé de fabrication et de déterminer l'origine biochimique des produits formés. Les effets des substances humiques sur les végétaux restant mal compris et souvent contradictoires dans la bibliographie, la seconde partie de cette thèse tentera d'élucider les effets des SHB sur la physiologie des végétaux cultivés en hors sol, dans la continuité des travaux précédemment réalisés sur pélagonium (Galy, 2002).

Le manuscrit présente dans la première partie une approche bibliographique permettant de replacer les connaissances de bases et le contexte de l'étude. Les principaux matériels et méthodes utilisés pour caractériser les propriétés et les effets des SHB sont exposés dans le troisième chapitre. Le quatrième chapitre décrit les principaux résultats obtenus sur la production et la caractérisation des substances humiques biomimétiques et de leurs résidus de fabrication. L'étude de leur composition et de leur origine chimique permettra de mieux appréhender les facteurs susceptibles d'influencer le développement des plantes. Le cinquième chapitre présente les résultats observés sur l'impact de la dose de SHB et des fractions humiques et fulviques sur le pélagonium et le maïs. Enfin le dernier chapitre est consacré à une discussion de l'ensemble des résultats et propose des perspectives permettant d'approfondir l'analyse et l'utilisation des substances humiques.

2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La compréhension des relations de cause à effet existant entre la structure chimique des substances humiques et leurs propriétés biochimiques, nécessite une approche globale présentant le contexte et leurs mécanismes de formation. La difficulté dans l'étude des substances humiques provient de la complexité de ce matériel, qui ne peut être séparé en composants purs. Malgré l'impossibilité de représenter une structure macromoléculaire des substances humiques, il est cependant possible de comprendre leurs propriétés et leurs effets sur le sol et les plantes. L'approche bibliographique suivante s'attache à présenter les substances humiques présentes à l'état naturel dans le sol.

2.1 DEFINITION ET NATURE DES SUBSTANCES HUMIQUES

2.1.1 Le sol et la matière organique

Le sol est un système complexe constitué de différentes matières premières interagissant les unes avec les autres. Les propriétés du sol résultent de l'effet de toutes ces interactions (MacCarthy et al., 1990). Les composés du sol sont la matière organique et la fraction minérale.

2.1.1.1 Composition de la matière organique du sol

Les constituants organiques sont des éléments essentiels des écosystèmes terrestres et aquatiques. Au niveau des sols, ils se composent de la biomasse constituée par les organismes vivants, la microflore et la microfaune et de la matière organique, ensemble des tissus, animaux, végétaux et microbiens morts et de leurs produits de décomposition résultant des transformations microbiennes et chimiques des débris organiques (figure 1).

Cette dégradation de la biomasse produit d'abord des matériaux facilement dégradables, servant de substrats aux micro-organismes du sol (Vaughan and Ord, 1985). La décomposition plus lente des autres débris induit la formation de substances humiques. La durée de ce processus varie de quelques mois à quelques années et aboutit à la minéralisation complète des résidus organiques.

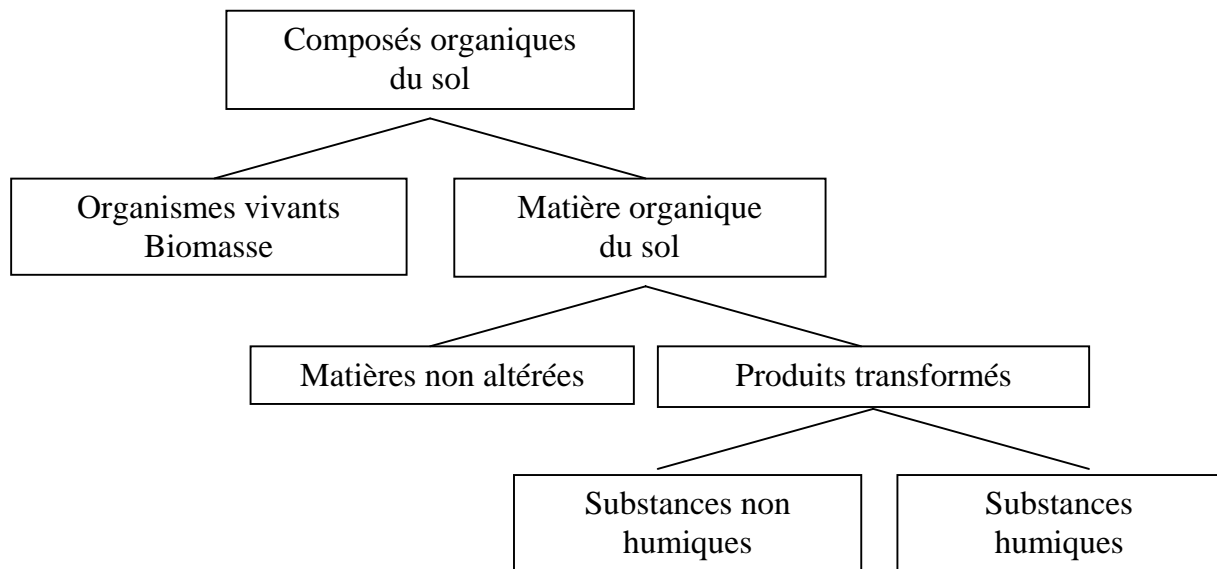


Figure 1 - Distribution de la matière organique des sols

La matière organique des sols est très hétérogène en raison de la nature des constituants qui la composent et de leur stade de décomposition. Ces constituants varient selon la diversité de la biomasse et la composition des sols qui en résulte. De plus, la dégradation des débris organiques est influencée par les conditions pédoclimatiques (pH, température, humidité et aération du sol) et la variabilité de la flore microbienne.

2.1.1.2 Transformation de la matière organique du sol

Les sols renferment en moyenne 2 à 8 % de matière organique. La production de biomasse dans un écosystème se traduit à la mort des organismes par le retour au sol des matières organiques fraîches. Grâce au processus d'humification, la décomposition des débris organiques constitue un processus de base permettant de garder un niveau de matières organiques constant et fonction du type de sol.

Le processus d'humification fait partie intégrante des cycles de minéralisation du carbone, de l'azote ou du soufre assurant un remplacement continu de ces éléments passant de l'élément constitutif à l'élément nutritif. Il permet l'enrichissement du sol en éléments minéraux, en azote par l'intermédiaire des décompositions de protéines ou d'acides ribonucléiques. Ces diverses transformations apparaissent sur la figure 2 qui illustre un modèle développé pour simuler la dynamique du carbone dans le sol (Balesdent, 1996). Il sous-entend plusieurs vitesses de minéralisation et montre le rôle essentiel des micro-organismes.

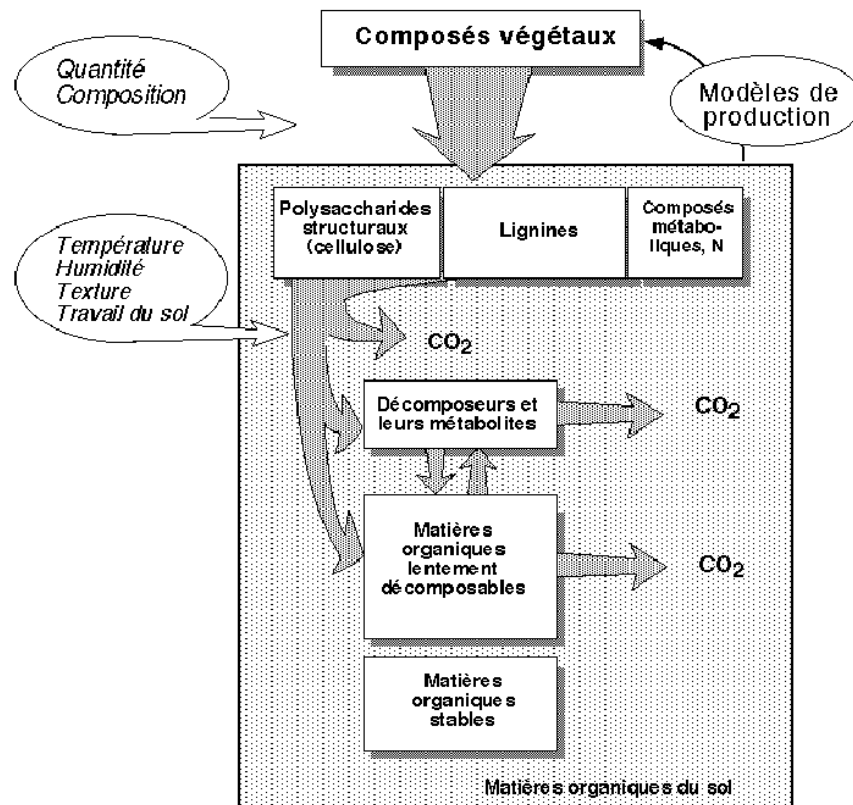


Figure 2 - Dynamique du carbone dans le sol (d'après Balesdent, 1996)

La mort cellulaire des différents organismes est suivie par des réactions de dégradations chimiques et biologiques des tissus et une forte activité de synthèse microbienne (Schnitzer and Khan, 1978). Les débris organiques sont consommés par différents organismes décomposeurs du sol (arthropodes, champignons, bactéries) qui permettent leur fragmentation, leur digestion et leur incorporation au sol. La faune du sol, notamment les vers de terre, joue un rôle essentiel dans la dégradation de la matière organique fraîche en réduisant la taille des résidus végétaux.

Au terme de leur décomposition, les constituants de la matière organique fraîche subissent les étapes de minéralisation caractérisées par des vitesses de dégradation différentes. Les fragments organiques sont soit minéralisés en ions et molécules simples (CO_2 , H_2O), assurant la restitution des éléments minéraux, nécessaires à la croissance et au développement des plantes, soit transformés en molécules complexes par les processus d'humification.

Dans un premier temps, la matière facilement biodégradable (protéines et polysaccharides) est décomposée par les bactéries cellulolytiques et les champignons protéolytiques. La plupart du carbone des résidus organiques tombés au sol est rapidement oxydé en CO_2 . Les hydrates de carbone et les protéines sont complètement décomposés et assimilés par les microorganismes avant d'être minéralisés (Stott and Martin, 1990). Au terme de cette étape, 70% de la matière organique initiale a été minéralisée. Le reste du carbone non aromatique est incorporé à la

matière organique du sol. Sa stabilisation résulte alors de l'incorporation de produits du métabolisme microbien (Stott and Martin, 1990) et de la liaison des fragments peptidiques et polysaccharidiques aux substances humiques (Kononova, 1966).

Les composés aromatiques tels que la lignine, sont plus résistants à la décomposition. Ainsi, seulement 30% des composés aromatiques sont oxydés et une très faible quantité est incorporée à la biomasse microbienne. Les résidus de cette étape sont transformés dans une moindre mesure (1 à 6% de leur masse) par la microflore du sol et se mélangent aux déchets organiques nouvellement apportés. Les produits de dégradation de la lignine constituent une des sources des composés aromatiques conduisant à la formation de substances humiques.

2.1.1.3 Formation des substances humiques naturelles

Le processus d'humification repose sur des mécanismes complexes de dégradation de la matière organique par les microorganismes. Il conduit à la formation de substances brunes par des réactions de polycondensation oxydative, avant la minéralisation totale (Tissaux, 1996).

Les substances humiques sont ubiquitaires. Elles se retrouvent dans les sols, les sédiments et les eaux naturelles (MacCarthy et al., 1990). Elles constituent un mélange complexe de molécules organiques hétérogènes, caractérisées par un haut poids moléculaire et une couleur allant du jaune au noir. Leurs voies de synthèse chimique et biochimique sont mal connues et leur séparation en produits purs et identifiables n'a pas encore été possible. L'origine des substances humiques est généralement décrite sans préciser en détails leurs structures et les réactions de leur formation. La synthèse des substances humiques est conditionnée par de nombreux facteurs (nature de la matière organique, conditions environnementales). La variabilité de ces facteurs engendre la formation des molécules diverses et rend difficile leur étude. Les propriétés du sol (nature de la MO, activités biologiques de la microflore) et les conditions environnementales (pH, température, humidité) influent directement sur la composition et la structure des substances humiques (Barancikova et al., 1997). La formation des substances humiques reste un des aspects les moins compris de la chimie de l'humus. Plusieurs théories coexistent quant à l'origine des substances humiques impliquant une origine végétale par la dégradation des tissus lignifiés et une origine microbienne par la décomposition des autres résidus organiques (Flaig, 1964). Les principales voies de synthèse mettent en cause la lignine, les composés phénoliques de diverses origines, les polysaccharides et leur biodégradabilité relative pour expliquer la formation biochimique des substances humiques (figure 3). Ces résidus organiques subissent de profondes transformations et ne ressemblent plus à leur structure d'origine.

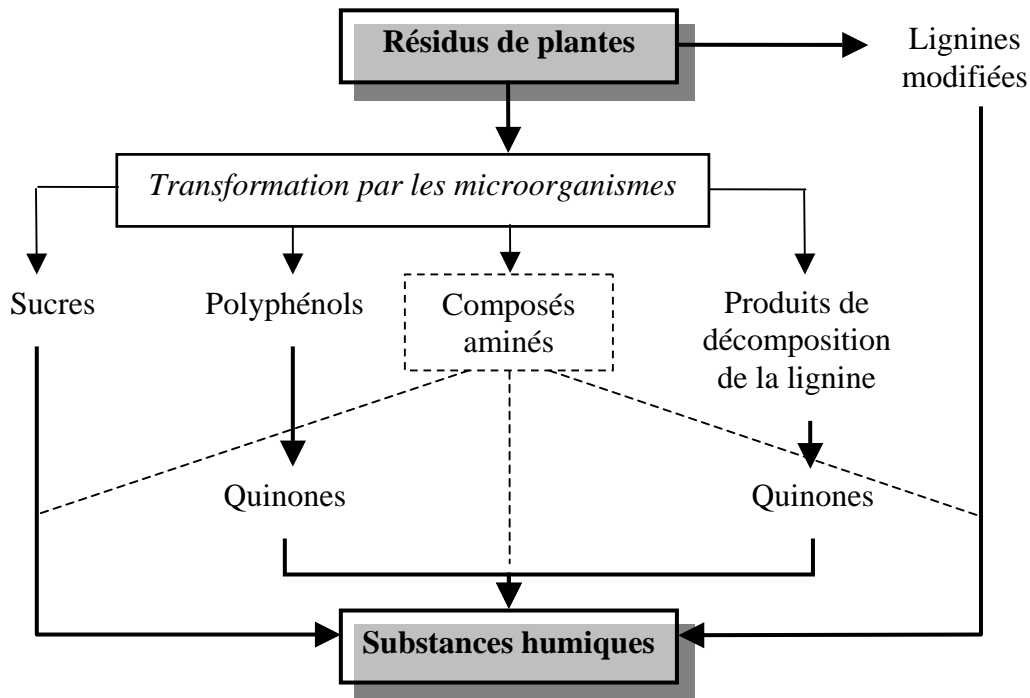


Figure 3 - Mécanismes de formation des substances humiques du sol (d'après Stevenson, 1982)

Pour de nombreux auteurs, l'origine des SH a longtemps été liée à la dégradation de la lignine (figure 4) des résidus de plantes (Flaig, 1988; Waksman, 1932). Ces tissus lignifiés résistant à la dégradation microbienne sont altérés superficiellement dans le sol. Exempte des liaisons avec les polysaccharides pariétaux, la lignine subit des transformations incluant la perte de groupes méthoxyles ($-OCH_3$), la formation d'hydroxyphénols et l'oxydation des chaînes latérales aliphatiques pour constituer des groupements carboxyliques ($-COOH$). Les fragments de lignine, partiellement dégradés par les microorganismes s'oxydent pour former des unités structurales primaires de l'humus de sol. Felbeck (1971) souligne la formation de substances humiques de hauts poids moléculaires (acides humiques et humines) dans les premiers temps de l'humification. L'hypothèse de formation des SH à partir de la lignine repose sur les nombreuses similitudes existantes entre ces deux composés tel que leur faible dégradabilité, leur propriété de solubilité, la nature acide de leurs constituants ou leur réactivité chimique.

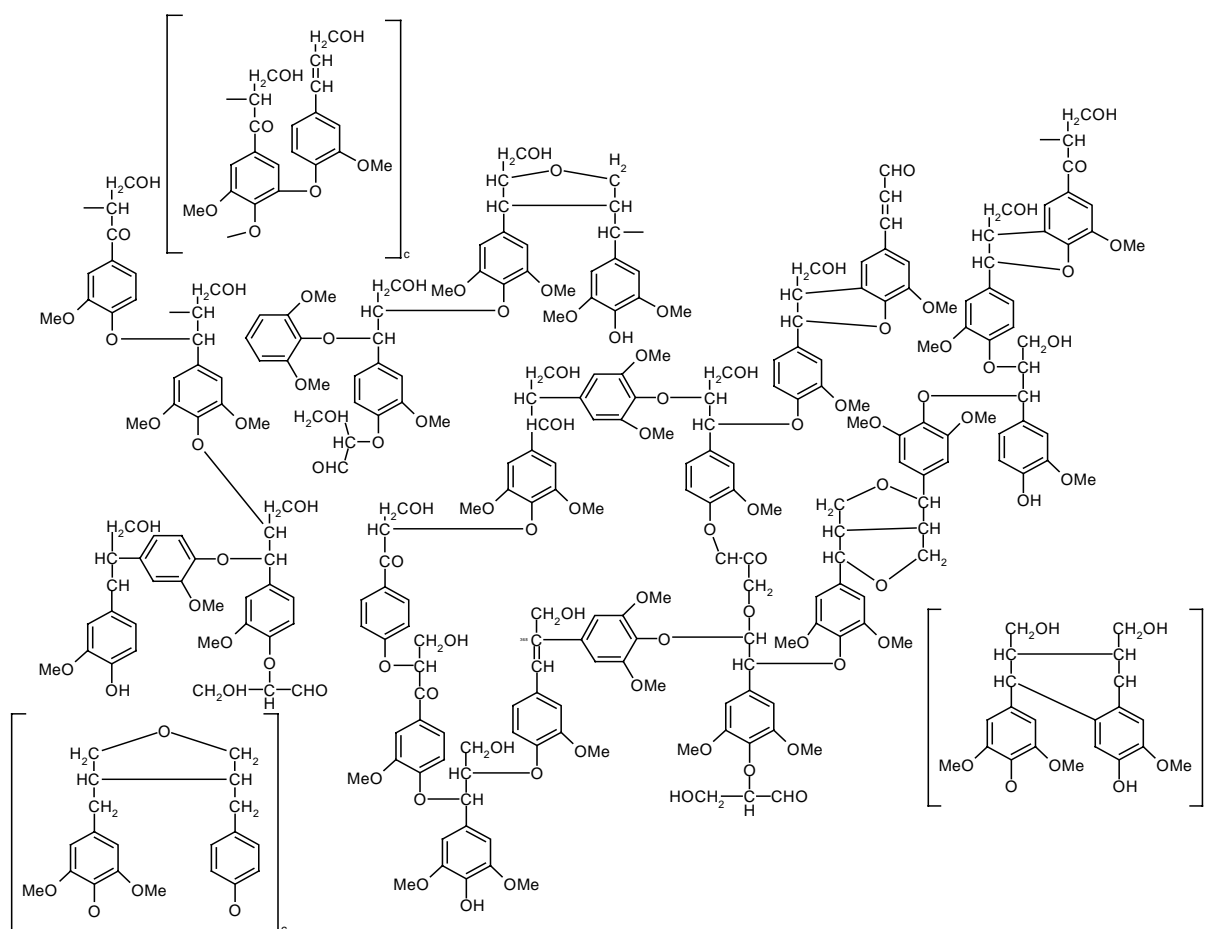


Figure 4 - Structure schématique de lignine de hêtre (Nimz, 1974)

Des concepts plus actuels sur l'origine des SH considèrent les polyphénols et les quinones comme principaux précurseurs (Stevenson, 1982). Les polymères phénoliques comme la lignine et les autres composés aromatiques synthétisés par les microorganismes du sol constituent une source majeure des unités aromatiques présentes dans les molécules humiques. Le rôle des microorganismes comme sources des polyphénols fut souligné par Kononova (1966) qui conclut que les substances humiques se formeraient à la suite de la décomposition des bactéries. Les phénols synthétisés par ces bactéries sont oxydés et transformés en quinones. Leurs structures sont partiellement dégradées, transformées et recombinaées en molécules humiques stables par des réactions enzymatiques et des réactions d'auto-oxydation. Flaig (1964) précise que les polyphénols, résultant de l'attaque microbiologique de la lignine, sont transformés en quinone par des enzymes de type polyphénol oxydase. En présence ou absence des composés aminés, les quinones se polymérisent pour former des macromolécules humiques de couleur noire.

Enfin, les polysaccharides synthétisés par les microorganismes ont longtemps été considérés comme précurseurs des fractions humiques (Kononova., 1966). Les sucres, les protéines et les

composés cellulosiques (figures 5 et 6) compris dans les tissus des plantes sont transformés par les microorganismes. Les sucres réducteurs et les acides aminés produits en abondance comme sous-produits du métabolisme microbien, peuvent subir une polymérisation non enzymatique pour former des polymères azotés bruns. Tous ces composés sont fortement réactifs. Les changements énergétiques fréquents de l'environnement du sol (gel et dégel, sécheresse et humidification), ainsi que les propriétés catalytiques de la matière minérale, peuvent faciliter leur condensation.

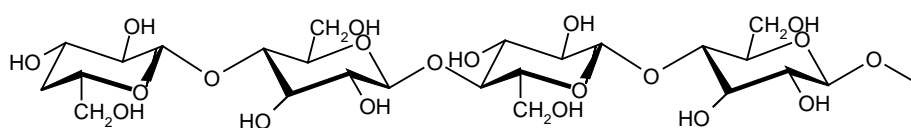


Figure 5 - Structure de la cellulose

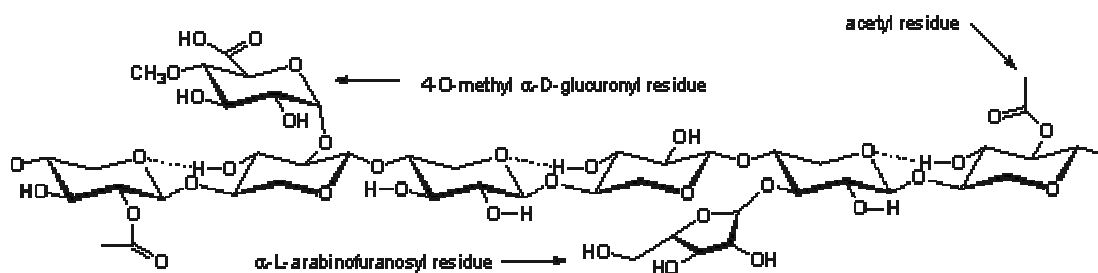


Figure 6 - Structure de l'hémicellulose

L'ensemble de ces voies de synthèse peut être considéré comme des mécanismes probables de la formation des acides humiques et fulviques. Ces réactions peuvent se produire simultanément dans tous les sols et Schnitzer (1978) souligne la difficulté à privilégier une hypothèse plutôt qu'une autre. L'importance relative de chaque réaction fluctue selon les caractéristiques du sol (température, humidité et l'irradiation) et de l'écosystème. La formation des substances humiques reste encore énigmatique au même titre que la structure des molécules les composant (MacCarty and al., 1990).

2.1.2 Les sources de substances humiques

Il existe de nombreuses sources de substances humiques qui diffèrent par leur genèse et leur composition. Les différents types de SH conservent une nature de macromolécules carbonées à dominante aromatique, plus ou moins substituées et liées à des fonctions aminées, des chaînes glucidiques et aliphatiques. La distinction entre les différentes sources s'effectue selon leur

processus de formation qui peut être soit naturel soit artificiel. Dans chaque cas, l'intervention de l'homme dans l'obtention des molécules humiques peut varier, de la simple extraction au contrôle du procédé.

2.1.2.1 *Les substances humiques naturelles*

Les substances humiques naturelles sont issues des processus de formation naturels faisant intervenir des transformations chimiques et microbiologiques. Elles se retrouvent dans les sols, dans des formations géologiques spécifiques comme les tourbières, les dépôts de lignite (Lawson and Stewart, 1989) ou dans les produits de transformation de la matière organique par l'homme tel que les fumiers ou le compostage (Senesi and Brunetti, 1996). L'intervention de l'homme est généralement limitée à la seule extraction des matières humiques (sols, tourbes, léonardite) mais peut apparaître dans le contrôle du procédé de fabrication (compostage).

- Substances humiques de tourbes

Selon les conditions environnementales, la vitesse de dégradation de la matière organique évolue. Dans un milieu saturé en eau en permanence, la matière organique tend à s'accumuler sous forme de tourbe. L'évolution de la matière organique dans les sols tourbeux est un processus très long qui se réalise essentiellement en condition anoxique et acide. Les propriétés physiques et chimiques, l'état de l'eau, la végétation et la faune microbienne d'un sol déterminent la qualité et la quantité de substances humiques de tourbes.

- Substances humiques de léonardite

Au cours du temps, l'accumulation de matière organique, recouverte par les sédiments, subit un compactage et une lente transformation, dans un milieu réducteur, en lignite puis en charbon. Suite aux altérations météorologiques, la modification des propriétés réductrices du milieu, induit l'oxydation et la transformation des dépôts de lignite en léonardite. La teneur et la pureté des substances humiques de léonardite varient en fonction de la localisation géographique des gisements (USA, république Tchèque, Espagne...) et de leur composition (argile, silice).

- Substances humiques de fumiers

La production de fumier résulte du mélange de déjections animales et de débris végétaux (pailles, rafles, fanes) issues des litières. Elle constitue l'une des plus anciennes sources de substances humiques faisant intervenir l'homme mais ne nécessite pas de contrôle de la production.

- Substances humiques de compost

Hormis les processus se produisant naturellement dans l'environnement, la synthèse de substances humiques peut être réalisée de manière contrôlée. Le traitement des déchets par compostage est une technique naturelle, basée sur le processus biologique de décomposition des déchets organiques (déchets verts, partie fermentescible des ordures ménagères...). Elle fait intervenir une abondante microflore aérobie (bactéries, champignons...) naturellement présente dans les déchets. Quatre paramètres sont contrôlés pour optimiser la production de compost : l'oxygénation, la température, le pH et l'humidité.

2.1.2.2 *Les substances humiques artificielles*

Les substances humiques artificielles sont issues de procédés de fabrication entièrement contrôlés par l'homme. Des transformations biochimiques effectuées sur des matières carbonées peuvent produire des matières humiques appelés substances humiques « like ». Ces processus correspondent à des dégradations contrôlées de substrat organiques par voie microbienne. Ils sont réalisés en bio réacteur avec un mélange de souches défini et ne correspondant pas à la variabilité présente dans le milieu naturel.

La dégradation de matières lignocellulosiques par des procédés physico-chimiques en conditions contrôlées a été mis au point dans notre laboratoire et a fait l'objet de plusieurs études (Richard, 2002, Galy 2002, Eyheraguibel 2001). Elle aboutit, suite à une extraction alcaline, à la formation de substances humiques dites « biomimétiques » (SHB). Les analyses effectuées sur ces produits montrent de manière générale des similitudes avec les substances humiques naturelles. Richard (2002) présente les analogies de composition, de structure et de propriétés observées entre les SHB et des extraits humiques de sols Uruguayens.

Une telle démarche peut faciliter l'étude des substances humiques car les conditions d'obtention sont reproductibles et les matières premières sont choisies (homogénéité, propriétés connues).

2.2 CARACTERISATIONS CHIMIQUE ET STRUCTURALE DES SUBSTANCES HUMIQUES

L'humus et la matière organique en décomposition génèrent un large spectre de molécules organiques impliquant une grande diversité de substances humiques tant par leur structure que par leur composition. Cette variabilité humique repose sur l'origine et la nature des matières organiques et les conditions environnementales permettant leur dégradation (Pal, 1992). L'extraction des fractions humiques a pour objectif d'isoler un fort taux de matériel humique, en altérant au minimum leur nature initiale. Cependant, elle se présente comme une étape limitante dans l'étude des substances humiques. L'extraction alcaline est généralement employée mais d'autres solutions peuvent être utilisées, en fonction de la fraction humique à extraire. La variabilité des conditions d'extraction induit une hétérogénéité des produits extraits, le matériel peut être altéré de manière quantitative et qualitative et générer des artéfacts lors des analyses. La difficulté dans l'étude des substances humiques provient de la complexité de ce matériel qui ne peut être séparé en fractions pures. L'avènement de nouvelles techniques permet d'isoler de nouvelles fractions et complète ainsi l'étude des substances humiques.

2.2.1 Composition des substances humiques

La caractérisation de la matière organique nécessite une étape de fractionnement de ces constituants. Cette séparation repose sur la solubilité des molécules dans l'eau en fonction du pH (Schnitzer and Khan, 1978). Outre les substances humiques hydrosolubles obtenues par simple extraction aqueuse, trois fractions sont classiquement mises en évidence (Mac Carthy et al. 1990): l'humine, fraction de couleur noire, insoluble dans l'eau quelle que soit la valeur de pH, les acides humiques (AH), bruns ou noirs, solubles en milieu basique et insolubles dans le domaine des pH acides ($\text{pH} < 2$), les acides fulviques (AF), de couleur jaune, solubles dans l'eau quelle que soit la valeur de pH (Figure 7).

L'extraction des substances humiques est réalisée à partir de solutions alcalines (soude, pyrophosphate de sodium de 0.1 à 1N). Elle aboutit à la formation d'une phase insoluble, l'humine, et d'une phase soluble. Cette phase soluble présente une couleur brune et son acidification forme deux fractions, un précipité brun floconneux (acides humiques) et un surnageant soluble (acides fulviques). Les acides humiques peuvent être également subdivisés en fractions plus ou moins condensées : acides humatomes, acides humiques bruns (peu condensés) et acides humiques gris (condensés) (figure 7). La séparation des substances

humiques, peut également être réalisée par chromatographie de perméation, qui permet de caractériser la distribution moléculaire des fractions humiques en fonction de leur taille. On distingue ainsi les acides fulviques, fraction de faible poids moléculaire (<1000 Da), des acides humiques, fraction de poids moléculaire élevé (de 5000 à 300 000 Da).

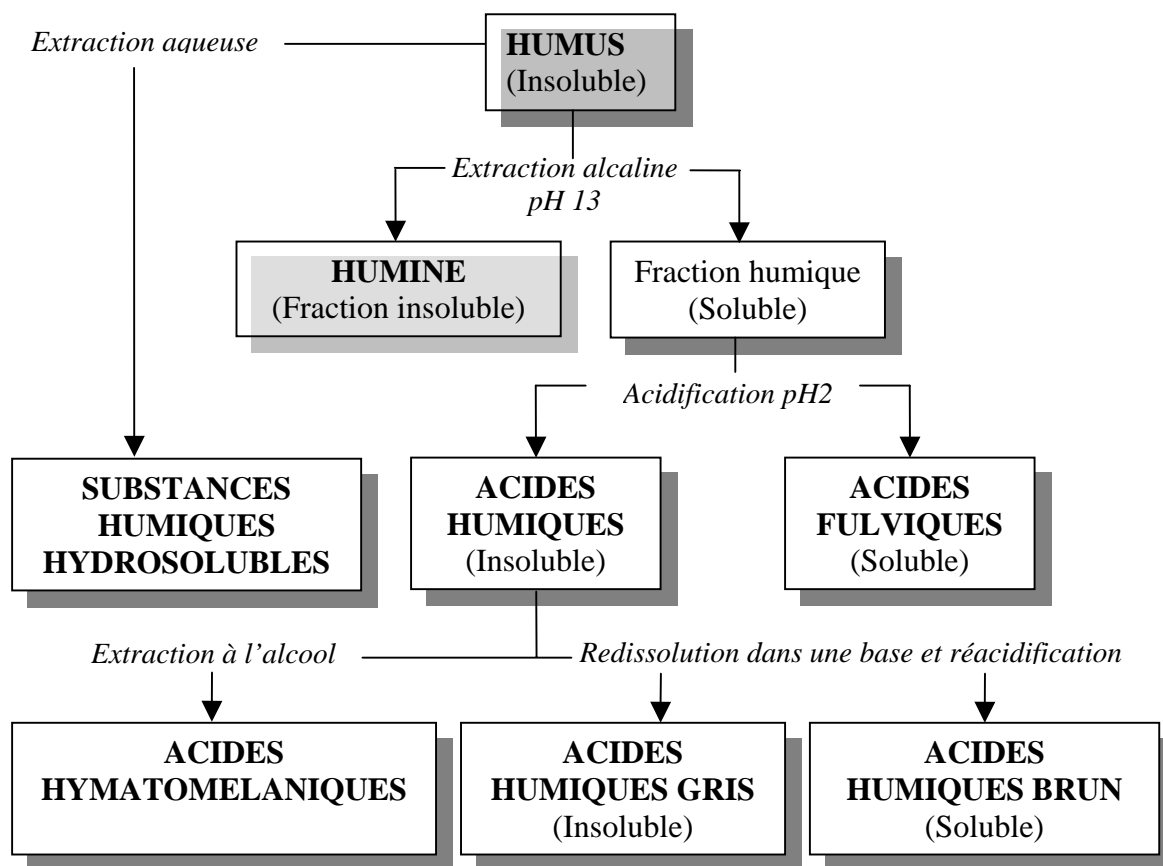


Figure 7 - Fractionnement des substances humiques

L'analyse élémentaire permet de déterminer la composition des SH. De part leur nature organique, les substances humiques sont composées de carbone (C), d'hydrogène (H), d'azote (N), de soufre (S) et d'oxygène (O) (Schnitzer, 1978). Les constituants majeurs des acides humiques et fulviques sont le carbone et l'oxygène. La présence de carbone et d'azote est plus élevée dans les acides humiques que dans les acides fulviques. Inversement, la fraction fulvique contient plus d'oxygène (tableau 1). Le rapport O/C permet de différencier les acides humiques (O/C = 0,5) des acides fulviques (O/C = 0,7). Le rapport H/C est inversement proportionnel à l'aromaticité ou au degré de condensation.

Elément	C	O	H	N	S
acides fulviques	40-50	44-50	4-6	<1-3	0-2
acides humiques	50-60	30-35	4-6	2-6	0-2

Tableau 1 - Composition élémentaire des substances humiques en % (Stevenson, 1982)

Les méthodes d'analyse des groupements fonctionnels ont permis d'observer une grande diversité de fonctions dans les SH tels que des groupements carboxyliques, phénoliques, alcooliques, énoliques, quinones et hydroxyquinones. La distribution relative de ces groupements varie selon les types de substances. On a pu toutefois attribuer des caractéristiques spécifiques aux acides humiques et fulviques. Ainsi l'acidité totale des acides fulviques est supérieure à celle des acides humiques. Les acides fulviques comportent plus d'atomes d'oxygène par unité de masse que les acides humiques, ce qui coïncide avec un plus grand nombre de groupements carboxyles COOH, hydroxyles OH, aldéhydes et cétones C=O (Schnitzer M., 1978). La réactivité des SH est en partie due à la présence d'oxygène dans les groupements fonctionnels carboxyliques, phénoliques ou alcooliques. De plus, parmi les groupements contribuant aux caractères acides des substances humiques, les acides carboxyliques (-COOH) sont plus importants que les fonctions alcooliques (-OH). Ces groupements fonctionnels sont impliqués dans les mécanismes de chélation (Stevenson, 1982) et peuvent expliquer les propriétés hydrophiles des molécules humiques. L'utilisation des techniques de spectroscopie fournit de nombreuses informations sur la composition des substances humiques. Leur fort caractère aromatique est mis en évidence dans les analyses de spectrophotométrie UV-visible (Schnitzer, 1978). Toutefois, le carbone engagé dans des cycles aromatiques pourrait ne pas dépasser 50% du carbone total (Mac Carty et al. 1990). La spectroscopie RMN permet la quantification des structures aromatiques, aliphatiques, phénoliques, carboxyliques et carbonyliques. La dégradation des substances humiques a montré qu'elles contiennent un faible pourcentage d'alcanes et d'acides gras et une forte proportion d'acides phénoliques et carboxyliques (Ogner and Schnitzer, 1970). Leur analyse infrarouge permet de dégager des spectres comportant des bandes d'absorptions caractéristiques des molécules humiques. Les acides humiques et fulviques présentent des spectres similaires, différant par l'intensité des bandes d'absorptions.

Malgré leur hétérogénéité, des similarités peuvent être observées entre les différentes fractions humiques comme la nature des atomes et des fonctions qui les constituent. Les principales différences résident dans la taille des molécules, leur composition en groupements fonctionnels et leur degré de ramifications. Les proportions relatives de ces groupements influent directement sur les caractéristiques des fractions humiques et fulviques (tableau 2). La différence de

composition des acides humiques peut s'interpréter par la détermination d'un taux d'humification caractérisant la réactivité chimique des substances (Barancikova, 1997). Ce taux exprime la proportion relative des groupements aromatiques et carboxyliques et varie proportionnellement à la réactivité des molécules humiques. Le taux d'humification est élevé lorsque les molécules possèdent une forte teneur en groupements carboxyliques et aromatiques polycondensés, de nombreuses structures conjuguées et des radicaux libres. Le taux d'humification est variable selon la nature des sols, de la matière organique et du climat.

	Acides fulviques	Acides humiques
Couleur	Jaune	brun
Degré de polymérisation	faible	élevé
Poids moléculaire (Da)	< 1000	300 000
Carbone	45 %	62 %
Oxygène	48 %	30 %
Acidité échangeable	1400	< 500
Degré de solubilité	élevé	faible

Tableau 2 - Caractéristiques des substances humiques (Stevenson and Cole, 1999)

2.2.2 Structure des substances humiques

Malgré de nombreuses études (Schnitzer and Khan, 1972; Stevenson, 1982), la structure des substances humiques reste mal définie et il est difficile de la représenter par une formule moléculaire. La synthèse des substances humiques aboutit à la formation de molécules de tailles, de composition et de configuration différentes. Au regard de la complexité et de l'hétérogénéité du mélange humique, il est difficile d'extraire une fraction pure et la détermination de sa structure s'avère peu réalisable. Seule, l'analyse des structures humiques a permis de mettre en évidence une série de groupements présents dans les différentes molécules humiques. Plusieurs modèles ont été proposés ne présentant en générale que des séquences de structure humique. Ils tiennent compte de la nature aromatique et phénolique des molécules et de la présence de groupements carboxyliques, quinones et de dérivés aminés peptidiques.

Parmi ces modèles, le modèle de Stevenson (1982) représente les acides humiques comme des macromolécules aromatiques complexes (figure 8). Les groupes aromatiques sont substitués par des composés aliphatiques et la liaison de peptides et de sucres aminés explique la présence de l'azote dans ces structures.

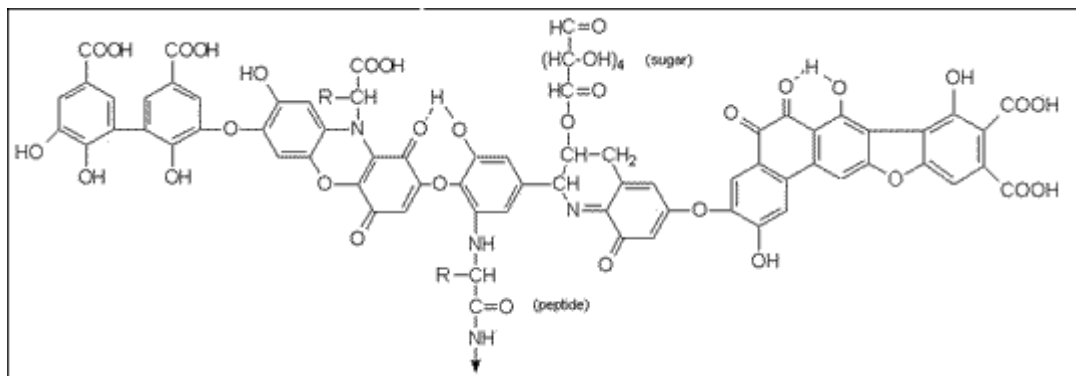


Figure 8 - Modèle d'un acide humique

Le modèle hypothétique de (Buffle, 1988) représentant un acide fulvique contient des structures aromatiques et aliphatiques fortement substituées par des groupes fonctionnels (figure 9).

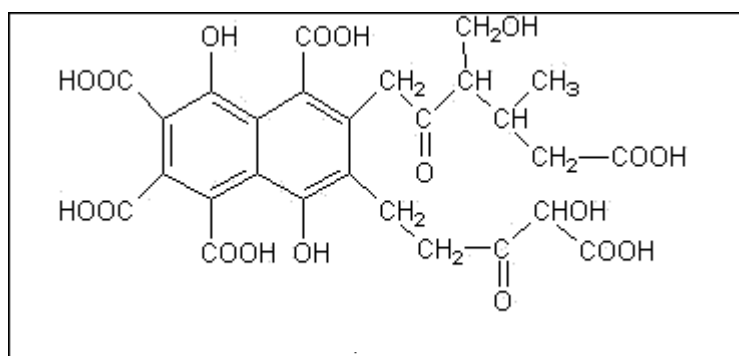
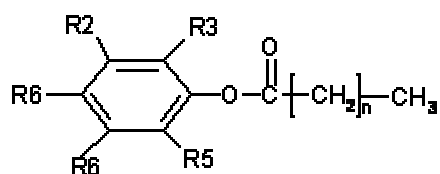


Figure 9 - Modèle d'un acide fulvique

La notion de structure nécessite d'être définie tant le mélange humique est hétérogène. Des points de vue s'opposent quant à la représentation possible des substances humiques.

Ainsi, le modèle de Schnitzer (1978) présente un motif structural élémentaire constitué d'un monomère aromatique substitué par différents radicaux (figure 10). La structure tridimensionnelle des substances humiques serait le résultat de polymérisations et d'assemblages aléatoires complexes de ces unités structurales, consolidé par des liaisons hydrogènes, des forces de Van der Waals, des interactions entre les électrons π de noyaux aromatiques voisins. Ce modèle privilégie les réactions d'estérification entre des acides gras et les groupements OH phénoliques. Les cycles aromatiques seraient en proportion moins abondants que les acides gras dans les acides fulviques. A l'inverse, ils seraient plus nombreux dans les acides humiques.



R1 : COOH, COCH₃ ou OH
 R2 : H, OH ou COOH
 R3 : H, OH, OCH₃ ou COOH
 R5 : H, OH ou OCH₃
 R6 : H ou COOCH₃

n compris entre 10 et 15

Figure 10 - Monomère constitutif des substances humiques (d'après Schnitzer, 1972)

(Piccolo, 1993) estime que la structure des SH n'est pas polymérique mais supramoléculaire, et correspond à l'assemblage de petites molécules par des liaisons faibles (Van der Waals, π - π) en conformation de haut poids moléculaire. L'observation microscopique des substances humiques semble confirmer cette hypothèse. La structure des acides humiques se présente sous forme d'un agrégat de corpuscules globulaires complexe et ramifié (Almendros and Sanz, 1992). La représentation d'Andreux (1994) permet de comparer la structure des acides humiques et fulviques. Elle propose une structure globale des substances humiques avec un noyau central aromatique et sur lequel sont fixées des chaînes latérales aliphatiques ramifiées (figure 11). Les principales variations résident dans la répartition des carbones aromatiques et aliphatiques (plus de noyaux aromatiques dans les structures humiques) et le nombre de fonctions acides (acidités carboxyliques plus importantes dans les structures fulviques).

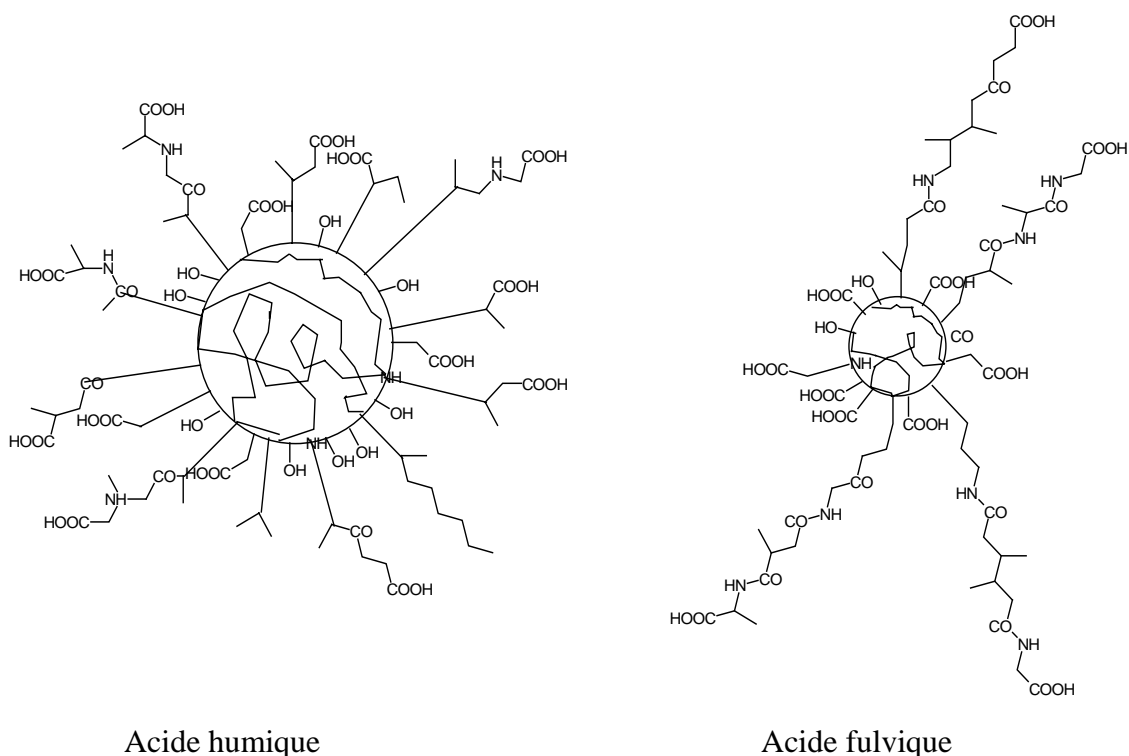


Figure 11 - Modèle de structure des composés humiques (Andreux and Munier-Lamy, 1994)

Enfin, Richard (2002) a établi un modèle de structure des substances humiques biomimétiques (figure 12). Ce modèle représente des particules de haut poids moléculaire correspondant à des composés d'origine glucidique substitués sur les unités terminales des oligomères de cellulose.

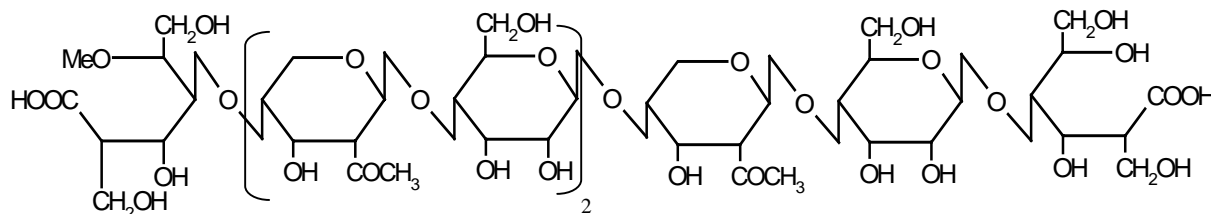


Figure 12 - Schéma possible de la structure des substances humiques biomimétiques
(d'après Richard, 2002)

Au travers de ces différents modèles, deux types de structure peuvent être distingués. Le premier type est directement lié aux processus de formation de SH qui définissent la composition et la taille des divers fragments et introduisent une notion de structure primaire des molécules humiques. Le second type de structure peut être assimilé à une structure secondaire (modèle de Schnitzer et Piccolo). Elle dérive des propriétés chimiques des molécules primaires et de leur capacité à établir des liaisons intra et inter moléculaire et la formation de structure polymérisée ou de complexe supramoléculaire. Globalement, sans obtenir une représentation caractéristique unique, l'étude de la structure des SH informe sur les composants structuraux et les groupements fonctionnels qui déterminent les propriétés des SH.

2.2.3 Propriétés des substances humiques

La nature acide des groupes fonctionnels confère aux SH un caractère poly-électrolytique de type anionique dont résultent leurs propriétés complexantes vis-à-vis des ions métalliques. Le pH et la concentration des molécules influencent la structure des substances humiques (Schnitzer, 1978) et indirectement leur pouvoir complexant. Grâce aux liaisons hydrogènes, et de Van der Waals, les molécules s'articulent et prennent des structures hélicoïdales. En solution concentrée, les substances humiques adoptent une structure condensée qui limite le nombre de groupements acides libres pour la complexation. Cette conformation se ramifie lorsque la concentration diminue (Bailly, 1985). Le pH des solutions influe également sur le pouvoir complexant des acides humiques. A pH acide, les substances humiques présentent une structure repliée ayant la propriété de se dérouler en cas d'alcalinisation du milieu (Schnitzer, 1978).

2.3 ROLES ET EFFETS DES SUBSTANCES HUMIQUES

Les nombreuses propriétés physico-chimiques des substances humiques, expliquent leurs impacts sur le sol et les plantes.

2.3.1 Influences sur le sol

Les substances humiques influent sur la fertilité du sol en améliorant sa structure, en augmentant l'activité biologique, la disponibilité des nutriments et en complexant les métaux toxiques (Stevenson, 1985).

Par leur caractère macromoléculaire et leurs propriétés colloïdales, les substances humiques assurent la cohésion des particules élémentaires du sol (MacCarthy et al., 1990). La structure du sol est ainsi stabilisée par un grand nombre de liaisons électrostatiques et de liaisons faibles établies entre les molécules organiques et les argiles (Balesdent, 1996). Les substances humiques lient les particules du sol sous forme d'agrégats qui améliorent la stabilité structurale du sol. Au sein de ces agrégats, la présence de micro-porosités permet de maintenir une structure aérée où l'eau et l'air peuvent circuler. Outre l'aération du sol, la surface d'échange gazeux entre le sol et l'atmosphère et sa capacité de rétention d'eau sont augmentées. L'eau pénètre plus facilement dans le sol et limite les risques d'érosion et de compactage (Balesdent, 1996). La couleur des sols, variable du jaune au brun, est directement liée à la concentration de SH dans le milieu. Une couleur sombre favorise l'absorption de l'énergie solaire et le réchauffement des sols (Stevenson, 1982) ; Balesdent, 1996). La présence de substances humiques améliore l'activité biologique des sols en fournissant aux microorganismes hétérotrophes un substrat énergétique et carboné. La variabilité des composés organiques entretient la diversité de la population microbienne (Balesdent, 1996). L'activité de ces organismes a un effet favorable sur les propriétés physiques du sol.

La matière organique forme avec les argiles un complexe colloïdal appelé complexe argilo-humique (CAH). Ce complexe est chargé électronégativement en raison de la présence de fonctions carboxyles (RCOO^-) et hydroxyles acides (RO^-). Les liaisons entre les substances humiques et les cations solubles du sol sont réalisées au niveau du CAH par échange cationique et protonique sur les fonctions $-\text{COOH}$ et $-\text{OH}$. Ces complexes peuvent aussi interagir avec des ions, des oxydes, des hydroxydes métalliques et des minéraux pour former des complexes organométalliques. Les groupements fonctionnels COOH , $\text{C}=\text{O}$ sont impliqués dans la

dégradation des minéraux du sol. Leur liaison aux métaux permet leur passage en solution et leur transport, sous formes solubles, dans les eaux et les sols (Schnitzer, 1978). Ces propriétés expliquent l'importance des substances humiques dans l'établissement du pH du sol et leur confèrent un pouvoir tampon qui permet d'en limiter les variations (Vaughan et Ord, 1985). Grâce à leurs propriétés chélatrices, les complexes augmentent la capacité d'échange cationique des sols, limitent le lessivage de certains éléments (Vaughan et Ord, 1985) et permettent également la détoxification en complexant les métaux lourds. La matière organique influe sur les réserves minérales des sols et améliore la biodisponibilité des éléments pour les végétaux en limitant leur précipitation (Revel et al., 1999; Stevenson, 1985). La nutrition minérale des plantes est donc facilitée.

Les substances humiques possèdent un rôle essentiel dans les écosystèmes. Elles limitent les variations environnementales du sol (pollutions, exportations d'éléments, fluctuations de pH,...) et contribuent à la croissance des plantes par leurs effets sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol.

2.3.2 Influences sur les plantes

De nombreux facteurs rendent l'étude des effets des substances humiques sur les plantes difficile et l'analyse des données bibliographiques montre des résultats très différents (MacCarthy et al., 1990; Vaughan and Malcom, 1985a). La nature et l'intensité des réponses peuvent varier en fonction des substances humiques, des plantes et des conditions expérimentales (figure 13).

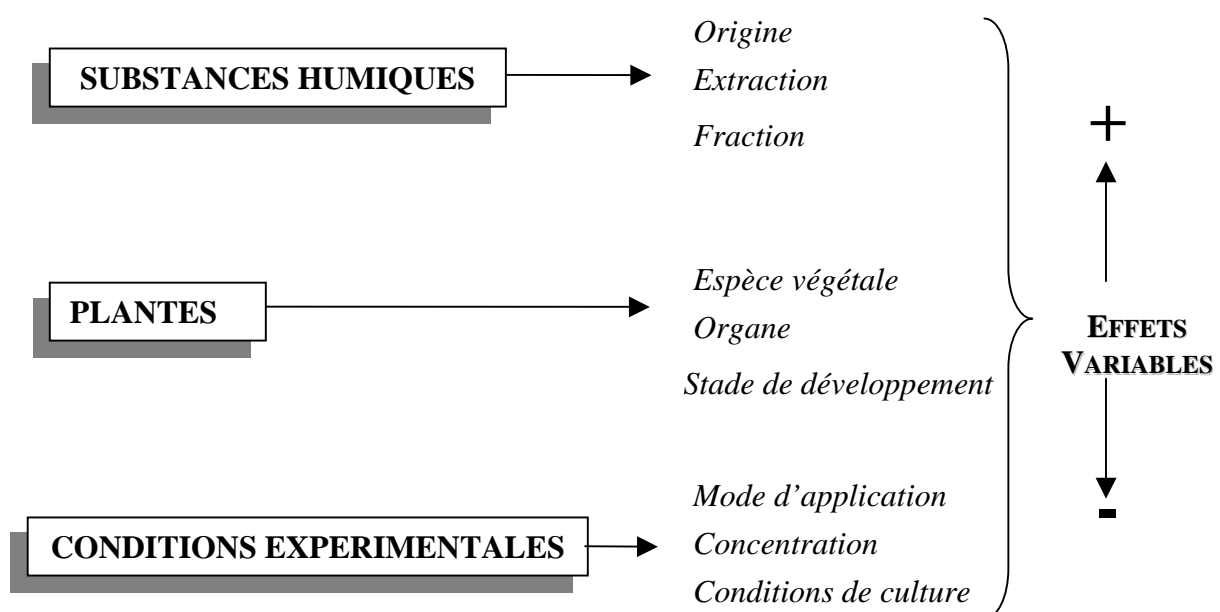


Figure 13 - Facteurs influençant la réponse des plantes aux substances humiques

L'origine et la nature des matières humiques conditionnent les réponses des plantes. Les substances humiques naturelles du sol, de tourbe, de compost, ou de roche sédimentaire (lignite, léonardite) présentent des effets sur les végétaux mais génèrent des réponses différentes. L'utilisation des différentes fractions de la matière organique, acides humiques ou fulviques, influe sur la spécificité des réponses. Par leur pénétration dans la plante, les particules de faible poids moléculaire (acides fulviques) présentent un mode d'action différent des acides humiques et modifient de manière plus intense le métabolisme cellulaire (Vaughan and Ord, 1985). Ces variabilités d'action sont directement liées à la composition des molécules humiques. La caractérisation des molécules humiques renseigne sur leur poids moléculaire, la présence de groupement fonctionnel, et permet d'établir des relations entre leur structure et leur activité biologique. La qualité de l'extraction des fractions humiques apparaît également comme un facteur de variabilité car elle influe sur les caractéristiques chimiques des composés, et par conséquent sur leur activité.

L'utilisation des substances humiques montre des effets différents selon les conditions expérimentales et le mode d'application (sol, substrat solide, solution nutritive ou application foliaire). L'intensité de la réponse dépend le plus souvent de la dose testée et de nombreuses études débutent par la détermination de la dose optimale (Hartwigsen and Evans, 2000). L'impact des fractions humiques augmente avec la concentration mais de trop fortes doses présentent un effet inhibiteur. La complexité et l'évolution du matériel humique en fonction des conditions expérimentales peuvent être une source de variabilité.

Enfin, les espèces végétales réagissent différemment aux stimulations des substances humiques et les effets observés varient par leur nature et leur intensité (Piccolo, 1993). Les traitements humiques affectent principalement la croissance et le développement des graines, des plantules ou des plantes entières. Des effets spécifiques s'observent sur les organes, les cellules ou le métabolisme cellulaire.

2.3.2.1 Germination et croissance des plantes

2.3.2.1.1 Germination et rhizogénèse

Dès les premiers stades de développement, les SH présentent des effets positifs sur la germination. Les traitements humiques augmentent la vitesse de germination, mais ne modifient

pas le pourcentage de graines germées. Cette stimulation serait liée à l'augmentation de l'activité enzymatique des tissus de la graine (Chen and Aviad, 1990).

Les fractions humiques présentent des effets importants sur la rhizogénèse. Les réponses se traduisent par un accroissement du nombre et de la longueur des racines pour de faibles concentrations (50 à 100 mg de carbone par litre) d'acides humiques et fulviques (de sol ou de préparation commerciale (Mylonas and McCants, 1980). Le poids frais des racines peut aussi être augmenté pour des doses allant de 2500 à 5000 mg.L⁻¹ d'acides humiques (Hartwigsen and Evans, 2000).

Les traitements humiques augmentent également les poids frais (Cooper et al., 1998); Hartwigsen, 2000) et secs des jeunes pousses issues des graines traitées. L'étude de la germination de graines de tomates prétraitées avec des préparations d'acides humiques (charbon oxydé) indique une augmentation des masses fraîches et sèches des plantules, proportionnelle à la concentration des acides humiques. Piccolo (1993) attribue ce phénomène à une meilleure efficacité de l'eau et à une plus forte élongation cellulaire.

Enfin, de manière générale, de fortes concentrations d'acides humiques inhibent les effets observés sur la germination. Ces concentrations sont variables selon les études, supérieures à 500 (Mylonas and McCants, 1980) voir 5 000 mg.L⁻¹ de carbone (Piccolo et al., 1993).

2.3.2.1.2 Croissance des racines et des parties aériennes

Quel que soit leur mode d'application les substances humiques améliorent la croissance des végétaux, en induisant une augmentation quantitative de la longueur, de la surface, du volume ou de la masse des organes des plantes (Chen and Aviad, 1990).

Ces modifications s'observent sur la croissance racinaire par l'apparition et l'élongation de nouvelles racines. Ainsi Rauthan (1981) soulignent une accélération de la croissance des racines (longueur, poids sec) chez le concombre cultivé en aquiculture en présence de 100 à 300 mg.L⁻¹ d'acides fulviques extraits du sol. L'utilisation de solutions humiques sur une culture d'*Agrostis Stolonifera* L. (graminée) permet également d'observer une augmentation de 38 à 45 % de la biomasse racinaire et un accroissement de 15 % de la longueur des racines traitées (Cooper et al., 1998).

De nombreuses études montrent que l'ajout de SH aux cultures hydroponiques favorise la croissance des parties aériennes (Chen and Aviad, 1990; Vaughan and Malcom, 1985b). Les principaux effets s'observent sur la production de biomasse de feuilles, de fleurs, de tiges et de fruits.

L'étude de l'impact des acides humiques sur la croissance du teck (*Tectona grandis* L.f.) permet de corrélér positivement la concentration de matière humique avec la hauteur des plantes, le diamètre de la tige et la teneur en matière sèche totale (Fagbenro and Agboola, 1993)

D'autres travaux comparant les effets des substances humiques sur le maïs et les algues, révèlent une augmentation de 30 à 50 % de la biomasse du maïs pour une concentration de 5 mg.L⁻¹ et de 100% de la biomasse des algues pour une concentration de 60 mg.L⁻¹ (Lee and Bartlett, 1976).

La concentration des substances humiques joue un rôle important sur la réponse des végétaux. Il existe une concentration optimale d'application qui varie d'une plante à l'autre (Lee and Bartlett, 1976). Comme la germination, la croissance des plantes est inhibée par de fortes concentrations (Chen and Aviad, 1990).

2.3.2.1.3 Métabolisme auxinique

L'impact des SH sur la croissance des végétaux a longtemps été attribué à une action de type hormonale (Bottomley, 1917; O'Donnell, 1972) et de nombreux auteurs comparent l'effet des substances humiques à une activité auxinique, AIA (Muscolo et al., 1999b; Pizzeghello et al., 2001). Ainsi l'utilisation de fraction humique permet le développement de racines à partir d'explants de feuilles (Nardi et al., 1994). La présence de structure auxinique (noyau indole) dans la composition des SH (Muscolo et al., 1998) confirme cette hypothèse mais ne permet pas de conclure quant à leur activité. En effet, les mécanismes physiologiques induisant ces effets positifs sont mal connus et aucune fraction chimique responsable de ces activités n'a jamais été identifiée.

L'activité hormonale prêtée aux substances humiques est vraisemblablement réalisée de manière indirecte. La détection de structure auxinique au sein des substances humiques de sol ou de compost peut être attribuée à une origine végétale ou microbienne (Lebuhn and Hartmann, 1993), ces structures exprimant une potentielle activité hormonale exogène (Frankenberger and Arshad, 1995).

De plus, la pénétration de fraction humique de faible poids moléculaire peut stimuler l'activité hormonale (Nardi et al., 1988). L'action des substances humiques sur l'activité hormonale s'exprime via des interactions avec les mécanismes de régulation du métabolisme auxinique. Les SH stimulent la production d'auxine endogène, ou inhibent l'action de l'AIA oxydase, enzyme responsable de la dégradation de l'auxine (Mato et al., 1972b). Cette inhibition augmente avec la concentration des acides humiques et fulviques et provoque l'accumulation d'auxine dans les végétaux.

2.3.2.2 *Développement des plantes*

Outre leurs impacts sur la croissance, les SH peuvent induire des différenciations cellulaires impliquant de nouvelles propriétés morphologiques et fonctionnelles. Ces modifications qualitatives se traduisent par l'apparition de nouveaux organes (feuilles ou fleurs).

Ainsi, des ajouts de compost sur le *Pélargonium x hortorum* cultivé en substrats solides montrent un accroissement significatif du nombre de bouquets floraux par plante, et du nombre de fleurs par bouquet floral pour des teneurs allant jusqu'à 20% de compost en volume (Ribeiro et al., 2000). De la même façon, Rauthan et Schnitzer (1981) constatent la production accrue de fleurs par plante en présence de 100 à 300 ppm d'acides fulviques dans le milieu de culture. Parallèlement, le nombre de feuilles par plante évolue de manière similaire au témoin, dans les deux expériences.

Les tests réalisés avec les SHB présentent également des résultats positifs sur le nombre de feuilles et de fleurs du pélagonium (Galy, 2000; 2002) et sur la floraison du bégonia (Morard et al., 2003). Ces travaux montrent une influence favorable sur le développement qui se traduit par une mise à fleur plus précoce.

2.3.2.3 *Nutrition minérale*

La croissance des plantes est largement influencée par leur nutrition minérale, l'eau et l'air fournis aux racines. Les effets des SH sur la croissance des végétaux sont généralement liés à l'absorption élevée d'éléments minéraux (Lulakis and Petsas, 1995; Tan and Nopamornbodi, 1979)

Plusieurs études démontrent que les substances humiques favorisent le prélèvement des éléments minéraux par les végétaux (Chen and Aviad, 1990). L'absorption des macroéléments (N, P, K, Mg, Ca) et des micro-éléments (Cu, Fe, Zn.) augmente en présence d'acides humiques (De Kreij, 1995), d'acides fulviques (Rauthan and Schnitzer, 1981), de compost (Bauduin et al., 1986) ou de léonardite (Fernandez-Escobar et al., 1996). Ces effets s'observent pour des plantes cultivées en sol (Fagbenro and Agboola, 1993) ou en solution nutritive (Ayuso et al., 1996).

La solubilisation des éléments minéraux est un facteur essentiel dans la stimulation de la croissance des plantes. L'influence des SH sur la nutrition minérale des végétaux s'explique par une action directe sur la disponibilité des éléments. La présence de substances humiques dans le

sol influe sur la fertilité et les réserves minérales en favorisant la libération et la dissolution des macroéléments contenus dans les composants minéraux du sol (Chen et Aviad, 1990).

Le transport des ions et leur positionnement sous forme de complexes autour de la rhizosphère conditionnent l'absorption des éléments minéraux. Par leurs propriétés physico-chimiques, les SH complexent les éléments minéraux et favorisent leur absorption par les plantes. Ainsi, des granulés d'humates incorporés au sol accroissent la fertilité du sol, améliorent l'efficacité de l'eau et la rétention des éléments indispensables aux plantes au niveau de la rhizosphère (Cooper et al, 1998).

Enfin, la nutrition minérale peut être affectée de manière indirecte par les substances humiques. La modification structurale du système racinaire (§2.3.2.1.2) augmente le nombre de racines et la surface d'échange efficace et permet une meilleure absorption des éléments minéraux.

De plus, les substances humiques interfèrent avec les processus métaboliques mis en jeu lors de l'absorption active des éléments (Canellas et al., 2002; Vaughan and Malcom, 1985b). La stimulation de la consommation d'éléments minéraux par les traitements humiques, traduit l'impact de ce matériel sur les protéines de transport des ions (Maggioni et al., 1987; Pinton et al., 1999b).

L'absorption des éléments par la racine est cependant fortement dépendante de la concentration des substances humiques dans le milieu, les fortes teneurs restant inhibitrices (Vaughan and Malcom, 1985b). L'effet conjugué des éléments minéraux et des substances humiques sur la croissance des végétaux évoque une action synergique de ces deux types de composés.

2.3.2.4 Effets sur les mécanismes cellulaires

Les principales réponses des plantes aux effets des SH s’observent sur des paramètres biométriques. Ces effets stimulants traduisent l’impact des fractions humiques sur différents mécanismes physiologiques impliqués dans la croissance et le développement de la plante. L’emploi des techniques de biochimie et de biologie moléculaire permet d’envisager l’étude des SH de manières différentes. Les nouvelles approches développées visent à comprendre l’impact des SH sur les mécanismes cellulaires (Nardi et al., 2002). La figure 14 regroupe et schématise les hypothèses émises sur les effets directs des SH sur le métabolisme de la plante.

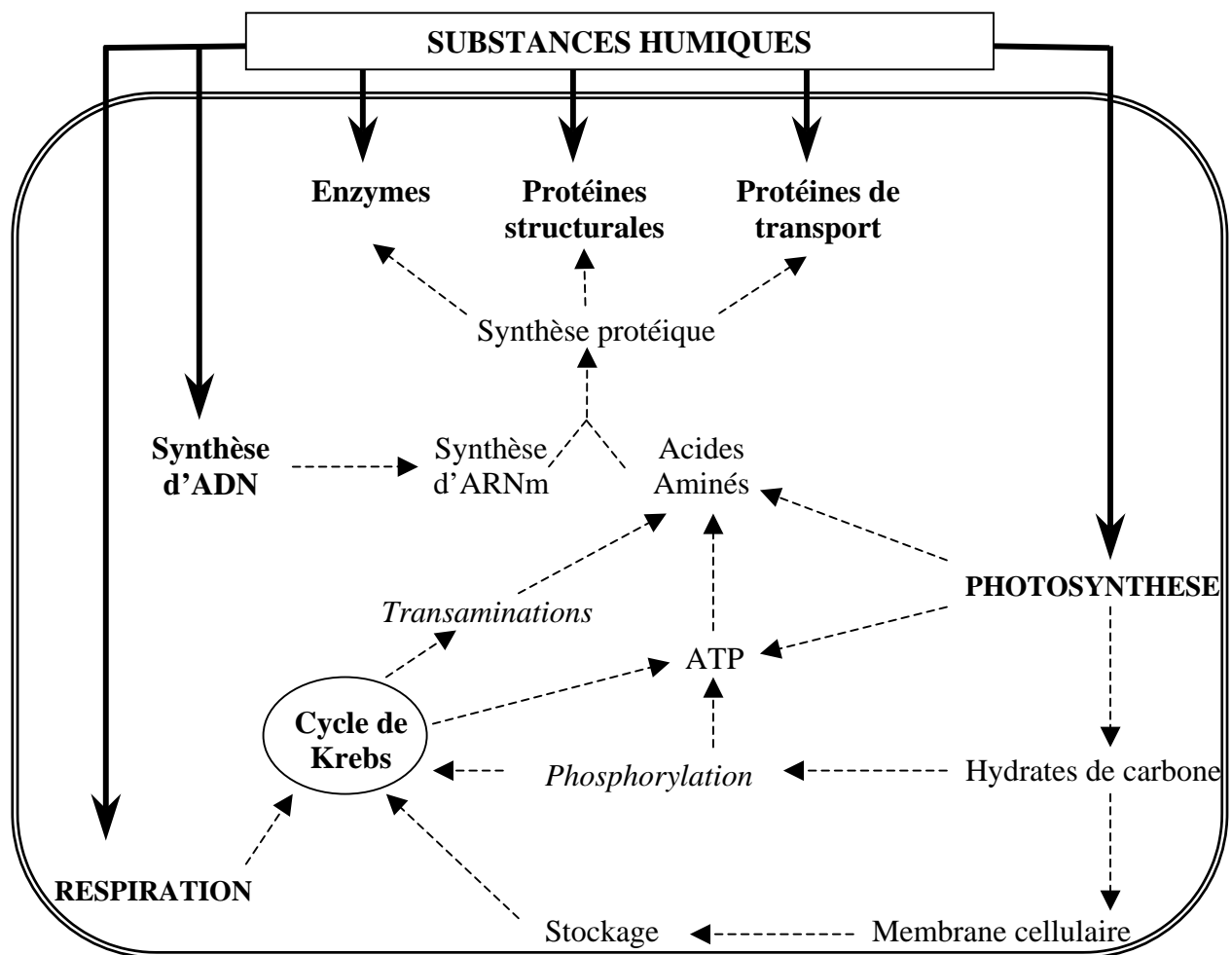


Figure 14 - Impacts des SH sur le métabolisme cellulaire des plantes (d’après Vaughan, 1985)

2.3.2.4.1 Pénétration des substances humiques

L’hypothèse précisant le rôle direct des substances humiques sur les plantes et leurs influences sur les processus métaboliques, implique la pénétration du matériel humique au sein des

végétaux. L'utilisation d'acides humiques marqués au ^{14}C permet de suivre l'absorption et la translocation des composés humiques dans la plante. L'accumulation des acides humiques s'effectue principalement dans la racine et une faible fraction est transférée vers les parties aériennes (Vaughan and Linehan, 1976). Les fractions fulviques, de faibles poids moléculaires, sont prélevées activement et de façon préférentielle par les plantes (Vaughan and Malcom, 1985b). Leur translocation dans les parties aériennes est plus importante. La majorité des molécules humiques radioactives se retrouve dans les cellules pariétales et une faible quantité dans le cytoplasme pouvant influencer les processus physiologiques et biochimiques. La croissance des plantes peut être envisagée comme le résultat d'effets en cascade portant sur ces processus.

2.3.2.4.2 Métabolisme énergétique

L'effet direct des substances humiques sur la croissance intervient au niveau des processus métaboliques énergétiques comme la respiration, la photosynthèse ou la synthèse protéique. L'action des substances humiques sur ces processus modifie la production de métabolites énergétiques (ATP) et affecte la croissance des plantes. De nombreuses études montrent que les substances humiques d'origine diverse améliorent la respiration des végétaux (Nardi et al., 2002; Vaughan and Malcom, 1985b). L'augmentation de l'activité respiratoire se traduit par une consommation d'oxygène importante et s'observe suite à l'application foliaire ou en solution nutritive des matières humiques (Vaughan and Malcom, 1985b). Dans certaines conditions notamment au niveau du sol, l'action des fractions humiques sur la respiration est considérée comme indirecte. Les molécules servant de substrat à la microflore, l'activité microbienne génère des sous produits favorisant la croissance de la plante et sa respiration.

En condition de culture hydroponique, les substances humiques peuvent agir de manière directe sur la respiration. L'incorporation de formes solubles d'humâtes dans la chaîne respiratoire des mitochondries améliore leur fonctionnement en agissant comme catalyseurs accepteurs d'hydrogène. La présence de groupements quinones et leur capacité à former des complexes donneurs et accepteurs d'électrons, expliquent la participation des fractions humiques aux processus d'oxydoréduction.

L'utilisation des substances humiques provoque également l'augmentation de la teneur en chlorophylle (Tejada and Gonzalez, 2004). Il en résulte une assimilation photosynthétique supérieure favorisant la production d'ATP, d'acides aminés, de sucre et protéines, donc la croissance des plantes (Vaughan and Malcom, 1985b).

2.3.2.4.3 Synthèse de protéines et d'acides nucléiques

Les substances humiques modifient la synthèse des acides nucléiques, ADN et ARN, et influencent particulièrement la production d'ARN messenger, essentiel dans de nombreux processus biochimiques (Nardi et al., 2002). Les changements dans la synthèse d'ARN reflètent les modifications de la croissance de la plante. Étant fortement liée à la transcription et la traduction, la synthèse protéique, en particulier la synthèse enzymatique, subit également l'influence des substances humiques. L'action des fractions humiques est ciblée sur la synthèse de certaines protéines de structure et d'enzymes telles que les invertases, les catalases et les peroxydases (Malcolm and Vaughan, 1979a; b; Nardi et al., 2000; Vaughan and Malcolm, 1979).

2.3.2.4.4 Activités enzymatiques

L'effet direct des substances humiques sur la croissance des plantes implique l'interaction de plusieurs processus biochimiques de stimulation et d'inhibition. La variabilité des effets dépend de la nature et de la concentration des acides humiques. Il existe une relation entre la structure des substances humiques, leur composition et leur activité biologique (Sessi et al., 2001). Les nombreuses fonctions carboxyles et hydroxyles, généralement présentes dans la structure des substances humiques, sont souvent citées pour expliquer l'activité biochimique potentielle des substances humiques (Mato et al., 1972a; Pflug and Ziechmann, 1981).

2.3.3 Conclusions

Les effets des substances humiques sur les végétaux sont nombreux et variables et induisent généralement une augmentation de la biomasse des plantes. Ils s'expriment de manière indirecte via la nutrition minérale, en améliorant la biodisponibilité des éléments minéraux, ou de manière directe, impliquant l'assimilation des molécules organiques qui modifient les processus biochimiques et le métabolisme cellulaire des plantes. Ces effets s'avèrent positifs ou négatifs selon les conditions expérimentales testées. Plusieurs niveaux de variabilité interviennent dans l'étude de l'impact biologique des matières humiques. Ainsi, en fonction de l'origine, de la nature du matériel humique, des plantes testées mais aussi des conditions d'expérimentations, les réponses aux fractions humiques peuvent varier (Chen and Aviad, 1990; Vaughan and Linehan, 1976).

3 MATRIELS ET METHODES

3.1 PROCEDE DE SYNTHESE ET EXTRACTION DES SUBSTANCES HUMIQUES

Le procédé de synthèse de substances humiques développé au sein de l'équipe du Professeur Morard, s'inscrit parmi les voies de transformations physico-chimiques de la matière organique. Cette technique s'avère originale, rapide et aboutit à la formation de molécules humiques liquides, stables et reproductibles (Richard 2002). Elle comprend deux phases, distinctes par leur application et leurs effets. En premier lieu, le matériel végétal sec est soumis à une température élevée. L'objet de cette attaque thermique est de déstructurer la matière en rompant les liaisons inter et intra moléculaires. La seconde phase consiste à extraire les molécules solubles au moyen d'une solution alcaline, classiquement employée dans les sciences du sol pour l'extraction des substances humiques. Cette étape est réalisée sous pression et température élevée. Après filtration, la réaction finale génère deux types de produits de transformation, une phase solide brune résiduelle de la matière première et une phase liquide concentrée, noire contenant les substances humiques néoformées (figure 15.) Le stockage des solutions humiques est effectué en chambre froide, à 4°C, à l'obscurité, pour limiter toute évolution de leur composition (Richard, 2000). Les résidus de production sont séchés à l'étuve à 60° C et conservés secs.

Au fur et à mesure de l'avancement de travaux, le procédé de synthèse a fait l'objet de nombreux développements. Un transfert technologique, réalisé en collaboration avec le laboratoire de Génie Chimique (LGC) et le Centre d'Application et de Traitement des Agroressources (CATAR), a permis d'optimiser le processus de transformation via un système automatisé de type extrudeur bi-vis. L'utilisation de cet appareil permet de faire subir à des matières très diverses de nombreux traitements en continu. L'adaptation de la configuration, du profil de vis et des conditions opératoires permet d'exploiter le réacteur bi-vis comme un extracteur-raffineur des constituants de la matière végétale (Prat, 1998). L'extrudeur bi-vis comprend deux vis entraînées par un moteur, qui tournent dans un fourreau régulé thermiquement, une entrée permettant d'introduire la matière première, divers modules d'injection de la solution extractante et une sortie équipée d'un filtre assurant la séparation des deux phases et générant un flux permanent de SH et de résidus. Notons qu'aux dégradations thermiques et chimiques réalisées en extrudeur s'ajoute une dégradation mécanique due au principe de fonctionnement de la machine (bi vis à pas inversé).

Les échantillons étudiés dans ce travail proviennent du procédé original utilisé au laboratoire et d'un même lot de fabrication produit, en extrudeur, au CATAR de l'Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques (ENSIACET. Pour

l'ensemble des échantillons, les produits de transformations solides et liquides ont été analysés.

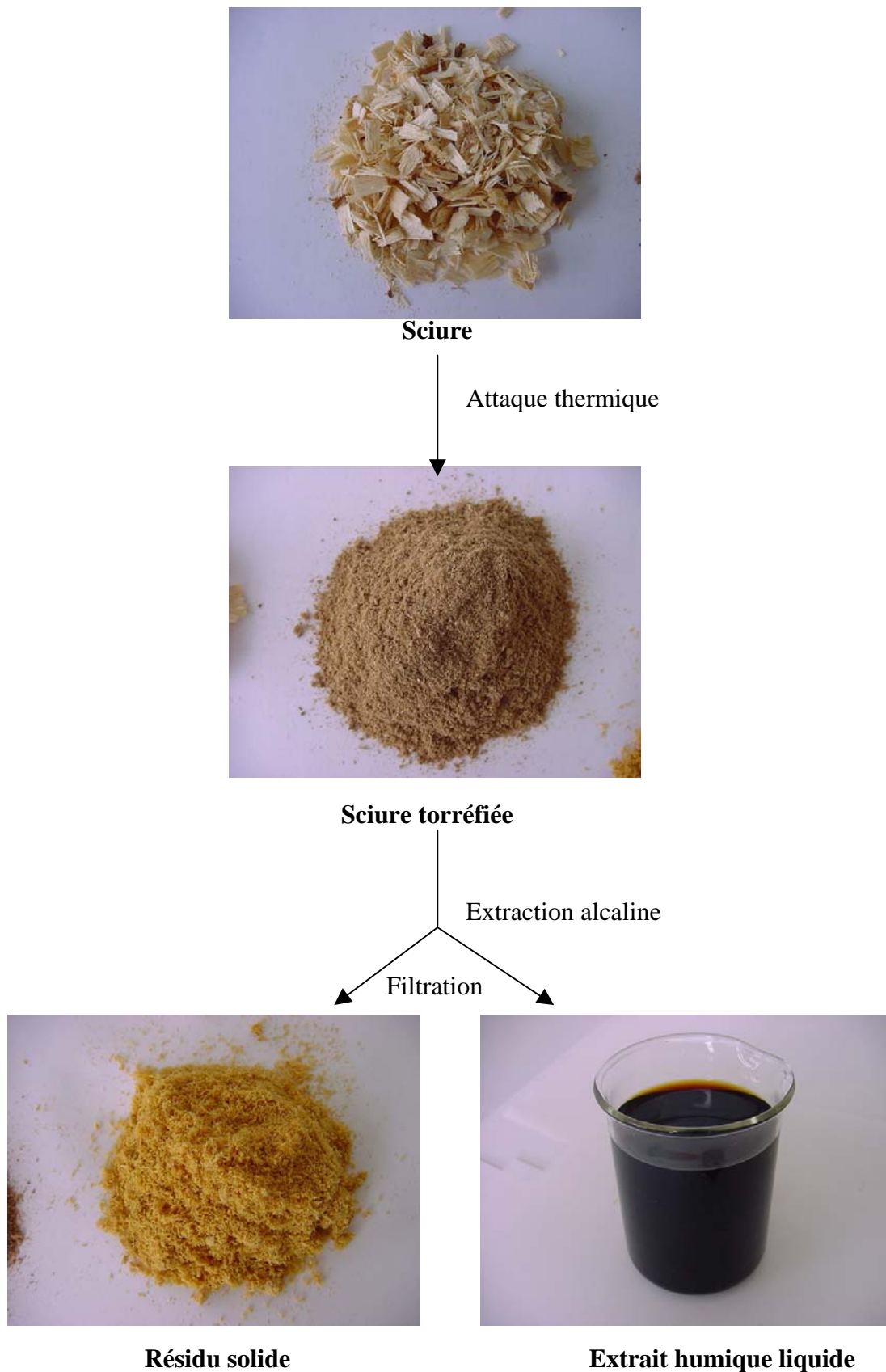


Figure 15 : Schématisation du procédé de fabrication

3.2 MATIERE PREMIERE UTILISEE ET ECHANTILLONS

Le procédé de fabrication, mis au point au laboratoire, a permis de synthétiser des substances humiques à partir de quatre matières premières différentes : la sciure de peuplier et les trois constituants primaires du bois (la cellulose, l'hémicellulose et la lignine).

3.2.1 La sciure

La sciure de peuplier a été choisie comme matière première pour des raisons économiques géographiques et techniques. L'abondance des déchets de production issus des activités de la filière bois, permet un approvisionnement régulier en matière première, facilité par la localisation géographique de ces activités (populi culture). Les tests réalisés sur différentes essences de bois montrent que la composition de l'essence de peuplier n'engendre aucun problème technique lors du procédé de transformation, à l'inverse des essences de résineux qui, trop chargée en polysaccharides, provoquent la formation d'un mélange visqueux. La sciure de peuplier provient de résidu de production d'une société d'emballage du Tarn et Garonne. Elle est produite suite au tronçonnage des billes de peuplier, préalable au déroulage et façonnage du bois en cagette d'emballage. Les copeaux de peuplier utilisés sont blancs et de nature tendre, leur granulométrie est régulière (de 0,2 à 0,5 cm). Avant toutes transformations, la sciure est séchée jusqu'à obtention d'une teneur en eau de 5 à 10 % du poids sec. Au cours de ce travail, les substances humiques formées à partir de sciure de peuplier seront nommées (S).

La composition en constituants primaires du bois variant selon les espèces, il est nécessaire de contrôler la composition de la matière première afin d'assurer une bonne reproductibilité du procédé de fabrication et de limiter les variations de composition du produit final. Le tableau 3 indique les caractéristiques chimiques de la sciure de peuplier.

Humidité	5 à 10
Protéine	0.8
Carbone organique	52.0
Azote total	0.1
C / N	520
Glucides membranaires	94.4
Cellulose	55.3
Lignine	25
Hémicellulose	14.1
Fraction minérale	1.05
Na ⁺	0.01
K ⁺	0.46
Ca ⁺⁺	0.6
Mg ⁺⁺	0.1

Tableau 3 - Caractéristiques chimiques de la sciure de peuplier (en % de m. s.)

3.2.2 Les constituants primaires du bois

Afin de mieux appréhender les mécanismes de formations des SH, il est nécessaire d'observer les réactions de transformations se produisant au niveau moléculaire de la structure du bois. L'étude de la dégradation des constituants primaires selon les conditions des fabrications expérimentales permet d'apporter des informations sur les modifications de la matière organique et d'essayer de mieux comprendre la déstructuration du bois. Ainsi, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont utilisées comme matières premières. L'extraction et la purification de ces trois constituants à partir de sciure comportent des difficultés techniques qui induisent des limites quantitatives et qualitatives à leur étude. Dans un souci d'homogénéité des matières premières utilisées, il s'est avéré plus simple et plus rapide de travailler avec des produits commerciaux :

- Cellulose: α cellulose - Aldrich Chemical Company, Inc. St. Louis, MO-USA (cat N° C 8002)
- Hémicellulose : constituée à plus de 95 % de xylane - Aldrich Chemical Company, Inc. St. Louis, MO-USA (cat N° 36. 355. 3)
- Lignine: Aldrich Chemical Company, Inc. St. Louis, MO-USA (cat N° 37. 101. 7)

Enfin, la dégradation de ces trois constituants a été observée en réalisant un mélange correspondant à la composition de la sciure de peuplier (respectivement 55% de cellulose, 14% d'hémicellulose, 25% de lignine). Ce témoin permet de considérer la dégradation des constituants en condition de mélange et de comparer avec les réactions se produisant dans le cas des constituants seuls et de la sciure.

Toutes ces matières premières ont été soumises au procédé de fabrication et ont permis de produire cinq échantillons liquides différents et cinq résidus solides qui correspondent à :

- Un extrait humique liquide issu de la transformation de la sciure, noté (S),
- Un extrait humique liquide issu de la transformation de la cellulose, noté (C),
- Un extrait humique liquide issu de la transformation de l'hémicellulose, noté (H),
- Un extrait humique liquide issu de la transformation de la lignine, noté (L),
- Un extrait humique liquide issu de la transformation d'un mélange constitué des trois constituants primaires du bois dans des proportions équivalentes à la composition du peuplier, noté (M).

A chaque extrait liquide correspond un résidu solide noté respectivement RS, RC, RH, RL, RM. Le tableau 4 résume la composition des échantillons et la codification employée pour les désigner.

	Composition de base (%)			Code	
	Cellulose	Hémicellulose	Lignine	SH Liquide	Résidu
Cellulose (C)	100	-	-	C	RC
Hémicellulose (H)	-	100	-	H	RH
Lignine (L)	-	-	100	L	RL
Mélange (M)	55.3	14.1	25	M	RM
Sciure (S)	55.3	14.1	25	S	RS

Tableau 4 - Composition et codes des échantillons transformés.

3.3 METHODES DE CARACTERISATION DES SUBSTANCES HUMIQUES

Les méthodes de caractérisation des substances humiques sont nombreuses et variées, elles permettent de décrire de manière qualitative et quantitative ces macromolécules. L'étude des SH comprend plusieurs étapes déterminant la composition, la structure et les propriétés des échantillons. Les techniques d'analyses utilisées pour caractériser les différents produits sont décrites en suivant les aspects physico-chimiques, structuraux et moléculaires des SHB. Trois types d'échantillons sont analysés dans la suite des travaux : les différentes matières premières, les phases liquides contenant les SH et les résidus solides de production.

3.3.1 Préparation des échantillons

3.3.1.1 La dialyse

Les SHB, suite à leur extraction, nécessitent une préparation avant d'être analysées. En effet, la présence d'éléments minéraux dans les solutions de substances humiques peut perturber certaines analyses (RMN, spectroscopie infra rouge, dosage des groupements fonctionnels) en générant des artefacts. Les différentes solutions sont donc purifiées par dialyse. Cette technique permet de séparer les molécules selon leur poids moléculaire grâce à l'utilisation de membranes semi-perméables dont les pores permettent aux particules de petite taille (ions, solvants) de diffuser à travers la membrane. Les composés de poids moléculaire inférieur au seuil de coupure de la membrane utilisée sont éliminés, les molécules de taille plus importante sont conservées à l'intérieur de la membrane.

Dans le cas présent, cette technique est utilisée pour purifier les SHB des ions (principalement K^+) apportés aux solutions lors du procédé de fabrication. La dialyse s'effectue dans des membranes d'ester cellulose de porosité 100 Da (Spectra/Por CE®). Pour éviter la détérioration des membranes, le pH initial des solutions de substances humiques est ramené à 7,3 avec 5 ml d' HNO_3 (1N), respectant ainsi les conditions d'utilisation du fabricant. Des membranes de 30 cm de long sont remplies avec 50 ml de solution à purifier et mises à dialyser contre 5 litres d'eau distillée pendant 4 jours. Le renouvellement de l'eau de dialyse s'effectue toutes les 24 heures, le suivi journalier de sa conductivité permet d'observer l'avancement de la purification. La dialyse est arrêtée lorsque la conductivité de l'eau de dialyse est constante et proche de 0. Les échantillons dialysés sont conservés à 4°C avant d'être lyophilisés.

3.3.1.2 La lyophilisation

La réalisation de certaines analyses nécessite des échantillons en phase solide. Une étape de lyophilisation permet d'éliminer l'eau des échantillons par congélation et sublimation. Les échantillons dialysés sont congelés dans l'azote liquide puis placés dans le lyophilisateur (Christ $\alpha 1-2$) dans des conditions permettant la sublimation des molécules d'eau (-49°C et 0,05 atm). Après 4 jours de lyophilisation les échantillons solides sont stockés dans un dessiccateur à l'obscurité.

3.3.2 Analyses physico-chimiques

Les échantillons de matières premières végétales (sciure), les résidus de fabrication et les extraits liquides ont été analysés par différentes techniques (tableau 5). Les principes de ces méthodes et les modes opératoires sont présentés ci-après.

	Matière première	Résidu	Extrait liquide
Analyses élémentaires	✓	✓	✓
Calcul du taux de cendre	✓	✓	✓
Dosage du carbone organique			✓
Acidité totale, carboxylique phénolique			✓
Analyse minérale	✓	✓	✓
Analyses des fibres	✓	✓	
Séparation des acides humiques et fulviques			✓
Spectrophotométrie UV Visible			✓
Chromatographie d'exclusion			✓
Spectrométrie infrarouge			✓
Microscopie électronique à balayage	✓	✓	✓

Tableau 5 - Plan expérimental des analyses effectuées

3.3.2.1 Analyses élémentaires

L'analyse élémentaire permet de connaître la composition en éléments chimiques de la matière. Les teneurs en carbone (C), azote (N) et hydrogène (H) des échantillons de SH dialysés et lyophilisés, ainsi que des matières premières et de leurs résidus sont déterminés par un analyseur LECO 800. La teneur en oxygène (O) est obtenue par soustraction de la somme des teneurs C, H et N à 100%.

3.3.2.2 Calcul du taux de cendre

La teneur en matière minérale des échantillons est déterminée après calcination. 1g de matière première sèche est placé dans un creuset en porcelaine puis mis au four pour subir des températures progressives jusqu'à un maximum de 600°C pendant 10 heures, palier permettant la destruction de la matière organique. Le taux de cendre contenu dans l'échantillon se calcule de la manière suivante :

Taux de cendres (%) : $(WC/WS) \times 100$

WC : masse de l'échantillon après calcination

WS : Masse de l'échantillon

La mesure de la différence entre le poids sec initial et le poids sec final permet de déduire la teneur en matière minérale de l'échantillon. Le taux de cendres est déterminé sur les échantillons de SH dialysés et lyophilisés, les matières premières et les résidus de production.

3.3.2.3 Dosage du carbone organique

La détermination du carbone organique est utilisée pour caractériser les SH pour plusieurs raisons. Le carbone est un élément majeur dans la composition des molécules organiques. Il est présent de manière stable au sein de ces molécules (55%) et constitue l'essentiel de leur structure.

La teneur en carbone est déterminée sur les échantillons liquides des SHB mais également sur les fractions humiques et fulviques pour estimer leur concentration dans le liquide.

Cette teneur est déterminée par une méthode de dosage en retour par le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) (AFNOR, 1994) sur les échantillons liquides.

Le carbone organique est oxydé par une quantité connue de $K_2Cr_2O_7$ en milieu sulfurique. La quantité de $K_2Cr_2O_7$ réduite (= oxygène consommé lors de la réaction) est proportionnelle à la quantité de carbone oxydé. L'excès de $K_2Cr_2O_7$ est réduit par une quantité connue de sel de Mohr (0.5 N). L'excès de sel de Mohr est dosé par titrage au $K_2Cr_2O_7$ de potassium, grâce à un indicateur coloré, la diphénylamine (annexe 1).

3.3.2.4 Acidité totale, carboxylique et phénolique

La technique de dosage des acidités carboxyliques, phénoliques et totales nécessite des échantillons solides. L'analyse des groupements fonctionnels est réalisée sur les échantillons de SH dialysés et lyophilisés, par des méthodes de titration potentiométriques (Schnitzer and Khan, 1978). Ces techniques consistent à mesurer la quantité d'ions H^+ titrables présents dans un échantillon, en utilisant la relation : $pH = -\log (H^+)$

L'acidité totale est déterminée par un dosage retour de l'hydroxyde de baryum $Ba(OH)_2$. Les groupements acides réagissent avec un excès de baryte et l'hydroxyde de baryum restant est dosé par un acide (HCl). L'acidité carboxylique est déterminée par un dosage retour de

l'acétate de calcium par la soude. Les groupements carboxyles réagissent avec l'acétate de calcium et libèrent de l'acide acétique, dosé en retour par une solution de soude. L'acidité phénolique s'obtient par différence entre l'acidité totale et l'acidité carboxylique. Toutes ces acidités sont exprimées en mmol.g⁻¹ de substances humiques. Le dosage des acidités totales et carboxyliques est réalisé en deux étapes (annexe 1) :

- dosage de l'échantillon
- dosage d'un blanc servant de référence.

3.3.2.5 Détermination du pouvoir complexant

La détermination du pouvoir complexant d'une solution est réalisée par suivi potentiométrique et conductimétrique de la réaction de complexation d'un cation (calcium) par une molécule organique.

L'acide ethylènediamine tétraacétique (EDTA), connu pour former des complexes stables avec le calcium en milieu alcalin est utilisé comme molécule de référence pour suivre la complexation du calcium par les molécules organiques. La complexation du calcium par les SHB sera comparée aux résultats obtenus avec l'EDTA pour déterminer le pouvoir complexant des extraits humiques.

L'étude des réactions de complexation du calcium par l'EDTA et les SHB est réalisée à pH variable et à pH constant (annexe 1).

3.3.2.6 Analyse minérale

La détermination des teneurs en éléments minéraux est réalisée par deux méthodes différentes. Le dosage des macroéléments est réalisé par chromatographie échangeuse d'ions de type DIONEX (DX100®). L'appareil utilisé comporte deux colonnes permettant de doser séparément les cations et les anions. Chaque colonne est constituée d'une phase mobile (éluant) et d'une phase statique (résine échangeuse). Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution. Le support peut être minéral, mais il est le plus souvent organique (résine de copolymérisation, polyosides : dextrans ou celluloses). Les groupements fonctionnels chargés des résines sont fixés par covalence sur le support. L'élution consiste à déplacer l'ion fixé par

un autre, de densité, de charge et de concentration plus élevée. On utilise de petits ions fortement chargés (Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+). La force d'association entre les molécules chargées et la matrice dépend de la force ionique et du pH de la solution d'élution. La vitesse de migration des ions dosés dépend de leur affinité pour la phase statique. Les ions sont dosés au cours du temps et leur concentration est mesurée par conductivité électrique.

L'analyse des micro-éléments et des macroéléments cationiques est effectuée par spectrométrie d'absorption atomique (Aanalyst100 PERKIN-ELMER ®) suite à la minéralisation des échantillons par voie humide. L'échantillon est vaporisé, par aspiration de la solution, dans une flamme produite par la combustion d'un mélange air-acétylène. L'échantillon nébulisé passe à l'état atomique. Le dosage des éléments minéraux s'effectue soit en absorption (Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} , Zn^{++}) soit en émission (K^+). Lors du dosage en absorption, une lampe appropriée émet les longueurs d'onde caractéristiques de l'élément recherché. La lumière émise est absorbée par les atomes restés à l'état fondamental. L'absorption est directement proportionnelle à la concentration de l'élément. En spectrométrie d'émission, lorsque les atomes d'un élément ont été excités, leur retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission d'une lumière qui est dosée.

3.3.2.7 Analyses des fibres

La répartition des principaux constituants du bois est déterminée par attaque successive des protéines, de l'hémicellulose et de la cellulose. L'analyse des constituants pariétaux consiste à peser le poids sec d'un échantillon avant et après chaque étape de dégradation. Elle permet de distinguer chez les végétaux trois grandes fractions (Van Soest and Wine, 1968).

Le NDF (Neutral Detergent Fiber), qui est le résidu après une attaque au détergent neutre, permet de connaître la teneur totale en glucides pariétaux. La teneur en NDF représente la somme des teneurs en hémicellulose, cellulose et lignine.

L'ADF (Acid Detergent Fiber), qui est le résidu après une attaque avec un détergent acide, représente la somme des teneurs en cellulose et en lignine.

Enfin l'ADL (Acid Detergent Lignin), résidu obtenu après attaque du résidu (ADF) par du permanganate de potassium, permet d'estimer la teneur en lignine.

L'analyse des échantillons de sciure brute, torréfiée et extraite est réalisée sur un appareil de type Fibertec (Tecator ®). Le protocole détaillé est présenté annexe 1.

3.3.3 Techniques d'analyses moléculaires et structurales

3.3.3.1 Séparation des acides humiques et fulviques

Le principe de séparation des acides humiques (AH) et des acides fulviques (AF) des SH repose sur leur différence de solubilité à pH acide (Figure 3 p13). Dans un godet à centrifugation, le pH des SHB est abaissé de 13 à 2 par l'ajout d'H₂SO₄ concentré favorisant ainsi la précipitation des acides humiques. Les échantillons sont placés sur table d'agitation pendant 2 heures puis stockés en chambre froide une nuit. Les godets sont centrifugés 30 minutes à 6000 tours /min permettant la séparation des fractions humiques et fulviques en deux phases. La phase soluble (AF) est prélevée et la phase insoluble (AH précipités) est remise en solution à l'aide de soude (NaOH) 1N. Les concentrations en carbone organique de chaque fraction sont déterminées par dosage au dichromate de potassium (§ 3.3.2.3).

La quantité totale de carbone de chaque fraction est calculée :

Concentration de la fraction x volume total de la fraction

Le pourcentage de chaque fraction est exprimé en fonction de la quantité totale de carbone de l'échantillon de départ :

$$\% AH = (quantité AH \times 100) / (quantité AH + AF)$$

Le rapport AH/AF exprime les proportions respectives des fractions humiques et fulviques dans un échantillon.

3.3.3.2 Spectrophotométrie UV-Visible - Rapport E₄₇₂/E₆₆₅

L'absorption moléculaire dans la région UV est directement liée à la structure électronique de la molécule. Les rayonnements ultraviolets peuvent exciter les atomes en fournissant aux électrons des couches externes suffisamment d'énergie pour atteindre des niveaux d'énergie plus élevés. La structure électronique étant différente suivant les molécules, les spectres d'absorption correspondant sont différents. Les spectres d'absorption des substances humiques ont été observés entre 200 nm et 400 nm, à des valeurs de pH différentes.

Le rapport de Welt (ratio E_4/E_6) est largement employé pour caractériser le matériel humique. Il est déterminé par la mesure des absorbances à 472 nm (E_4 pour E_{472}) et 665 nm (E_6 pour E_{665}) de solutions humiques diluées.

De nombreux paramètres agissent sur la valeur de ce rapport et rendent son interprétation difficile :

- Le ratio E_4/E_6 varie selon le type d'extrait humique mais il est indépendant de la concentration en matières humiques (Chen et al., 1977; Kononova, 1966; Schnitzer and Khan, 1972). Notons cependant que la mesure de l'absorbance à 472 nm et 665 nm est impossible pour des concentrations de solutions trop élevées.
- Le ratio E_4/E_6 varie inversement au poids moléculaire (PM) des particules. Les particules de PM élevé (acides humiques) présentent un ratio faible (<5), celles de PM faible (acides fulviques) présentent un ratio élevé ($5 < E_4/E_6 < 10$) (Chen, 1977).
- En accord avec l'observation précédente, les teneurs en carbone, en oxygène, en groupements carboxyliques et l'acidité totale des molécules, sont corrélées avec le ratio E_4/E_6 . Ainsi, un faible ratio est associé à une forte teneur en carbone, une faible teneur en oxygène, en groupements carboxyliques et une faible acidité totale (caractéristiques des acides humiques). Inversement, un ratio élevé indique une faible teneur en carbone, une forte teneur en oxygène, en groupements carboxyliques et une acidité totale importante (caractéristiques des acides fulviques).
- Le pH influe de manière indirecte sur la valeur du ratio E_4/E_6 . Le ratio augmente avec le pH jusqu'à des valeurs comprises entre 6 et 8.

Les échantillons de SHB sont dilués dans de l'eau distillée pour atteindre une concentration comprise entre 200 et 400 mg.L^{-1} . Leur pH est ajusté entre 6 et 7 (Kononova, 1966 ; Chen et al., 1977). La densité optique des SHB est mesurée dans des cuves en quartz à 472 et 665 nm. Le zéro est établi avec de l'eau distillée.

3.3.3.3 Chromatographie Gel Sephadex

La filtration sur gel permet de séparer les molécules d'une solution selon leur taille et leur forme. Elle permet d'observer la répartition des molécules des SHB en fonction de leur poids moléculaire. Cette chromatographie est constituée d'une phase stationnaire, gel formé par des billes hydratées comportant en surface des pores étroits, et d'une phase mobile constituée

d'un éluant qui entraînera les molécules à travers la colonne. Le tamisage moléculaire repose sur la capacité des molécules à pénétrer dans les pores de la phase stationnaire (① Figure 16). Dans une solution aqueuse, composée de molécules de différentes tailles, traversant une colonne, les grosses molécules ne pénètrent pas dans les pores (② Figure 16 - limite d'exclusion) et sont éluées plus rapidement (③ Figure 16).. Les plus petites entrent dans les pores et se déplacent plus lentement (④ Figure 16).

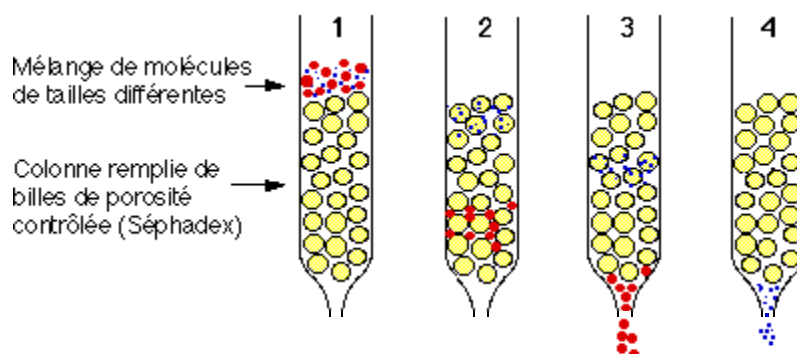


Figure 16 : Principe de la chromatographie d'exclusion

La séparation des molécules est effectuée selon leur vitesse d'éluion, vitesse inversement proportionnelle à la taille et l'encombrement des molécules. La phase stationnaire utilisée est un gel de type sephadex G25 coarse constitué de billes de dextran (polymère de glucose de haut poids moléculaire) permettant de séparer des molécules de 1000 à 5000 daltons. Le type de gel varie selon le poids moléculaire des billes. En fonction du volume final du gel et du coefficient de gonflement des billes, une masse de poudre sèche est déterminée et mise à gonfler dans de l'eau distillée pendant 24 heures. Le gel est ensuite transféré dans une colonne de chromatographie (LKB). Un temps de décantation d'au moins 6 heures doit être respecté afin d'obtenir un gel tassé et un lit de gel plat. Afin d'homogénéiser les conditions de migration, le pH des échantillons est neutralisé à 7 avec de l'acide nitrique (HNO_3). Le volume d'échantillon déposé varie inversement à sa concentration en carbone de manière à ce que chaque échantillon séparé contient la même quantité de carbone. Le dépôt de l'échantillon est réalisé délicatement pour ne pas perturber la surface du lit du gel ce qui diminuerait la résolution de la séparation. L'éluion est réalisée avec de l'eau distillée. Le débit volumétrique est réglé à 20 ml/h. Les volumes élués sont recueillis en fraction de 2 ml et leur densité optique (DO) à 350 nm est déterminée. Les résultats sont exprimés en K_{av} , coefficient qui définit le comportement d'un soluté indépendamment des dimensions du lit du gel ou du remplissage de la colonne.

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

V_e = le volume d'élution d'un soluté est le volume nécessaire pour éluer ce soluté de la colonne après son dépôt sur le gel.

V_t = le volume total du gel (hauteur x surface du gel).

V_o = le volume d'exclusion = volume d'élution nécessaire pour exclure du gel des molécules dont le poids moléculaire est supérieur à la limite haute du gel (volume de l'espace qui entoure les billes). La détermination du volume d'exclusion est mesurée par le volume d'élution d'un soluté de masse moléculaire connue et supérieure à la limite d'exclusion du gel (bleu dextran).

Il est ainsi possible d'établir une relation linéaire entre le K_{av} et le poids moléculaire. Les valeurs du K_{av} sont comprises entre 0 (K_{av} d'exclusion) valeur correspondant aux particules de haut poids moléculaire et 1 (K_{av} maximum) valeur correspondant aux particules de faible poids moléculaire. Un K_{av} supérieur à 1 résulte d'une adsorption des molécules sur la matrice du gel.

3.3.3.4 Spectrométrie infrarouge

La spectrométrie infrarouge est une technique d'analyse structurale fonctionnelle basée sur l'analyse vibrationnelle des liaisons. Elle permet de caractériser les fonctions chimiques de produits organiques. Une molécule soumise à des radiations dans l'infrarouge peut absorber certaines d'entre elles à des longueurs d'onde qui correspondent aux fréquences de vibration des groupements chimiques qui la constituent. La mesure de l'intensité de lumière absorbée à chaque longueur d'onde λ conduit à un spectre caractéristique du produit étudié. Par comparaison avec les spectres d'absorption infrarouge de substances de référence, il est possible d'identifier les substances inconnues. Les analyses sont effectuées en transmission. L'échantillon de SHB lyophilisées est préparé par micropastillage de 1 ou 2 mm dans du bromure de potassium à une concentration d'environ 1% en masse et soumis à une pression de 120 bar/cm. La pastille ainsi formée est analysée au spectrophotomètre (Perkin Elmer). Les spectres d'absorption infra rouge ont été mesurés entre 400 et 4000 cm^{-1} et enregistrés par un logiciel TABEL tous les 1 cm^{-1} . Le spectre obtenu représente $I/I_0 = f(\tau)$ avec I = intensité absorbée, I_0 = intensité initiale, τ nombre d'onde = $1/\lambda$ exprimé en cm^{-1} .

3.3.3.5 *Microscopie électronique à balayage*

Le principe de la microscopie électronique à balayage consiste à explorer la surface d'un échantillon par lignes successives et à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec celui du faisceau incident. Les microscopes à balayage utilisent un faisceau très fin qui balaie point par point la surface de l'échantillon. Sous l'impact du faisceau d'électrons accélérés, des électrons rétro diffusés et des électrons secondaires émis par l'échantillon sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec le balayage de l'objet. La résolution spatiale dépend de l'énergie des rayonnements. Cette nouvelle technologie a permis, du fait de sa profondeur de champ, l'observation du relief d'échantillons massifs. L'échantillon, placé dans la chambre du microscope, reçoit un flux d'électrons très important. L'observation des échantillons nécessite une étape de métallisation, dépôt préalable d'une fine couche conductrice d'or ou de carbone transparent aux électrons afin d'éviter les phénomènes de charge induisant des déplacements d'images dues à des décharges soudaines de la surface. Si la surface est conductrice, les charges électriques sont écoulées par l'intermédiaire du porte-objet. Les observations de la sciure, des résidus de sciure extraits et des SH de sciure dialysée, et lyophilisée ont été réalisées à des grossissements de 40X à 800X.

La figure 17 résume la synthèse et les analyses effectuées sur les différents échantillons

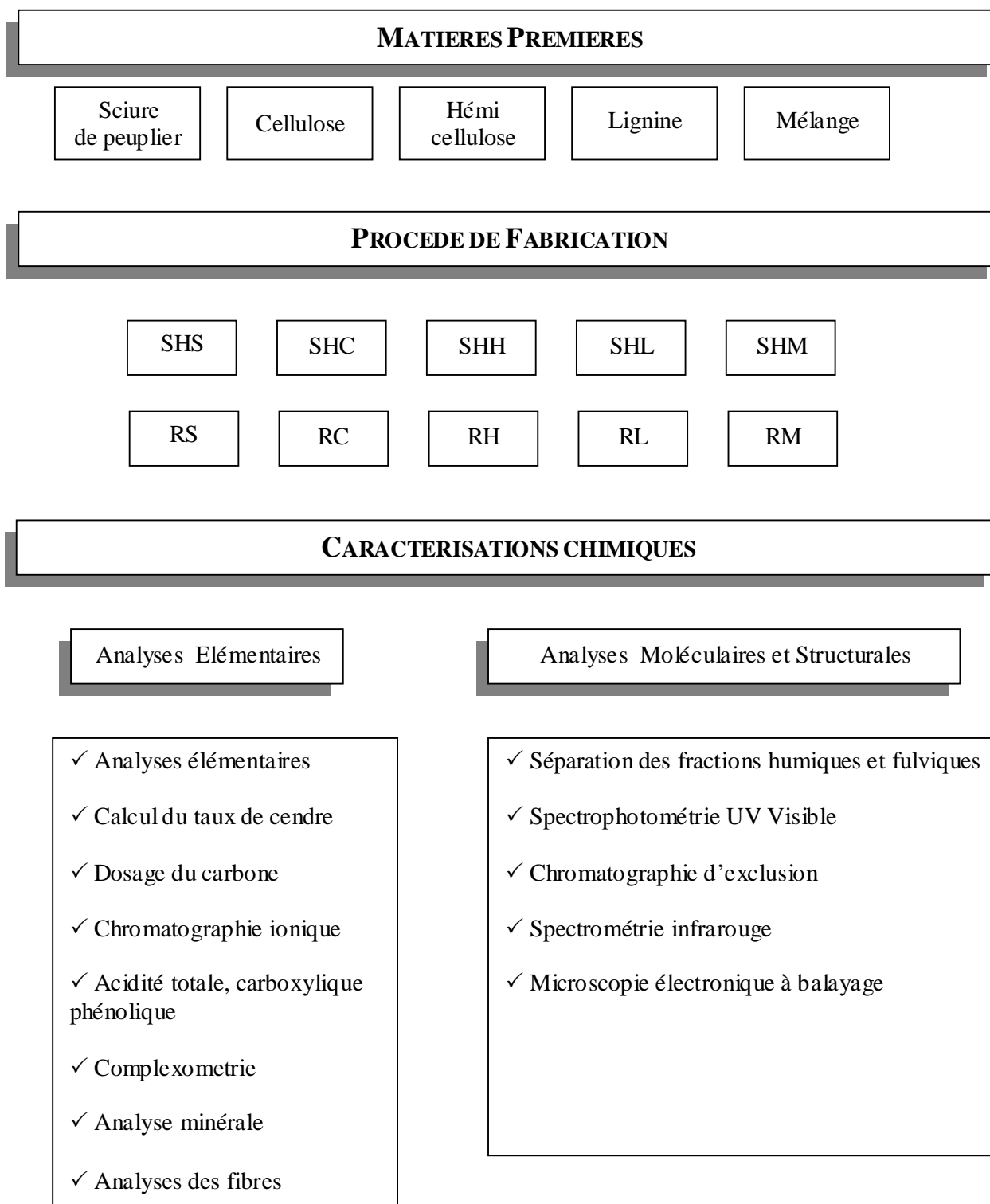


Figure 17 - Plan expérimental et récapitulatif des analyses réalisées

3.4 MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE

Le choix des plantes étudiées repose sur différents critères de sélection. Le pélarгонium et le maïs sont utilisés dans différents secteurs de production végétale et ont une importance relative sur leur marché économique. De plus, la littérature et les précédentes études confirment l'adaptabilité des ces deux plantes aux techniques de cultures hors sol et leur sensibilité aux substances humiques.

3.4.1 Le pélarгонium

Les premières plantes cultivées sont des Pélarгонiums x hortorum de variété Avenida. Le choix du pélarгонium comme plante horticole pour tester l'effet des substances humiques a été établi d'après plusieurs éléments. Leurs capacités de résistance et d'adaptation aux variations ponctuelles de conditions culturales, permettent aux plantes de bien se développer en aquiculture en présence de substances humiques. De plus de précédentes études ont montré des effets positifs des SHB sur les cultures hydroponiques de Pélarгонium (Galy, 2002). Enfin, le Pélarгонium x hortorum présente un intérêt économique important en horticulture comme plante à massifs ornementaux.

Les Pélarгонiums sont fournis sous forme de boutures enracinées de type « cutting », au stade moyen de 5 feuilles par plante (figure 18). Les racines des boutures, conditionnées dans des mottes de substrats sont soigneusement nettoyées à l'aide d'un jet d'eau puis sont placées en préculture dans une solution nutritive standard permettant l'acclimatation des plantules aux conditions d'aquiculture et la formation de lots de biomasse homogène (Annexe 2). Au cours de la préculture, les parties aériennes sont régulièrement humidifiées avec de l'eau pour limiter les effets de la chaleur. De plus, les solutions nutritives sont complétées avec de l'eau déminéralisée tous les deux jours pour compenser la consommation hydrique et éviter une concentration des ions en solution. Le pH et la conductivité sont également contrôlés. A l'issue de la préculture, les plantes ont développé de nouvelles racines à la base de la tige, signe d'une adaptation à l'aquiculture et ont accru leur biomasse. Au bout de quinze jours d'acclimatation, le développement des plantes permet l'application des traitements.



Figure 18 – Pélargonium x hortorum

3.4.2 Le maïs

Bien que difficile à cultiver en culture hydroponique, le choix du maïs comme plante de grande culture pour tester l'effet des substances humiques a été motivé par les nombreuses études réalisées sur cette plante confirmant sa sensibilité aux extraits humiques.

Les graines de maïs sont déposées sur papier filtre humide et mises à germer à l'obscurité, dans un incubateur à 28°C, sous une humidité relative de 100%, pendant 5 jours (figure 19). Les jeunes plantules sont alors mises à verdier sous serre puis sont transférées en bac de préculture contenant une solution nutritive standard. La préculture s'effectue durant 10 jours jusqu'à un stade de développement de 5-6 feuilles, approprié pour l'application des traitements (Annexe 3). Au cours de cette période, le pH, la conductivité et la consommation de la solution nutritive sont contrôlés et les bacs de culture sont complétés à 15 litres avec de l'eau distillée.



Figure 19 – Germination et culture de maïs

3.4.3 Technique culturale et mise en culture

L'ensemble des expérimentations végétales est réalisé en condition de culture hydroponique. Cette technique de culture hors sol consiste à cultiver les plantes en plongeant leurs racines dans un milieu de culture liquide. Le milieu de culture est une solution nutritive (SN) non circulante, aérée et adaptée aux végétaux cultivés. Le système est composé d'un bac de culture contenant la solution nutritive, peint en blanc pour limiter l'échauffement des solutions et d'un support en polystyrène percé d'un trou accueillant les plantes (figure 20). Pour éviter l'hypoxie racinaire, le milieu est enrichi en oxygène par un système d'aération assurant un taux moyen de 70% de O₂ dissous dans les solutions et permettant également le brassage et l'homogénéisation de la solution. L'aquiculture permet d'améliorer le contact entre les racines et les éléments nutritifs du milieu. Elle favorise ainsi l'absorption des éléments minéraux. Cette technique permet en outre, de maîtriser les paramètres de culture (pH) et de contrôler l'évolution de la composition de la solution nutritive (conductivité). Les bilans de consommation hydrique et minérale sont facilement réalisables et permettent de renforcer l'analyse de la nutrition minérale des plantes. De plus, l'étude du système racinaire est possible par observation, prélèvement et analyse.

L'acclimatation des plantes terminée, la formulation des solutions nutritives est établie. Chaque solution est préparée, les bacs de culture sont remplis et le système d'aération est mis en place. Des lots homogènes de plantes sont constitués pour limiter la variabilité inter et intra traitements. Chaque plante est placée dans un bac individuel et les traitements sont répartis de façon aléatoire sur la paillasse.



Figure 20 – Dispositif de culture

Les différentes cultures et précultures s'effectuent en serre dans des conditions de température, d'humidité et d'éclairage contrôlées et régulées (tableau 6).

	Jour	Nuit
Durée (h)	14	10
Eclairage (lux)	> 8000	0
Température (°C)	18 ± 5	18 ± 5
Humidité relative (%)	50 ± 10	50 ± 10

Tableau 6 - Conditions climatiques sous serre

3.5 FORMULATION DES SOLUTIONS NUTRITIVES

Les différentes expérimentations végétales étudiées nécessitent la formulation de deux types de solutions nutritives. Une solution nutritive standard, sans substances humiques, servant de solution témoin (et de solution de préculture) et une solution nutritive contenant des substances humiques. De manière générale, la composition minérale de toutes ces solutions est identique, l'objectif de la formulation étant de préserver l'équilibre ionique prédéterminé dans la solution témoin. Seule la présence ou l'absence de substances humiques dans la formulation différencie les solutions nutritives utilisées. Ainsi toutes modifications des paramètres biométriques ou physiologiques des plantes en cours de culture, pourront être interprétées comme des effets des substances humiques sur les plantes.

3.5.1 Formulation de la solution nutritive standard

Les formulations utilisées dans les essais sont basées sur une solution nutritive standard mise au point au laboratoire et adaptée aux besoins nutritifs des plantes (Morard, 1973; 1995). Elle est constituée d'eau déminéralisée et d'éléments minéraux. L'apport de macroéléments s'effectue sous forme de sels à différentes concentrations : nitrate de calcium (CaNO_3), nitrate de potassium (KNO_3), phosphate de potassium (KH_2PO_4) et sulfate de magnésium (MgSO_4) (tableau 7).

	NO_3^-	H_2PO_4^-	SO_4^{2-}	Total Cations
K^+	11	2	-	13
Ca^{2+}	4	-	-	4
Mg^{2+}	-	-	3	3
Total Anions	15	2	3	20

Tableau 7 - Concentration en macroéléments des solutions nutritives (meq.L^{-1})

Les oligoéléments sont apportés sous forme de sulfates de cuivre, zinc, et manganèse, d'acide borique, de molybdate de sodium et de fer sous forme de chélates (EDTANa_2Fe) (tableau 8).

Oligoéléments	Fe (EDTA)	B	Mn	Zn	Cu	Mo
Concentration	15	0,52	0,49	0,11	0,06	0,01

Tableau 8 - Concentration en oligo-éléments des solutions nutritives (mg.L⁻¹)

La solution nutritive possède une balance ionique égale à 20 meq.L⁻¹ avec autant de cations que d'anions. Cette solution servira de base pour la formulation des milieux contenant des substances humiques.

3.5.2 Formulation des solutions nutritives avec substances humiques

Les effets agronomiques des substances humiques sont testés à différentes doses d'application, chaque dose étant définie par la concentration de carbone contenu dans les extraits humiques ajoutés. Les substances humiques sont combinées aux solutions nutritives, en respectant la balance ionique prédéfinie. La formulation des solutions nutritives humiques repose sur la concentration de carbone ajouté aux solutions. De par leur fabrication, les SHB sont riches en potassium (§3.1), leur ajout dans une solution nutritive standard modifie la composition ionique du milieu. Un rééquilibrage des solutions en sels minéraux est donc réalisé en fonction des caractéristiques des SHB apportées. Les variations de composition induites par l'ajout de SHB sont proportionnelles aux concentrations d'extrait humique utilisé, ainsi plus la concentration de carbone utilisé est élevée, plus l'apport de potassium est grand.

Les substances humiques utilisées dans cette étude sont issues d'un même lot de production assurant l'utilisation d'un produit homogène dans les différentes expérimentations. L'analyse des produits humiques initiaux permet de déterminer les concentrations de carbone et de potassium. Selon la concentration des SHB testées, la quantité de potassium additionnelle peut être calculée (tableau 9).

	Carbone	Potassium
Concentration initiale (mg.L ⁻¹)	9360	40700
Concentration finale (mg.L ⁻¹)	50	217,4
Concentration finale (meq.L ⁻¹)	-	5.56

Tableau 9 - Caractérisation des substances humiques et apport de potassium pour une solution humique à 50 mg de carbone par litre.

La formulation consiste alors à ne pas rajouter dans la solution standard, le potassium apporté par les SHB, la quantité de KNO₃⁻ est donc diminuée. Enfin, la nature alcaline des extraits

humiques induit une augmentation du pH des solutions nutritives, préjudiciable au bon développement des plantes. Le pH des SN est proportionnel au volume de SHB ajouté. Plus la concentration en carbone est forte plus le pH est élevé. Pour restaurer des conditions de culture optimales, avant la mise en place des plantes, le pH est abaissé à une valeur de 4.8 par l'ajout d'acide nitrique (N/10). La quantité d'HNO₃ ajouté pour ajuster le pH est d'autant plus forte que la dose de carbone est élevée, l'apport de nitrate induit est pris en compte dans la formulation.

La formulation d'une solution nutritive contenant une dose de 50 mg de carbone par litre de solution est donnée à titre d'exemple, cette solution étant la plus employée au cours des expérimentations végétales (tableau 10).

	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	SHB	Total Cations
K ⁺	② 5,44	2	-	① 5,56	13
Ca ²⁺	4	-	-	-	4
Mg ²⁺	-	-	3	-	3
SHB	-	-	-	-	-
H ⁺	③ 6,14	-	-	-	-
Total Anions	15,58	2	3	5,56	20

Tableau 10 - Formulation d'une SN additionnée de SHB

- ① Apport de potassium par les SHB
- ② Diminution de l'apport de potassium par le KNO₃
- ③ Apport de nitrate par le HNO₃ lors de la correction de pH

Les solutions utilisées dans les expérimentations suivantes sont formulées selon le principe décrit ci-dessus. Ces solutions diffèrent par leur concentration en carbone variant de 35 à 200 mg de carbone par litre.

Concentration en carbone		0	50	75	100
Apports minéraux SH	K ⁺	0	5,56	8,34	11,12
Sels de réajustements	KNO ₃	11	5,44	2,66	0
	HNO ₃	0	6,14	9,21	12,28
Sels invariables	Ca NO ₃	4	4	4	4
	KH ₂ PO ₄	2	2	2	2
	MgSO ₄	3	3	3	3

Tableau 11 - Réajustement des solutions additionnées de SHB (meq/L)

La formulation de chaque SN étant établie, tous les sels sont pesés et indépendamment dissous dans de l'eau déminéralisée, les volumes de SHB calculés sont ajoutés et le pH des

SN est ajusté à 4,8, valeur de la solution standard. La composition des solutions formulées est présentée dans les annexes relatives à chaque culture.

3.6 MESURE DE LA CROISSANCE ET DU DEVELOPPEMENT

L'analyse des expérimentations est axée sur deux types de résultats :

- étude de la croissance et du développement par mesure des facteurs biométriques,
- étude de la nutrition minérale des plantes en présence de substances humiques par analyse de la solution nutritive et des organes des plantes.

3.6.1 Mesures biométriques

La mesure des paramètres biométriques permet d'estimer la croissance des plantes. De manière générale, les mesures portent sur le poids, la taille des plantes entières et des organes et sur le nombre des certains organes (feuilles, fleurs). Trois périodes peuvent être distinguées au cours des cultures, correspondant à la mise en place des traitements, au déroulement de la culture et à la récolte des plantes (figure 21). Chaque série de mesures est effectuée durant ces trois périodes et peut varier selon la nature des plantes.

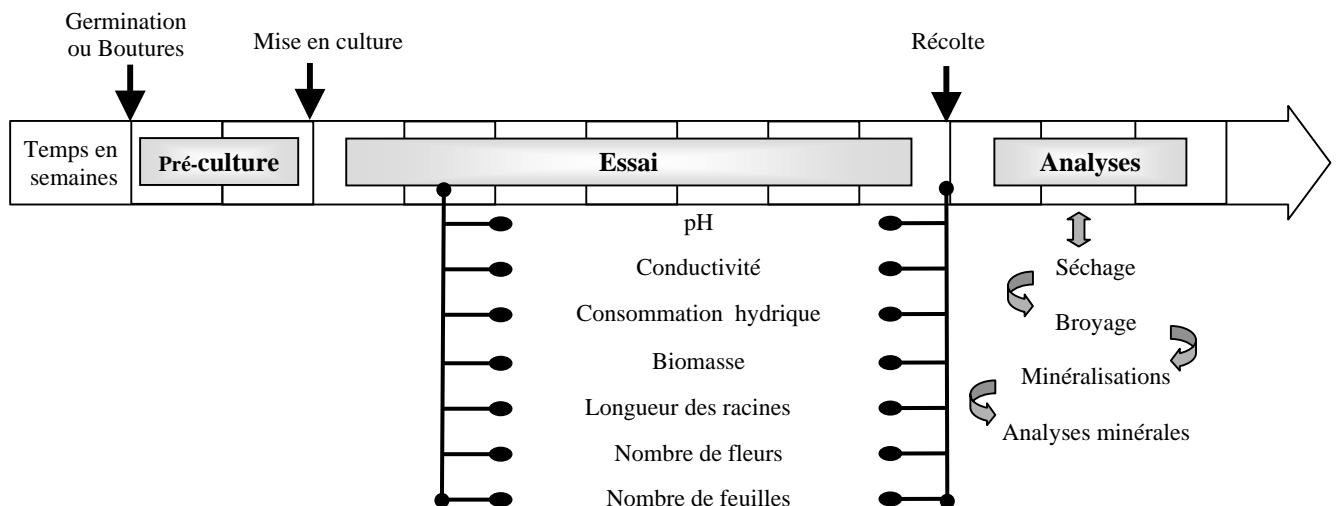


Figure 21 – Chronologie d'une culture végétale

En début de culture, les plantules sont pesées, la hauteur des plants, la longueur des racines et le nombre de feuilles sont relevés, pour définir le stade initial de mise en culture et améliorer la lisibilité des effets des traitements.

L'évolution des plantes est suivie de manière hebdomadaire par une série de mesures comportant le poids frais, l'apparition des feuilles et des fleurs et l'élongation des racines. En cours de culture, les plantes sont sorties de leur bac, puis pesées avec leur support. Les effets des SHB sur la croissance et le développement des plantes sont ainsi évalués de manière continue.

Les expérimentations sont arrêtées après 6 à 8 semaines de culture, tous les paramètres suivis pendant la culture sont relevés en fin d'expérience. Le poids frais, la hauteur et la longueur des racines des plantes entières sont déterminés. Les plantes sont récoltées, et les organes séparés en tiges, feuilles, fleurs et racines, leurs poids frais respectifs sont pesés. Chaque organe est ensuite placé à l'étuve pendant 48h à 70°C afin de déterminer son poids sec. Le nombre de feuilles et de fleurs est calculé.

Les mesures systématiques présentées ci-dessus comportent certaines spécificités selon la nature de la plante étudiée. Ainsi, dans le cas du pélargonium, la hauteur des plantes est difficile à déterminer et n'est pas mesurée en raison du port naturel de la plante. Le volume de la partie aérienne est estimé mais apporte peu d'information si ce n'est sur l'état sanitaire de la plante et sur l'avancement de son développement.

La floraison est en revanche un facteur intéressant à étudier, étant donné l'apparition continue de fleur et la coexistence des bouquets floraux à des étapes différentes du développement. À partir de la troisième semaine de culture, le nombre de bouquets floraux par plantes peut donc être quantifié. Les bouquets sont récoltés selon la méthode mise au point par Galy en 2002. Après éclosion des bourgeons floraux, les fleurs s'épanouissent, la hampe florale se redresse et en fin de maturation l'abscission des pétales se produit. Afin d'effectuer un suivi rigoureux de la floraison, la récolte des bouquets est réalisée avant leur maturation en respectant les critères de sélection définis : disparition de l'arc de la hampe florale et présence d'au moins 5 fleurs épanouies par bouquet (figure 22). Cette technique de récolte des bouquets permet d'éviter les pertes de matières dues à l'abscission des pétales et d'établir la chronologie d'apparition des bouquets floraux. Elle limite l'influence de la récolte sur la croissance et le développement des plantes et assure une composition minérale homogène des bouquets. Les fleurs récoltées sont pesées, mesurées et placées à l'étuve à 70°C afin de déterminer le poids sec total de fleurs par plante en fin de culture.



Figure 22 – Stade de récolte des bouquets floraux

Dans le cas du maïs un certain nombre de paramètres s'avèrent difficiles à mesurer lorsque les plantes ont atteint le stade 8 feuilles. Le volume racinaire est tel qu'il occupe la totalité du bac de culture limitant de fait l'élongation racinaire. Celle-ci ne sera donc relevée qu'en fin de culture.

3.6.2 Analyse minérale

L'analyse minérale des solutions nutritives et des plantes permet de réaliser un bilan du devenir des éléments minéraux au cours de la culture et d'estimer la consommation minérale des plantes.

3.6.2.1 Analyses des solutions nutritives

L'étude de l'évolution des milieux nutritifs et leur analyse minérale permet de visualiser les cinétiques d'absorption des éléments minéraux et de l'eau par les végétaux. En début de culture, la mesure du pH et de la conductivité est effectuée pour caractériser l'état initial des solutions. Le pH et la conductivité sont également mesurés, à volume constant, en cours de culture de manière hebdomadaire et à la récolte afin d'étudier leur variation. La cinétique d'évolution traduisant les fluctuations entre les mesures initiales et finales permet d'observer l'absorption des éléments minéraux mais également de vérifier les conditions de culture. En effet une correction de pH est effectuée lorsqu'une solution atteint une valeur supérieure à 7.5, néfaste pour les plantes. De plus la solution nutritive être renouvelée si sa conductivité initiale diminue de moitié, signe d'une concentration en éléments minéraux insuffisante.

La consommation hydrique des plantes est mesurée chaque semaine, en complétant le volume de solution manquant dans les bacs avec de l'eau déminéralisée. Les quantités d'eau ajoutées

sont sommées en fin de culture afin de calculer la consommation totale d'eau par plante. Des échantillons de solutions nutritives sont prélevés aux différents stades de culture pour analyser leurs variations de composition minérale.

3.6.2.2 *Analyses des plantes*

L'analyse minérale des plantes permet d'estimer la quantité d'éléments minéraux absorbés par les plantes. Elle nécessite une préparation préalable des échantillons récoltés. La dessiccation des organes stockés dans des sachets en papier, est réalisée dans une étuve à 80° C pendant 48 heures. Après obtention d'un poids sec constant, les échantillons de feuilles, fleurs, tiges et racines, sont broyés en poudre fine à l'aide d'un broyeur à bille et stockés à l'étuve pendant 12h avant d'être minéralisés. La minéralisation peut être effectuée par voie sèche (calcination) ou par voie humide (attaque acide) selon les éléments à doser (Annexe 1).

Le dosage des éléments minéraux est réalisé sur les prélèvements de solution nutritive et sur les minéralisations des échantillons végétaux. Deux techniques de dosages sont utilisées : les concentrations en micro éléments sont déterminées par spectrométrie d'absorption atomique (§3.3.2.6) ; Le dosage des macroéléments est réalisé par chromatographie ionique échangeuse d'ions de type DIONEX®DX100.

Le tableau 12 résume les mesures effectuées sur les plantes en fonction de la période de culture.

3- Matériels et methodes

	Expérimentations	Pélargonium			Maïs	
		1	2	4	5	6
Stade de culture	Mesures					
Mise en culture	Poids frais	✓	✓	✓	✓	✓
	Hauteur	-	-	✓	✓	✓
	Longueur racine	✓	✓	✓	✓	✓
	Nombre de feuilles	✓	✓	✓	✓	✓
	Ec-pH-conso	✓	✓	✓	✓	✓
Culture	Poids frais	✓	✓	-	-	-
	Hauteur	-	-	✓	✓	✓
	Longueur racine	✓	✓	-	-	-
	Nombre de feuilles	✓	✓	✓	✓	✓
	Nombre de fleurs	✓	✓	✓	✓	✓
	Ec-pH-conso	✓	✓	✓	✓	✓
Récolte	Poids frais					
	Plante entière	✓	✓	✓	✓	✓
	Organes	✓	✓	✓	✓	✓
	Poids sec					
	Plante entière	✓	✓	✓	✓	✓
	Organes	✓	✓	✓	✓	✓
	Hauteur	✓	✓	✓	✓	✓
	Longueur racine	✓	✓	✓	✓	✓
	Nombre de feuilles	✓	✓	✓	✓	✓
	Nombre de fleurs	✓	✓	✓	✓	✓
Ec-pH-conso	✓	✓	✓	✓	✓	
Analyses minérales	Solutions nutritives	✓	✓	✓	✓	✓
	Plantes		✓		✓	

Tableau 12 - Mesures et analyses des essais

3.7 PLANS EXPERIMENTAUX

Pour mieux comprendre les effets des SHB sur les plantes, deux études sont menées, l'une sur pélargonium, l'autre sur maïs, comportant chacune trois types d'expérimentations. Le premier type d'essai constitue une étape préliminaire ayant pour objectif de déterminer les doses létale et efficace des SHB sur chaque plante. Une fois définie, la dose optimale est utilisée dans une seconde expérimentation afin d'observer en détail les effets des SHB sur la croissance et le développement des plantes. Enfin, une dernière expérience permettra de considérer le rôle des acides humiques et fulviques sur les plantes, en testant chaque fraction séparément.

Des essais supplémentaires viennent compléter l'étude des effets des SHB sur le maïs. Des tests de doses croissantes d'extrait humique sur la germination et le développement des

racines permettront d'observer de manière globale l'impact des SHB sur le cycle végétatif complet du maïs. De plus des essais en pots sont menés afin d'évaluer l'influence des substances humiques en conditions réelles de culture.

La codification des traitements insiste sur la nature des composés humiques considérée et la concentration en carbone organique qu'ils apportent dans la solution nutritive. Le code des traitements est défini par :

Une lettre correspondant à la nature du produit testé : H= extrait humique ; AF=acide fulvique ; AH= acide humique ; T=témoin

Un nombre correspondant à la concentration de produit testé en milligramme par litre:
H50=extrait humique à 50 mg. L⁻¹

La formulation détaillée des solutions nutritives employées et la disposition des expérimentations sont présentées dans une annexe relative à chaque étude (Annexes 6 à 11).

3.7.1 Effets des SHB sur la croissance et le développement du Pélargonium

3.7.1.1 Expérimentation 1 : Recherche de la dose efficace

Les études précédemment menées sur l'influence des SHB sur des cultures de pélargonium ont montré des résultats positifs pour la dose de 50 mg.L⁻¹ de carbone. L'application de doses comprises entre 50 et 80 mg.L⁻¹ de carbone ne semble pas induire d'effets remarquables, tandis que des doses supérieures à 80 mg.L⁻¹ de carbone inhibent la croissance des pélargoniums (Galy 2002). Suite à ces résultats et afin de confirmer la teneur optimale en SHB favorisant la croissance et le développement du Pélargonium, 6 concentrations de 25 à 50 mg de carbone de SHB par litre et une solution témoin sans SHB sont testées. Au vu du grand nombre de doses testées, le nombre de répétitions par traitement est limité à 4 pour ne pas engendrer une expérimentation trop lourde à gérer, soit un total de 28 plantes. La culture est menée pendant 7 semaines. Le tableau 13 résume les conditions expérimentales de l'expérimentation 1. La formulation des solutions nutritive est présentée en annexe 4.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	4
H25	Solution nutritive + SHB	25	4
H30	Solution nutritive + SHB	30	4
H35	Solution nutritive + SHB	35	4
H40	Solution nutritive + SHB	40	4
H45	Solution nutritive + SHB	45	4
H50	Solution nutritive + SHB	50	4
Total	7 traitements		28 plantes

Tableau 13 - Plan expérimental n°1

3.7.1.2 Expérimentation 2 : Comparaison des effets des SHB et des fractions humiques et fulviques

Suite à la détermination de la dose optimale, une seconde expérimentation est conduite sur un nombre de plantes plus important, en vue de valider de manière statistique les résultats obtenus. La contribution des fractions humiques et fulviques aux effets observés sur les plantes avec les SHB est évaluée. Les concentrations en carbone des traitements humiques et fulviques appliqués sont calculées à partir de la dose efficace de SHB déterminée précédemment, soit 50 mg.L⁻¹ de carbone. Le produit initial étant composé de 60 % d'acides humiques et de 40 % d'acides fulviques, des doses respectives de 30 et 20 mg.L⁻¹ de carbone sont utilisées. L'expérimentation comprend 4 traitements avec 7 répétitions permettant de

comparer les effets des deux fractions humiques à ceux des SHB et d'une solution témoin. L'expérimentation est conduite pendant 9 semaines. Le tableau 14 résume les conditions expérimentales de l'expérimentation 2. La formulation des différentes solutions est présentée en annexe 5.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	7
H50	Solution nutritive + SHB	50	7
AH	Solution nutritive + Acide humique	30	7
AF	Solution nutritive + Acide Fulvique	20	7
Total	4 traitements	-	28 plantes

Tableau 14 - Plan expérimental n°2

3.7.2 Effets des SHB sur la croissance et le développement du maïs

3.7.2.1 Expérimentation 3 : Recherche de la dose efficace

Afin de déterminer la teneur optimale en SHB favorisant la croissance et le développement du maïs, 4 concentrations de 50 à 200 mg de SHB par litre sont testées. Deux solutions témoins sont utilisées pour tenir compte des différences de salinité introduites par l'ajout des SHB. Chaque traitement comporte un nombre de 4 répétitions, soit un total de 24 plantes. L'expérimentation est conduite pendant 6 semaines. Le tableau 15 résume les conditions expérimentales de l'expérimentation 3. La formulation des différentes solutions est présentée en annexe 6.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	4
H50	Solution nutritive + SHB	50	4
H100	Solution nutritive + SHB	100	4
H150	Solution nutritive + SHB	150	4
T	Solution nutritive standard	0	4
H200	Solution nutritive + SHB	200	4
Total	6 traitements		24 plantes

Tableau 15 - Plan expérimental n°3

3.7.2.2 *Expérimentation 4 : Effets de la dose efficace de SHB*

Pour vérifier l'efficacité de la dose optimale, deux traitements à 0 et 50 mg.L⁻¹ sont testés. Le nombre de répétitions est porté à 8 afin de réduire la variabilité individuelle. L'essai n°4 reprend les conditions expérimentales de l'essai n°3, il est conduit pendant 8 semaines. Le tableau 16 résume les conditions expérimentales de l'expérimentation 4. La formulation des différentes solutions est présentée en annexe 7.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	8
H50	Solution nutritive + SHB	50	8
Total	2 traitements	-	16 plantes

Tableau 16 - Plan expérimental n°4

3.7.2.3 *Expérimentation 5 : Effets des fractions humiques et fulviques*

L'effet des fractions humiques et fulviques sur la croissance du maïs est testé séparément selon les conditions expérimentales de l'expérience n°4. L'expérimentation est conduite pendant 8 semaines et comprend 4 traitements avec 5 répétitions. Le tableau 17 résume les conditions expérimentales de l'expérimentation 5. La formulation des différentes solutions est présentée en annexe 8.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	5
H50	Solution nutritive + SHB	50	5
AH	Solution nutritive + Acide Humique	30	5
AF	Solution nutritive + Acide Fulvique	20	5
Total	4 traitements	-	20 plantes

Tableau 17 - Plan expérimental n°5

3.7.2.4 *Expérimentation 6 : Effets des SHB sur la germination et l'élongation racinaire du maïs*

Deux types d'essais sont menés pour étudier l'influence des SHB sur la germination et la croissance racinaire du maïs (LG2275 traité au gaúcho). Les extraits humiques sont testés sur des lots de graines de poids homogènes soit par incorporation dans des milieux de culture, soit

par imbibition des graines dans les solutions humiques préalablement neutralisées. La vitesse de germination des graines et l'accroissement des racines sont observés.

Dans le premier cas, les graines de maïs sont mises à germer sur du papier filtre imbibé de solution nutritive contenant des extraits humiques à différentes concentrations, de 50 à 500 mg.L⁻¹ (tableau 18). L'essai comporte 5 traitements de 20 graines, soit 100 graines.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	20
H50	Solution nutritive + SHB	50	20
H100	Solution nutritive + SHB	100	20
H200	Solution nutritive + SHB	200	20
H500	Solution nutritive + SHB	500	20
Total	5 traitements		100 graines

Tableau 18 - Plan expérimental n°6

Dans le second cas, les graines sont trempées dans une solution de SHB concentrée à pH 7 durant 2 à 5 heures puis mises à germer sur papier filtre imbibé d'eau distillée. L'effet de la concentration en SHB ou du temps de trempage est ainsi observé. Chaque test de germination est réalisé sur 20 graines et l'élongation des racines est mesurée (tableau 19).

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	2, 4, 5h	20
SH 2h	SHB concentrées neutralisées	2h	20
SH 4h	SHB concentrées neutralisées	4h	20
SH 5h	SHB concentrées neutralisées	5h	20
Total	4 traitements		120 graines

Tableau 19 - Plan expérimental n°7

Un dernier essai est conduit afin d'observer l'effet des SHB sur l'élongation racinaire de jeunes plantes. Après avoir germé sur eau distillée, les plantules au stade 3 feuilles sont transférées dans des bacs de culture contenant des solutions nutritives standards et des solutions additionnées de SHB. La longueur maximale des racines primaires est mesurée quotidiennement pendant 15 jours. Cet essai comporte 2 traitements de 14 plantes, soit 28 plantes (tableau 20). La formulation des différentes solutions est présentée annexe 9.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	14
H100	Solution nutritive + SHB	100	14
Total	2 traitements		28 plantes

Tableau 20 - Plan expérimental n°8

3.7.2.5 Expérimentation 7 : Expérimentation en pots

Suite à l'étude de l'impact des substances humiques et de leur fraction sur des cultures hors sol de maïs, l'influence des SHB est testée en condition d'application réelle sur une culture de maïs en pot rempli d'un sol sablo-limoneux. L'objectif de cette étude est d'observer si les résultats obtenus en culture hydroponique peuvent être vérifiés. Les SHB ont été appliquées au stade 4 feuilles lors de l'arrosage des pots. L'apport de SHB est réalisé sous différentes formes définies par trois traitements :

- T1 comportant une seule application (0.2 ml de SHB concentrée par plante) au stade 4 feuilles
- T2 correspondant à deux applications (0.2 ml/plante) aux stades 4 et 6 feuilles
- T3 représentant une quantité plus importante 2 ml/plante (10 apports de 0.2ml pendant 6 semaines)

L'expérimentation est conduite pendant 9 semaines et comprend 25 répétitions par traitement. Le tableau 21 résume les conditions expérimentales de l'expérimentation 6. La formulation des différentes solutions est présentée en annexe 10.

Code	Traitement	Dose (mg/ plante)	Répétition
T0	Solution nutritive standard	0	25
T1	Solution nutritive + SHB	2	25
T2	Solution nutritive + SHB	4	25
T3	Solution nutritive + SHB	20	25
Total	4 traitements	-	100 plantes

Tableau 21 - Plan expérimental n°9

3.8 ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats présentés sont exprimés en moyenne. Les données ont été évaluées par une analyse de variance (ANOVA one way, Sigma stat 2.01). Les différences significatives entre moyennes ont été calculées en appliquant la méthode de Tuckey au seuil d'erreur de 5%.

4 CARACTERISATION ET ORIGINE DES SUBSTANCES HUMIQUES BIOMIMETIQUES

Depuis plusieurs années, les nombreuses études sur les substances humiques ont montré la grande variabilité existant entre les diverses molécules naturelles (MacCarthy et al., 1990). Ces dernières diffèrent essentiellement par leur origine géographique, la nature et la composition du sol dont elles sont extraites, mais aussi par leur procédé d'extraction. Le développement du procédé de fabrication des substances humiques biomimétiques permet d'obtenir de manière reproductible des molécules humiques stables. De récents travaux sur la caractérisation des SHB ont confirmé leur nature proche de celle des substances humiques naturelles, tant par leur composition et que par leur structure (Richard, 2002).

L'objectif de ce chapitre est d'essayer de caractériser la structure des SHB et de déterminer les macromolécules qui seraient à l'origine de leur formation suite aux transformations générées sur la matière première par le procédé de fabrication. Les différentes étapes réalisées pour synthétiser et caractériser les substances humiques sont présentées.

La méthodologie utilisée est originale et consiste à comparer les effets du procédé de fabrication sur la sciure de peuplier naturelle (S) avec ceux obtenus sur les principaux composants de la matière première utilisée, cellulose (C), lignine (L), hémicellulose (H) et de la sciure reconstituée (M). Cette approche comparative s'applique aux SHB liquides et aux résidus de fabrication.

Une meilleure détermination de l'origine des acides humiques et fulviques permettra de mieux comprendre les effets de ces fractions appliquées séparément aux végétaux (§ 5.2).

4.1 CARACTERISATION DES SUBSTANCES HUMIQUES BIOMIMETIQUES

4.1.1 Analyses physico-chimiques

Teneur en carbone

La concentration en carbone organique et les teneurs en acides humiques et fulviques sont les premières valeurs déterminées (tableau 22). Elles permettent d'estimer la quantité de matière organique transformée par le procédé, et d'apprécier la taille et la proportion des molécules extraites. Les SH obtenues à partir de cellulose pure comportent la plus faible concentration en carbone (7.2 g.L^{-1}). Les SH de sciure et de lignine présentent une concentration en carbone de 13 g.L^{-1} . Sur ces deux matières, le procédé de fabrication extrait la même quantité de carbone. L'extraction est plus importante concernant les SH obtenues à partir d'hémicellulose qui présentent la concentration en carbone la plus élevée avec 41.7 g.L^{-1} . La composition du mélange (26.5 g.L^{-1}) est influencée par la transformation importante de l'hémicellulose et présente une quantité plus élevée de carbone que les SH de sciure (13.2 g.L^{-1}).

La répartition des acides humiques et fulviques est différente selon la matière première utilisée (tableau 22). La lignine et l'hémicellulose produisent une majorité d'acides humiques de haut poids moléculaire (+ de 80 %) et une faible quantité d'acides fulviques (0.8 % pour SHL). L'inverse s'observe dans la composition des SHC qui possèdent près de 70% d'acides fulviques contre 30 % d'acides humiques. Les SH de sciure et du mélange présentent une répartition intermédiaire et équilibrée, les SHS contenant légèrement plus d'acides humiques (58.5 %) que d'acides fulviques (41.5 %).

	S	C	L	H	M
Carbone (g.L ⁻¹)	13.2	7.2	13.0	41.7	26.5
Acides humiques (%)	58.5	30.5	99.2	82.5	50.1
Acides fulviques (%)	41.5	69.5	0.8	17.5	49.9

Tableau 22 - Teneur en carbone organique et pourcentage d'acides humiques et fulviques

Notre approche expérimentale vise à comprendre les transformations induites au sein de la sciure par le procédé de fabrication en observant la dégradation de chacun de ses constituants seul et mélangé. Pour cela il est nécessaire d'observer si la dégradation de ces constituants est identique dans les deux conditions expérimentales et de vérifier si leur transformation est proche de celle de la sciure.

En supposant que les constituants primaires réagissent de la même manière au procédé lorsqu'ils sont attaqués seuls ou dans le mélange, les dosages effectués sur mélange (concentration en carbone, teneur en acides humiques et fulviques) devraient correspondre à une composition théorique calculée à partir des résultats obtenus pour chaque constituant.

Ce calcul est réalisé en appliquant le pourcentage relatif au composé primaire dans le mélange, aux concentrations en carbone et aux teneurs en acides humiques et fulviques dosées pour chaque constituant. Les valeurs calculées sont ensuite comparées à celle dosées sur les SHM et SHS (tableau 23).

Exemple de calcul : Les SH de cellulose comportent 7.2 g.L⁻¹ de carbone.

La cellulose représente 55.3% de la composition du mélange.

La concentration théorique en carbone du mélange provenant de la dégradation de la cellulose correspond à : $7.2 \times 0.553 = 4 \text{ g.L}^{-1}$

La concentration en carbone calculée (13.1 g.L⁻¹) est nettement inférieure à la valeur mesurée sur l'échantillon de SHM (26.5 g.L⁻¹). Il semblerait que les constituants soient plus dégradés une fois mélangés que seuls. Cependant, les teneurs en acides humiques et fulviques calculées se rapprochent de celles mesurées, indiquant que le type de molécules formées est identique.

De plus, les valeurs calculées sont très proches des valeurs mesurées pour les SH de sciure (valeurs grisées), indiquant une certaine similitude dans la dégradation des matières premières seules et de celles qui constituent la sciure. Ceci confirme que l'étude de la dégradation des composés primaires constitue une bonne estimation des réactions de dégradation se produisant dans la sciure.

Enfin, ces résultats indiquent que le mélange correspondant à la sciure reconstituée est plus dégradé que la sciure vraisemblablement en raison de l'absence des liaisons intra et inter moléculaires des fibres du bois.

	S	C	L	H	M
Proportion de M (%)	-	55.3	25	14.1	-
Carbone (g.L ⁻¹)	13.2	7.2	13.0	41.7	26.5
Carbone calculé (g.L ⁻¹)	-	4.0	3.25	5.9	13.1
Carbone AH (%)	58.5	30.5	99.2	82.5	50.1
Carbone calculé AH (%)	-	16.9	24.8	11.6	53.3
Carbone AF (%)	41.5	69.5	0.8	17.5	49.9
Carbone calculé AF (%)	-	38.4	0.2	2.5	41.1

Tableau 23 - Estimation des valeurs théoriques de carbone, d'acides humiques et d'acides fulviques des SH du mélange

Teneur en éléments minéraux et pH

Le pH et la conductivité de toutes les solutions humiques sont identiques, du fait de la méthode d'extraction alcaline employée. Ainsi la normalité de la solution extractante impose aux extraits humiques un pH basique élevé compris entre 13.0 et 13.2 et une forte concentration en éléments minéraux. L'analyse minérale des solutions humiques précise logiquement la concentration importante de potassium, et confirme la concentration très faible voir nulle des autres éléments minéraux (tableau 24).

	S	C	L	H	M
pH	13.2	13.1	13.0	13.2	13.1
Conductivité (mS.cm ⁻¹)	175	179	180	176	176
Potassium (g/L)	38.4	39.3	41.3	41.1	38.3
Calcium	0.04	-	-	-	-
Magnésium	0.005	-	-	-	-
Sodium	-	-	-	-	-
Phosphate	0.4	-	-	-	-
Sulfate	0.18	-	-	-	-
Nitrate	0.09	-	-	-	-

Tableau 24 - pH et teneur en éléments minéraux des solutions de SHB

Détermination du pouvoir complexant

Les matières humiques sont susceptibles de former des complexes stables avec les cations. Pour déterminer le pouvoir complexant des SHB, l'étude de la complexation du calcium par les SHB a été réalisée et comparée à la complexation d'une molécule organique de référence, capable de former des complexes stables avec le calcium, l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA).

Les complexes étant plus ou moins stables selon la nature des matières organiques et les conditions de pH, deux types d'études ont été réalisés pour observer la formation des complexes EDTA-calcium et SHB-calcium. La première à pH variable pour déterminer la quantité de calcium complexé par chaque molécule organique, la seconde à pH constant pour observer l'évolution et la stabilité des complexes (Brun, 1993).

- Etude à pH variable

A pH variable, les courbes de variation conductimétriques permettent de mettre en évidence la formation du complexe EDTA-calcium. La fin de réaction de complexation du calcium et de l'EDTA est caractérisée par un point d'inflexion dans le tracé de l'augmentation de la conductivité (figure 23).

Ce point s'observe pour un volume de 770 μl de CaCl_2 versé à la concentration de 5.55 g.L^{-1} (soit 4.27 mg de calcium). Le vase de réaction contenant 100 ml d'une solution d'EDTA à 0.141 g.L^{-1} : 100 grammes d'EDTA complexent 30.2 grammes de calcium.

De la même façon, l'apport de quantité croissante de CaCl_2 à une solution de SHB permet d'observer la complexation du calcium par les matières humiques. La réaction de complexation des SHB et du calcium est totale pour un volume de 460 μl (soit 1.49 mg) de CaCl_2 versé. Ainsi, 100 grammes de SHB complexent 9.98 grammes de calcium.

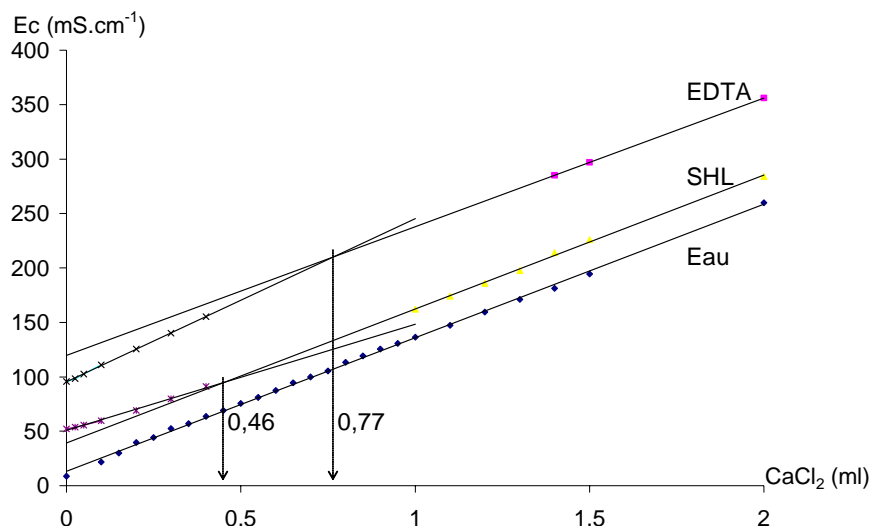


Figure 23 - Variations conductimétriques au cours des complexation calcium-EDTA et calcium-SHB à pH variable

- Etude à pH constant

L'enregistrement des variations conductimétriques à pH constant (pH=5, pH=7, pH=9) permet de préciser les conditions de formation du complexe EDTA-calcium et de suivre sa stabilité en fonction du pH.

Le pH étant maintenu constant par NaOH, la quantité de calcium complexée au point d'inflexion, correspond à la quantité de calcium apportée sous forme de CaCl₂.

L'étude de la complexation de l'EDTA par le CaCl₂ à pH constant indique que la complexation augmente avec le pH (figure 24).

Ainsi, les points d'inflexion caractéristiques de la fin de réaction de complexation s'observent pour différents volumes de CaCl₂ versés en fonction du pH (points ① ② ③).

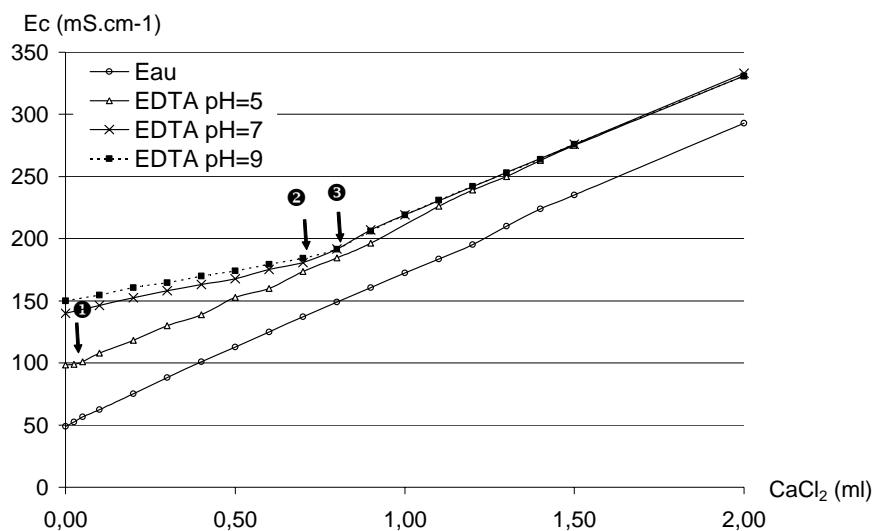


Figure 24 - Variations conductimétriques au cours de la complexation du calcium par l'EDTA à pH constant.

Les résultats obtenus à pH constant indiquent que le pouvoir complexant vis-à-vis du calcium augmente de pH 5 à pH 9 :

- à pH 5 : 100 grammes d'EDTA complexent 8.22 grammes de calcium.
- à pH 7 : 100 grammes d'EDTA complexent 23.5 grammes de calcium.
- à pH 9 : 100 grammes d'EDTA complexent 27.4 grammes de calcium.

Le suivi de la complexation du calcium par les matières humiques à pH variable indique également une augmentation du pouvoir complexant avec le pH. Les courbes de variations conductimétriques présentent des points d'inflexion différents en fonction du pH. Les pentes des courbes formant ces points d'inflexion sont très proches et ne permettent pas d'exposer de façon claire leur représentation. L'étude à pH 5 ne permet pas de distinguer de point d'inflexion. Les résultats obtenus sont les suivants :

- à pH 5 : non déterminé
- à pH 7 : 100 grammes de SHB complexent 7.1 grammes de calcium.
- à pH 9 : 100 grammes de SHB complexent 8.3 grammes de calcium.

⇒ Les SHB complexent trois fois moins de calcium qu'un chélate synthétique de type EDTA.

⇒ Le pouvoir complexant des SHB augmente avec le pH et la stabilité maximale du complexe s'observe à pH 9.

4.1.2 Analyses moléculaires et structurales

Observation macroscopique

L'étude des substances humiques est réalisée dans un premier temps de manière descriptive par l'observation des matières premières et des produits liquides ou résiduels formés (§4.2). Ces descriptions sur la texture et la couleur des produits apportent des informations sur la réactivité des matières premières face au procédé d'attaque thermique et permettent de confirmer les résultats obtenus lors de l'analyse de SH.

L'absorption de la lumière étant directement liée à la concentration en noyau aromatique, la couleur des SH peut fournir des indications sur la taille des molécules. Des solutions claires renferment plutôt des acides fulviques moins riches en noyaux aromatiques, des solutions foncées contiennent plutôt des acides humiques.

L'extraction des substances humiques produit des molécules de structure et de composition variable (teneur en carbone, % AH-AF) selon la matière première considérée. De manière générale, les SH ont une couleur brune, plus ou moins foncée, reflétant leur propriété chimique (figure 25-Stevenson 1982).

Les SHC ont une teinte très claire tendant vers le jaune, reflétant une très faible teneur en carbone et semblant indiquer que la cellulose est le constituant primaire le moins dégradé par le processus thermique. Cette teinte pale présage d'une majorité d'acide fulvique, confirmée lors du dosage des fractions (69.5%).

Les SHH présentent une coloration beige et un aspect flocculé évoquant une composition mixte des deux fractions humiques et une répartition de molécules complexes.

La lignine, totalement transformée, produit des solutions de couleur noirâtre impliquant une forte concentration en carbone. Cette coloration foncée rappelle la présence importante des acides humiques dosés (99%).

Les produits de transformation de la sciure et du mélange ont une couleur intermédiaire brune (figure 26). Ces colorations reflètent une composition équilibrée en acides humiques et fulviques.

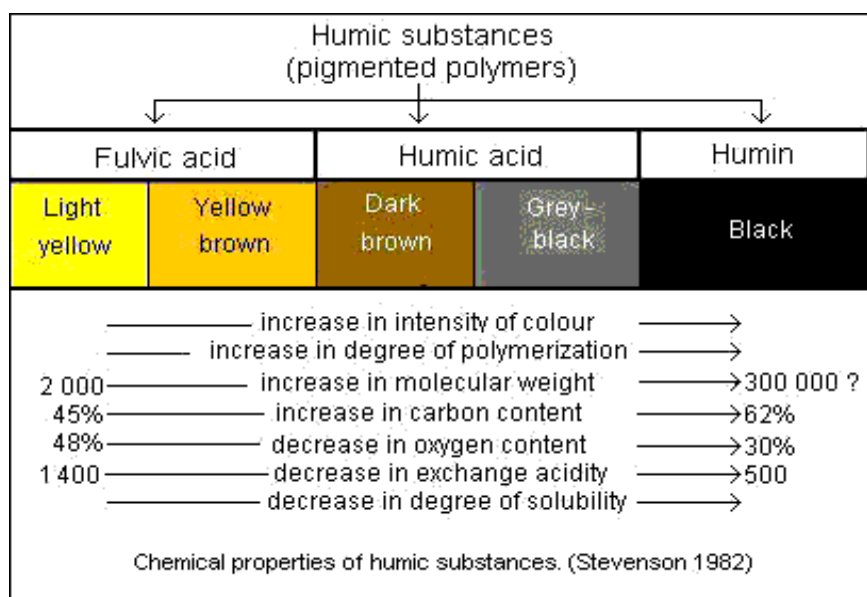


Figure 25 - Propriétés chimiques des substances humiques (Stevenson, 1982)

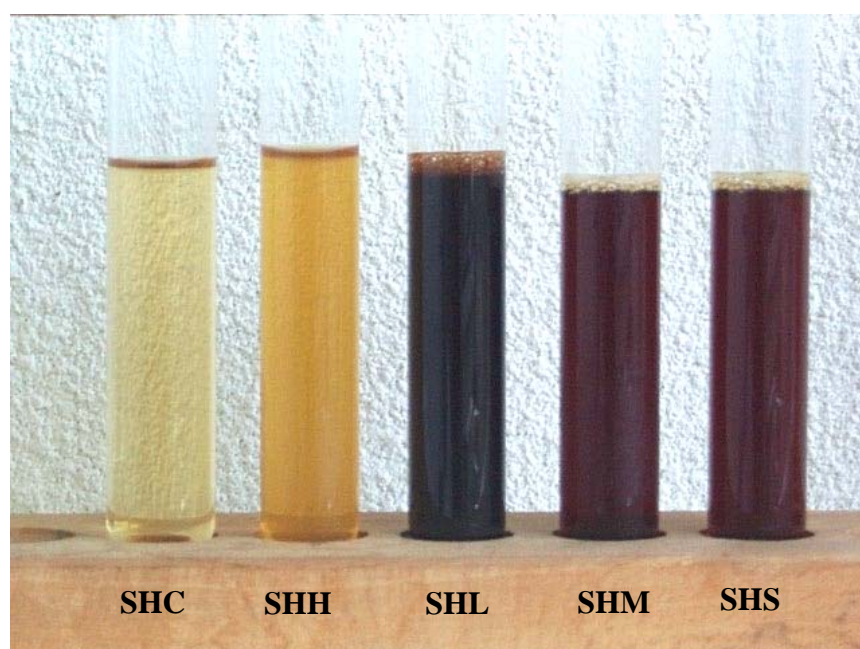


Figure 26 - Couleur des SHB

Spectroscopie UV

Rapport de Welt (E_4 / E_6)

Le ratio E_4/E_6 permet de caractériser les différents échantillons humiques en fournissant une estimation du poids moléculaire (PM) et de la composition des molécules qu'ils renferment (§3.3.3.2). Il varie inversement au poids moléculaire des particules. Les particules de PM élevé (acides humiques) présentent un ratio faible (<5), celles de PM faible (acides fulviques) présentent un ratio élevé ($5 < E_4/E_6 < 10$) (Chen, 1977). Le tableau 25 présente les rapports mesurés.

Les SHC présentent le ratio le plus élevé (10) traduisant la présence majoritaire de particules de faibles PM. Il indique également une faible teneur en carbone, une forte teneur en oxygène, en groupement carboxylique et une acidité totale importante. Les molécules des SHC peuvent être assimilées à des acides fulviques.

Inversement, le ratio déterminé sur les SHL et SHH est plus faible (1.9 et 3.9). Il caractérise des molécules de haut PM, une forte teneur en carbone, une faible teneur en oxygène, en groupements carboxyliques et une faible acidité totale. Les SHL et SHH contiennent donc plus d'acides humiques.

Enfin, des valeurs intermédiaires sont observées pour les ratios des SHS et SHM (5.9). Elles témoignent d'une hétérogénéité plus importante des molécules composant ces solutions et d'une répartition plus équilibrée des fractions humiques et fulviques.

SHB	S	C	L	H	M
E_4/E_6	5.9	10	1.9	3.9	5.9
Acides humiques (%)	58.5	30.5	99.2	82.5	50.1
Acides fulviques (%)	41.5	69.5	0.8	17.5	49.9

Tableau 25 - Ratios E_4/E_6 et teneur en acide humiques et fulviques des SHB

L'analyse des ratios E_4/E_6 confirme les teneurs en acides humiques et fulviques déterminées auparavant pour chaque solution (tableaux 22 et 25). Le rapport de Welt est un bon indicateur de la taille des molécules présentes en solution, facile à mesurer et fiable.

Les résultats obtenus, en accord avec nos conclusions précédentes, confirment que la cellulose produit des acides fulviques et que la lignine produit des acides humiques.

Chromatographie par gel filtration

Le fractionnement sur gel Sephadex G25 permet d'observer la distribution des molécules de taille comprise entre 1000 (Kav de 1) et 5000 Da (Kav de 0).

Pour chaque type de SHB, les profils de séparation obtenus sont similaires et présentent au minimum deux fractions distinctes de Kav déterminé (figure 27). Chacune de ces fractions correspond à une classe de molécule de même taille, dont il est possible d'estimer le poids moléculaire (tableau 26).

	Kav	S	M	C	H	L
Fraction ❶	0	5000	5000	5000	5000	5000
Fraction ❷	0.3	-	-	-	3800	-
Fraction ❸	0.62	2500	2500	2500	2500	2500
Fraction ❹	0.95	-	-	-	1200	-

Tableau 26 - Estimation du poids moléculaire des SHB en fonction du Kav

La fraction 1 est commune à toutes les solutions des SHB. Elle constitue une fraction majoritaire correspondant à des molécules de poids moléculaires supérieurs à 5000Da assimilables à des acides humiques (Kav =0). Elle apparaît en proportion plus importante au niveau du profil d'élution des SHL traduisant la forte teneur en acides humiques précédemment mesurée.

La fraction 3 est également présente dans toutes les solutions. La position de cette fraction est similaire sur tous les profils et correspond à un Kav de 0.62. Cette fraction correspond à des molécules de poids moléculaire d'environ 2500 Da assimilables à des acides fulviques.

La résolution du profil d'élution des SHB d'hémicellulose est la moins précise et reflète une répartition complexe de molécules. Deux fractions supplémentaires (fraction 2 et 4) sont observées sur le tracé. La première est comprise entre les deux pics principaux (1 et 3) et correspond à des molécules d'une taille moyenne de 3800 Da. La présence d'un pic supplémentaire d'un Kav proche de 1 indique l'existence de toutes petites molécules (1200 Da).

4 – Caractérisation et origine des substances humiques biomimétiques

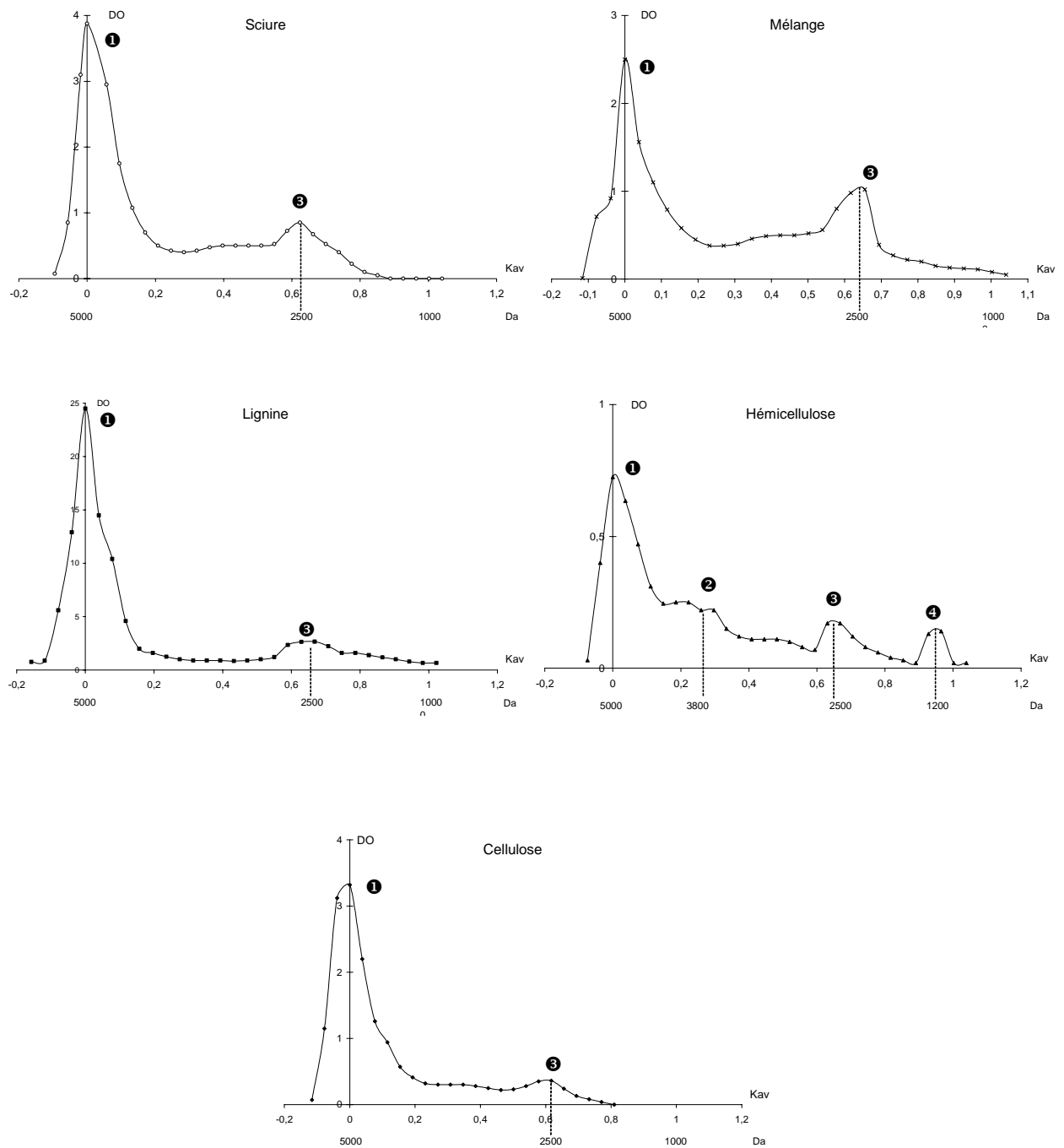


Figure 27 - Fractionnement des solutions de SHB sur Sephadex G25

①=5000 Da ②=3800 Da ③=2500 Da ④=1200 Da

⇒ Les différentes solutions sont constituées majoritairement de deux fractions reflétant leur composition en acides humiques et fulviques.

⇒ Les profils d'élutions des SH de sciure et du mélange sont très proches et confirment que ces échantillons sont dégradés de façon similaire et produisent le même type de fractions

Spectroscopie infra rouge

Les spectres infrarouges réalisés à partir des constituants primaires du bois et des solutions dialysées de SHB sont présentés figure 28.

Le tableau 27 regroupe les différentes bandes d'absorption et vibrateurs associés de chaque échantillon. L'attribution des bandes a été effectuée en fonction du caractère polysaccharidique de la cellulose et de l'hémicellulose et du caractère aromatique de la lignine. Cela permet de suivre l'évolution des composants en fonction du traitement et d'apprécier les conséquences sur les matériaux étudiés.

Les différents spectres infrarouges présentent des vibrateurs de grandes intensités communs à l'ensemble des produits :

- 1- OH liés à 3420 cm^{-1} .
- 2- CH aliphatiques à 2920 cm^{-1} . Cette dernière concerne principalement la fonction méthoxyl (O-CH₃).
- 3- COOH entre 1654 et 1600, à 1420 et à 1220 cm^{-1} . La fonction carboxylique se présente sous forme ionique COO⁻.
- 4- C-H des cycles à 1458 et entre 650 et 600 cm^{-1} . Ces derniers peuvent provenir des glucides comme des structures aromatiques.

Les spectres des composés primaires du bois présentent des bandes liées à leurs constituants de base. Les bandes spécifiques de la cellulose et de l'hémicellulose correspondent :

- aux liaisons CH à 2920 et 1380 cm^{-1} ,
- aux liaisons C-O des glucides ou des alcools à 1069 et 1045 cm^{-1} . Les glucides se manifestent également par la liaison β (pic à 897 cm^{-1}),
- à l'H à 3420 , 1624 et 1650 cm^{-1} .

Les bandes spécifiques de la lignine correspondent :

- aux alcènes à 1705 cm^{-1}
- aux cycles et aux doubles liaisons C=C à 1600 et 1616 cm^{-1}
- aux liaisons CH à 1460 et 1113 cm^{-1}
- aux liaisons C-O-R à 1327 cm^{-1}

L'attaque thermique provoque l'ouverture des différentes chaînes, libérant des dérivés hydroxyles et acides caractérisés respectivement par les bandes de 3348 à 3430 cm^{-1} pour les hydroxyles liés et par les bandes de 1317 et 1423 cm^{-1} pour les dérivés carboxyles.

Le traitement thermique de la cellulose présente un pic supplémentaire à 1708 cm^{-1} indiquant que la déshydratation thermique a provoqué la formation de doubles liaisons conjuguées au détriment des alcools secondaires. Parallèlement la structure fine du massif ($426\text{-}654\text{ cm}^{-1}$) disparaît et le pic caractéristique des groupements CHO_H (1040 cm^{-1}) diminue.

L'hémicellulose se distingue par un signal lié au groupement CH₃ à 1464 cm^{-1} .

Les spectres des solutions élaborées à partir de la sciure peuplier et du mélange des constituants primaires sont très proches.

En effet, ils permettent d'observer :

- des structures glucidiques (1384 , 1044 et 897 cm^{-1}),
- aromatiques liées à la lignine (1600 , 1420 , 1213 et 601 cm^{-1}),
- carboxyliques (1600 , 1420 et 1384 cm^{-1})
- et méthoxyles (2923 cm^{-1}), plusieurs attributions étant possibles pour une même bande d'absorption.

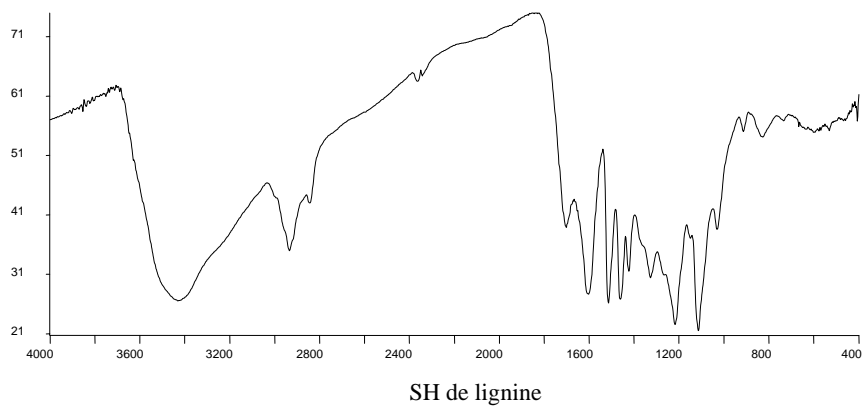
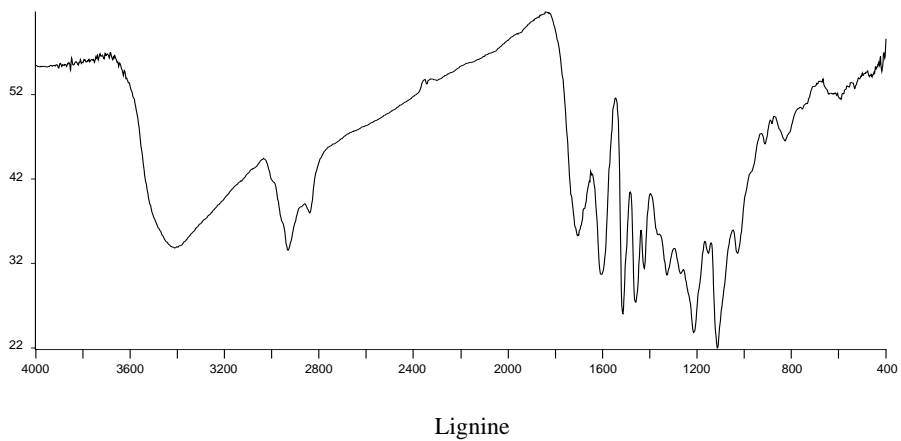
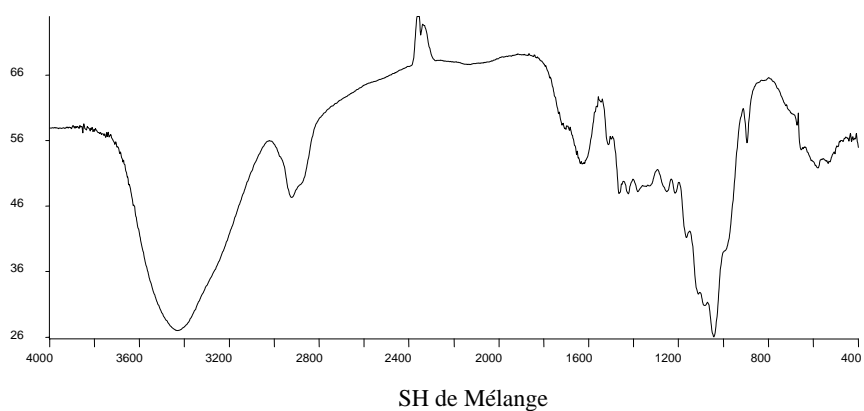
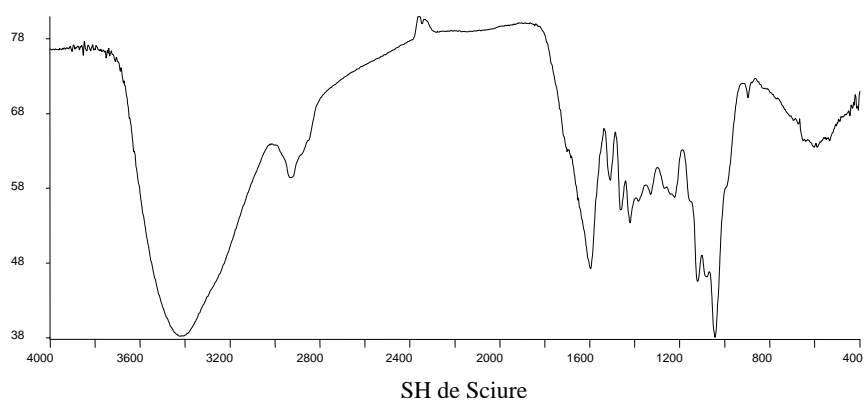
Les seules différences concernent des vibreurs associés aux structures aromatiques de la lignine (1596 et 1462 cm^{-1}) et la formation de groupements dérivés de l'attaque de la cellulose et de l'hémicellulose (1628 et 1251 cm^{-1})

4 – Caractérisation et origine des substances humiques biomimétiques

C	Bandes d'absorption							Vibrateurs associés
	SHC	H	SHH	L	SHL	SHM	SHS	
3346,9	3413,3	3433,3	3388,1	3410,6	3430,6	3432,4	3419,7	OH liés (1) (2)
2899,7	2921,7	2922,2	2918,2	2933,2	2935,3	2923,7	2932,1	CH aliphatiques ou des méthoxyles(1) (2)
/	1708	/	/	1705	1700,6	/	/	Elongation de CH dans les alcènes conjugués avec noyau aromatique
1638,0	1627,6	1636	1639,6	/	/	1628	/	H lié intra-moléculairement dans les alcools et les aldéhydes
/	/	/	/	1605,4	1603,5	/	1596,6	C=O de COO ⁻ (1) (2) (5) C=C aromatiques du squelette aromatique de la lignine (3) (5) (6) (7)
/	/	/	1464,5	1460,9	1461,5	/	1462	Déformations CH (3) (7) Vibration antisymétrique de CH de CH ₃ présents dans lignine et hémicellulose ghita
/	/	1427,3	1423,2	1424,1	1424	1420,4	1420,3	COO ⁻ (1) (2) Etirements C=C du noyau aromatique (4) Déformations CH des groupements méthoxyles (5)
1371,4	1381	1379,2	1381,6	/	/	1380,7	1381	COO ⁻ (1) (2) CH des glucides (7)
/	/	/	/	1327,1	1326	/	/	C-O-R (3)
/	/	/	1253,2	/	/	1251,5	/	C-O et O-H de COOH (2) (9) ou des glucides (7) C-O-C (8)
/	/	/	/	1213,5	1216,1	1213,9	1222,1	Etirements C-O et/ou déformations OH de COOH (5)
/	/	/	/	1113,1	1114,9	/	/	C-H des unités syringyles (3) (5)
/	1049,1	/	1043,9	/	/	1043,9	1044,2	C-O des glucides ou alcools (2) (4) (7)
897,3	897,7	883,3	896,4	/	/	895,8	897,7	Liaisons β des glucides (9)
584,1	605,7	580,8	581,7	590	601,5	580	601,6	CH des cycles (8)

Tableau 27 - Bandes d'absorption (en cm⁻¹), et vibrateurs associés, des solutions de SHB

/ signifie que le vibrateur est absent du spectre :: (1) : (Schnitzer and Khan, 1972) ; (2) : (Stevenson, 1982) ; (3) : (Cang Sun et al., 2000) ; (4) : (Alberts and Filip, 1998) ; (5) : (Kaiser et al., 1997) ; (6) : (Saunier, 1994) ; (7) : (Rodriguez et al., 1998) ; (8) : (Neyroud and Schnitzer, 1975) ; (9) : (Joseleau, 1980).



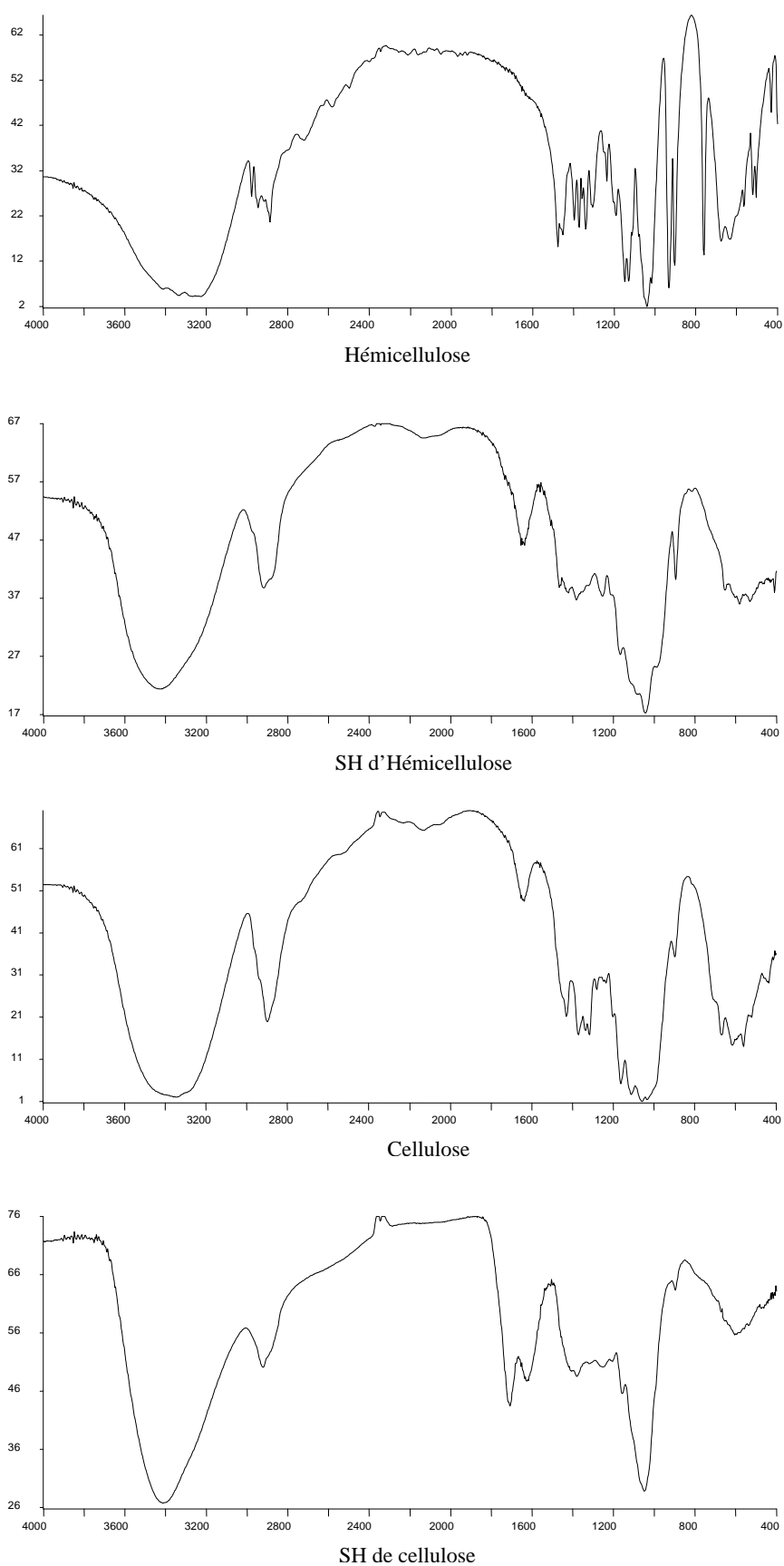


Figure 28 – Spectres infrarouges des constituants primaires et des solutions de SHB dialysées

Observation microscopique - Microscopie électronique à balayage

L'observation des SHB dialysées et lyophilisées en microscopie électronique à balayage, permet d'avoir une idée de leur structure tridimensionnelle.

A faible grossissement (Figure 29, cliché a), les SHB se présentent comme un important agrégat de molécules, probablement en raison du mode de préparation (lyophilisation et métallisation) qui donne aux échantillons un aspect spongieux et léger après la sublimation des molécules d'eau.

Des grossissements plus importants du même agrégat laissent apparaître un enchevêtrement de filaments (b) qui semble pouvoir se dérouler (c et d). Comparativement, les acides humiques de sol (h) présentent une structure très condensée et globulaire qui peut rappeler la structure des SHS (b).

La structure des SHB du mélange (e), d'hémicellulose (f) et de lignine (g) ressemble à celle des SHS et de façon logique, elle paraît plus fragmentée et ne présente pas de structures filamenteuses. En effet l'utilisation de produits commerciaux implique des étapes de fractionnement et de purification lors de leur production. Ces étapes expliquent en partie, l'aspect particulière des produits humiques obtenus à partir de la cellulose, de l'hémicellulose et de la lignine.

L'existence de liaisons inter et intra moléculaire au sein de la sciure peut expliquer la formation de filament de SHB. Inversement, l'absence de ces liaisons au niveau des constituants et de leur mélange induit une structure plus fragmentée

- ⇒ La structure des SHB semble proche de celle des substances humiques naturelles
- ⇒ Les SHB présentent une structure filamenteuse qui semble capable de former des agrégats
- ⇒ Cependant la microscopie reste une technique d'observation qui ne permet pas de conclure sur l'existence des ces agrégations.

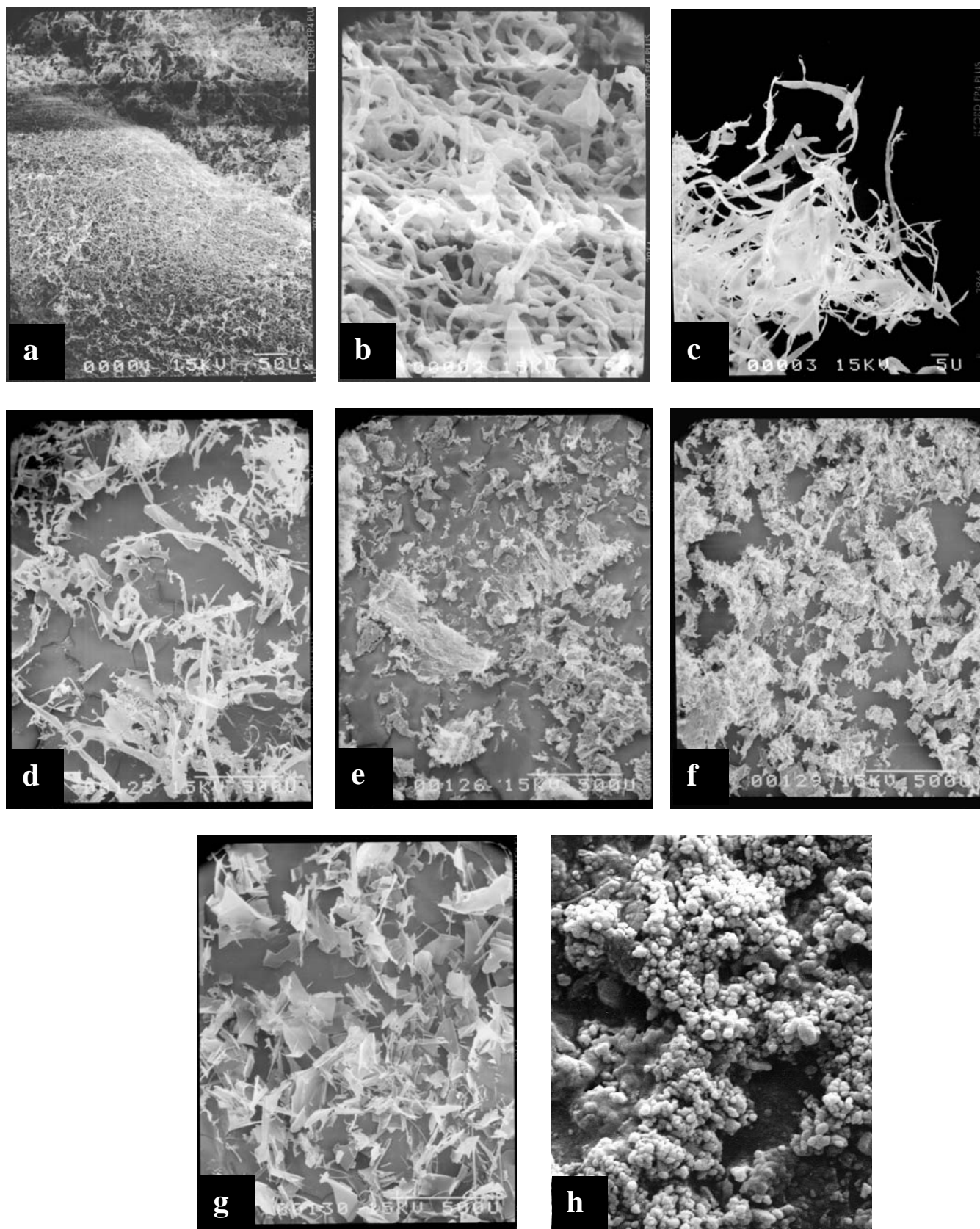


Figure 29 - Observation des SHB en microscopie électronique à balayage a : SHS grossi 200x ; b : SHS grossi 800x ; c : SHS grossi 1500x ; d : SHS grossi 500x ; e : SHM grossi 500x ; f : SHH grossi 500x ; g : SHL grossi 500x ; h : Acides humiques grossis 2000x (Davies, 1998)

4.2 CARACTERISATION DES RESIDUS SOLIDES DE FABRICATION

Le procédé de fabrication laisse un résidu solide. L'étude de ce résidu et sa comparaison avec la matière première de départ et le liquide humique extrait, permet d'obtenir des informations sur la transformation de la sciure en SHB.

Ces informations seront utilisées par la suite pour déterminer l'efficacité du procédé de fabrication sur la dégradation de chaque constituant. La différence de composition entre la matière première et le résidu de production permettra d'établir un rendement quantitatif du procédé (§4.3.1) et de déterminer l'origine des molécules constituant les SHB (§4.3.2).

4.2.1 Observation macroscopique

La sciure se présente sous la forme initiale de copeaux de couleur jaune clair. Suite à la réaction thermique les copeaux brunissent sans jamais être calcinés. Dans le cadre de la fabrication de SH en extrudeuse, les copeaux sont broyés mécaniquement par les vis et produisent une poudre brune et fine. L'étape d'extraction éclaircit la couleur des résidus et permet de séparer la solution brune de substances humiques, des résidus de sciure devenus jaunes (figure 30).

L'hémicellulose se compose d'une poudre fine beige qui semble peu modifiée suite à la réaction thermique. Suite à l'extraction, elle est transformée en quasi totalité en une solution rousse. Le faible résidu restant présente une couleur brune (figure 31).

La cellulose se présente initialement sous forme de poudre blanche flocculente et très légère. Suite au procédé de fabrication, la poudre présente une coloration brune. L'extraction alcaline aboutit à la formation d'un liquide jaune transparent et d'un résidu brun.

La lignine constitue une fine poudre noire pouvant se transformer en liquide sous l'effet de la chaleur. La phase d'extraction ne laisse aucun résidu et produit un liquide épais et noir foncé. L'ensemble du solide de départ est solubilisé en milieu alcalin.

Le mélange composé des trois constituants prend une coloration non homogène comportant les nuances noires de la lignine et blanches de la cellulose. Suite à l'extraction, il demeure un résidu similaire à celui obtenu pour la cellulose mais plus foncé de part la présence de lignine.

D'après la transformation des matières premières, les pertes de couleur observées sur la sciure ou la cellulose torréfiée, peuvent être interprétées comme une perte de matière organique. Cette altération des couleurs se retrouve de manière inverse dans la phase liquide néoformée (§4.1.2 figure 26).

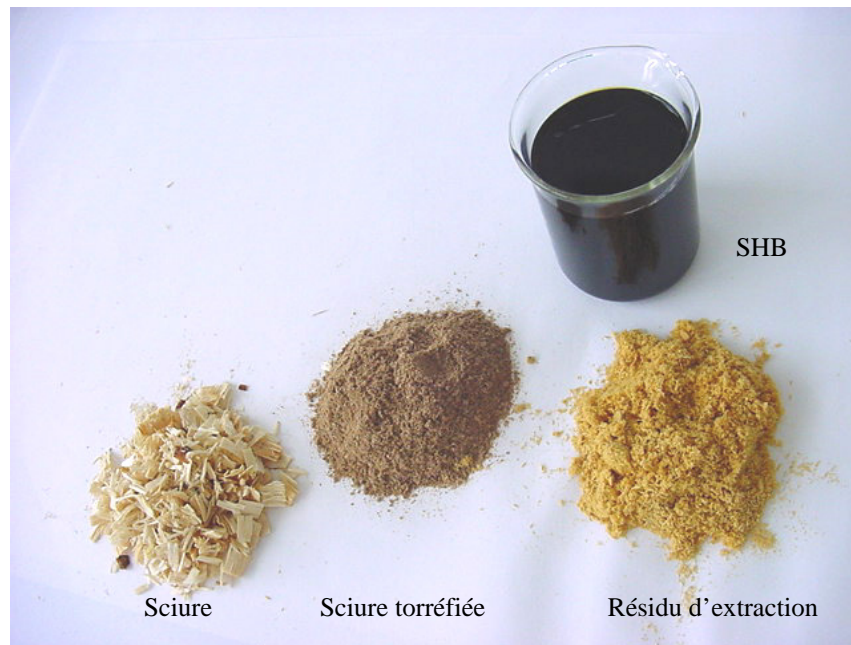


Figure 30 - Les différentes étapes de la transformation du bois



Figure 31 - Les composés primaires du bois et leur résidus de production

4.2.2 Poids sec des résidus solides

L'impact du procédé de fabrication est différent selon les matières premières. Le résidu présent en fin de réaction revêt des aspects différents. De manière générale, il induit une diminution du poids sec total de matière première de 12 % (cellulose), à 96% (hémicellulose) voire une disparition totale dans le cas de la lignine (tableau 28).

	S	C	L	H	M
Résidu	oui	oui	non	non	oui
Couleur du résidu	brune	jaune	noire	brune	brune
Masse initiale (g)	50	50	50	50	50
Masse finale (g)	34.2	44	0	2	28.05
Matière dégradée (%)	31.6	12	100	96	43.9

Tableau 28 - Poids sec final des résidus

4.2.3 Transformation des fibres du bois

L'étude de la transformation des fibres du bois permet d'observer la dégradation relative de chaque constituant primaire en fonction des étapes du procédé de fabrication. L'analyse des fibres lignocellulosiques est donc réalisée sur la sciure brute, la sciure torréfiée et le résidu solide issu de l'extraction alcaline. La dégradation des composants primaires du bois est déterminée par la relation suivante :

$$\text{Dégradation} = \frac{(\text{Masse initiale} - \text{Masse dans le résidu})_{\text{constituant}} \times 100}{\text{Masse initiale}_{\text{constituant}}}$$

La proportion de cellulose, lignine et hémicellulose déterminée sur la sciure correspond aux valeurs données dans la bibliographie (Kononova, 1966), soit respectivement 55, 25 et 14%. L'ensemble représente 94.4 % de l'échantillon (figure 32), les 5.6% restant correspondent à d'autres constituants (protéines, lipides, phénols, sels minéraux...).

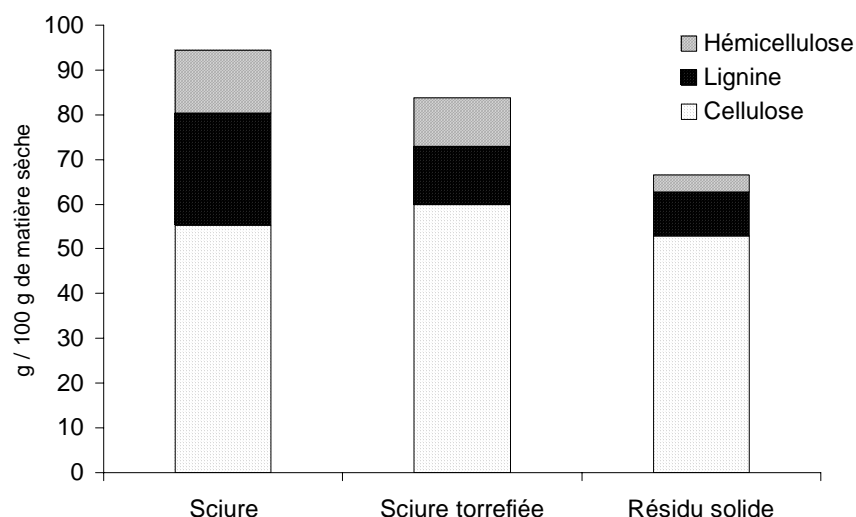


Figure 32 - Répartition des composants primaires de la sciure brute, torréfiée et du résidu

Chaque étape du procédé de fabrication induit une diminution de la quantité totale de glucides membranaires, reflétant leur dégradation et l'enrichissement des solutions de substances humiques. La transformation de la matière organique est plus importante suite à l'extraction alcaline (29%) qu'après la phase de torréfaction (11%).

La dégradation des glucides membranaires de la sciure diffère en fonction des constituants et de la nature de l'attaque (tableau 29). Pour chaque composé, la diminution de poids sec est relative à l'effet du procédé de fabrication (tableau 29).

La cellulose est la moins dégradée (4%) passant d'une teneur en poids sec initial de 55.3% dans la sciure à une teneur de 53% dans le résidu. La proportion relative de cellulose varie peu lors de l'attaque thermique mais diminue clairement suite à l'extraction alcaline (Garves, 1985). Le résidu final contient une majorité de cellulose confirmant le fait que ce constituant est peu dégradé quelle que soit l'étape considérée.

La lignine et l'hémicellulose sont nettement plus attaqués (60 à 70%). La lignine est majoritairement dégradée (48%) lors de la torréfaction. Cette constatation rejoint les observations de Richard (2002) qui indique que les rendements de délignification sont plus faibles en présence uniquement d'alcalis (Cang Sun et al., 2000; Lawson and Stewart, 1989). L'hémicellulose est transformée pendant l'extraction alcaline (50%), son rendement d'extraction plus important s'explique par sa structure plus amorphe qui facilite sa solubilisation en milieu alcalin (Patt and Kordsachia, 1991; Richard, 2002).

	C+H+L		Cellulose		Lignine		Hémicellulose	
	% ms	dégradation	% ms	dégradation	% ms	dégradation	% ms	dégradation
Sciure	94.4	-	55.3	-	25	-	14.1	-
S. torréfiée	83.8	-11.2%	60.6	/	13	-48%	10.8	-22.8%
Résidu	66.6	-29.4%	53	-4.3%	9.8	-60.8%	3.8	-72.9%

Tableau 29 - Variation de la quantité de glucides membranaires entre la sciure brute et le résidu de production (en % de matière sèche)

Ces observations précisent les effets du procédé sur la matière première. L'augmentation de température dégrade la structure du bois et principalement la lignine. La solution alcaline continue cette dégradation sur la cellulose et l'hémicellulose avant d'extraire les molécules transformées. En fin de procédé, l'intégralité de la matière dégradée est transformée en extrait humique liquide.

4.2.4 Observation microscopique

L'observation de la sciure brute et du résidu de production en microscopie électronique à balayage, permet d'étudier l'impact du procédé sur la matière première. Le cliché (a) de la figure 33 présente la structure d'un copeau de bois à faible grossissement. L'orientation des fibres du bois et la dégradation mécanique provoquée par la coupe du bois se distingue nettement. Un plus fort grossissement permet de distinguer l'orientation des différents types de vaisseaux du bois selon trois dimensions (b) et d'observer la lumière de ces vaisseaux encore bien formés (c : vue transversale).

La présence de vaisseaux est de nouveau observée dans les résidus de production (d et e). Cependant elle n'apparaît plus dans les trois dimensions. La structure apparemment conservée sur la sciure n'est plus identifiable sur les résidus. Les fibres apparaissent enchevêtrées de manière anarchique, traduisant les effets du procédé de fabrication (f et g). De nombreuses particules sont présentes sur les fibres résiduelles (g et i), rappelant la structure des SHB observée précédemment (§ 4.1.2). Cette structure est même clairement retrouvée à la surface du résidu (i) indiquant la présence de molécules humiques non extraites.

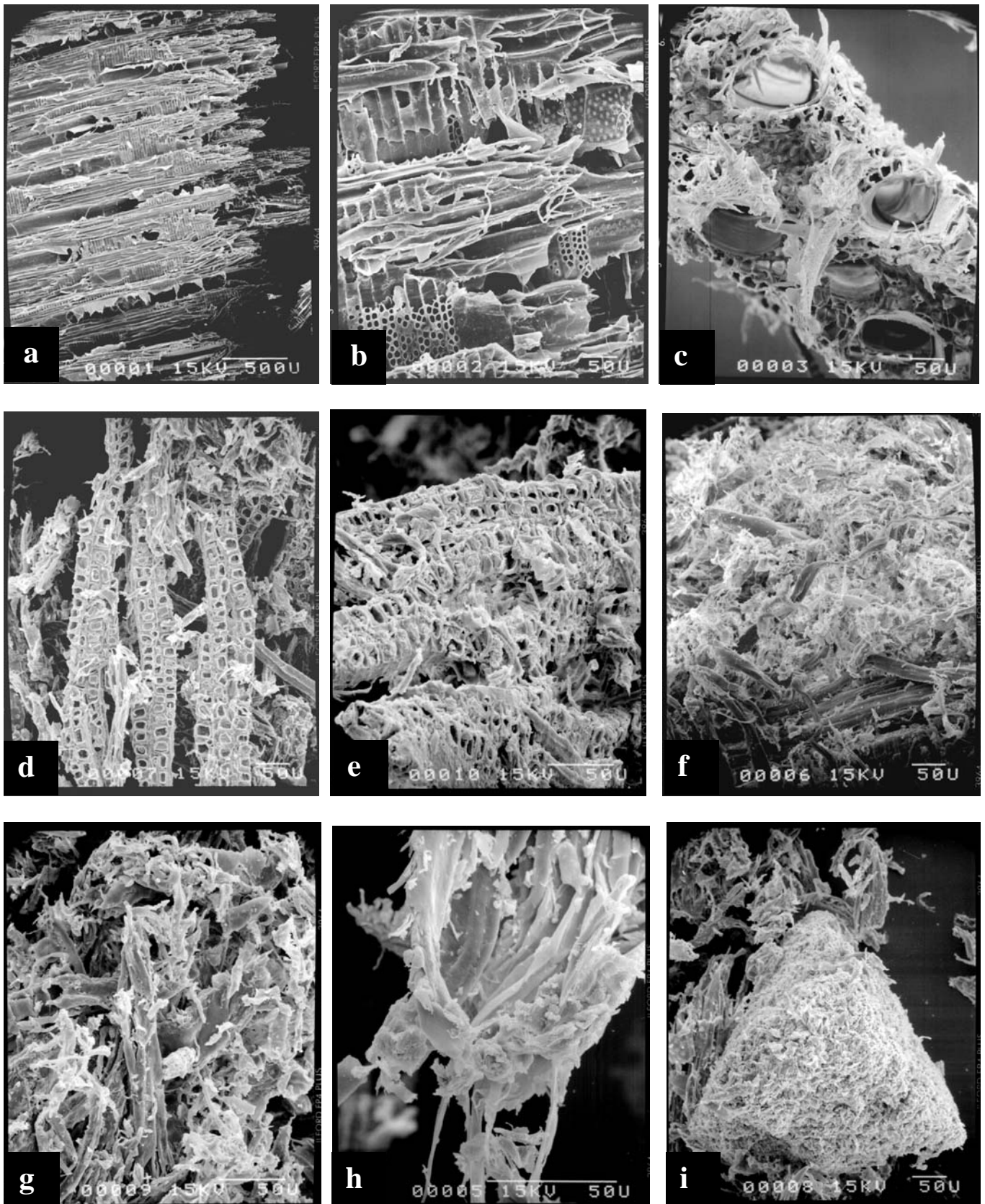


Figure 33 - Observation de la sciure et du résidu en microscopie électronique à balayage
a : sciure brute grossi 40x (vue supérieure); b : sciure brute grossi 200x (vue supérieure) ; c : sciure brute grossi 200x (vue transversale) ; d : résidu de sciure grossi 200x (vue supérieure) ; e : résidu de sciure grossi 400x (vue transversale) ; f : résidu de sciure grossi 200x (vue supérieure) ; g : résidu de sciure grossi 400x (vue supérieure) ; h : résidu de sciure grossi 800x (vue supérieure) ; i : substance humique présent à la surface des résidus de sciure grossi 200x (vue supérieur).

4.2.5 Lavage des résidus

Un lavage des résidus de production de SHS est réalisé afin de déterminer s'il reste des substances humiques à extraire. Ce lavage est réalisé en plaçant les résidus en solution aqueuse, sous agitation pendant des temps définis (1h, 3h et 6h). L'extraction, que l'on qualifiera de secondaire, est réalisée par filtration directement après le temps de lavage ou suivant l'autoclave de la solution (1heure à 1bar et 120°C) pour reproduire les conditions initiales de fabrication. Trois lavages successifs sont effectués sur le même résidu (lavage 1, 2 et 3) jusqu'à épuisement de l'extraction.

Les solutions humiques extraites sont présentées tableau 30. Elles sont caractérisées par la mesure de leur teneur en carbone et potassium et la détermination du ratio E_4/E_6 .

	Carbone	Potassium	E_4/E_6
Lavage 1-non autoclavé – 1h	1.65	-	7.2
Lavage 1-non autoclavé – 3h	1.7	2.9	6
Lavage 1-non autoclavé – 6h	1.7	-	3.7
Lavage 1- autoclavé – 1h	2.07	-	11.7
Lavage 1- autoclavé – 3h	2.28	3.1	11.2
Lavage 1- autoclavé – 6h	2.52	-	9
Lavage 2-non autoclavé – 3h	0.2	2.6	-
Lavage 2- autoclavé – 3h	0.25	2.8	-
Lavage 3-non autoclavé – 3h	0.03	2.5	-
Lavage 3- autoclavé – 3h	0.03	2.7	-

Tableau 30 - Conditions expérimentales du lavage des résidus de sciure

- observation des résidus

Les extractions successives du résidu entraînent une perte de couleur de plus en plus importante des fibres jusqu'à obtention d'une teinte blanche (figure 34).



Figure 34 - Evolution de la couleur de la sciure

- Teneur en carbone

La teneur en carbone des solutions humiques extraites augmente proportionnellement avec le temps de lavage (figure 35). Cependant la quantité de carbone extraite des solutions non autoclavées, au bout de 6 heures (1.7 g.L^{-1}) est très proche de celle obtenue après une heure de lavage (1.65 g.L^{-1}). Quelle que soit la durée du lavage, l'extraction des SHB est plus importante suite à l'autoclave du mélange. L'extraction secondaire permet d'obtenir au maximum 2.50 g.L^{-1} de carbone pour les solutions autoclavées contre 1.7 g.L^{-1} de carbone pour les solutions non autoclavées. Cette extraction secondaire correspond à 20% de l'extraction réalisée lors du procédé initial (13.2 g.L^{-1})

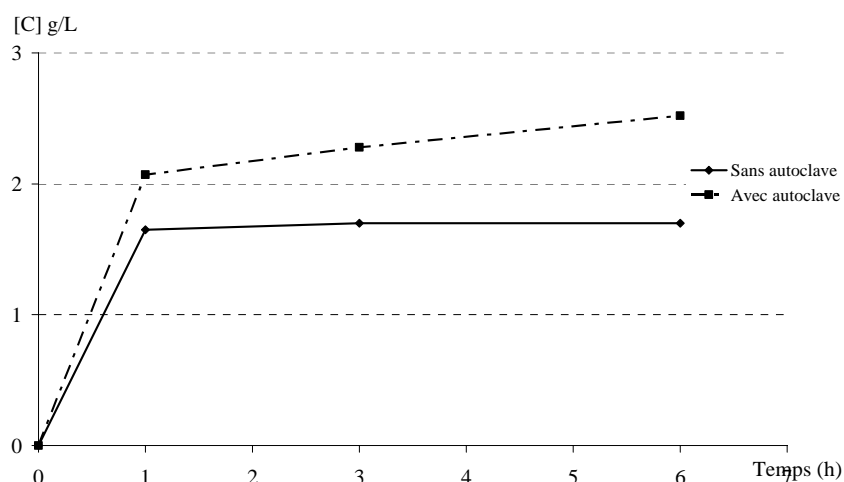


Figure 35 - Evolution de la concentration en carbone des SH autoclavés et non autoclavés en fonction du temps de lavage

Dans les deux types d'expérimentation, l'épuisement du résidu est rapidement atteint (figure 36). Une seule nouvelle extraction suffit pour extraire les SHB restant dans le résidu, 2.3 g.L^{-1} pour les SH autoclavées et 1.7 g.L^{-1} pour les SH non autoclavées.

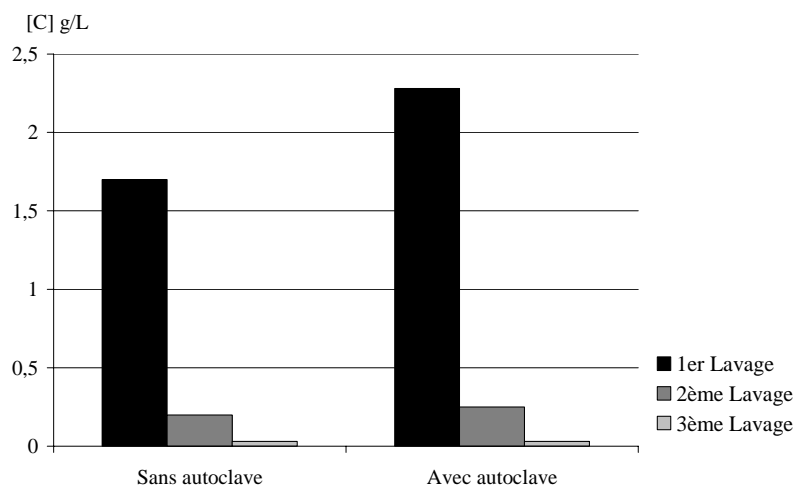


Figure 36- Evolution de la concentration en carbone des SH autoclavés et non autoclavés en fonction du nombre de lavage

- Ratio E_4/E_6

Le ratio E_4/E_6 des solutions humiques autoclavées ou non, diminue quand le temps de lavage augmente, indiquant une extraction de molécules de plus en plus grosses (figure 37). Les ratios déterminés sur les solutions humiques non autoclavées présentent des valeurs comprises entre 9 et 11, caractéristiques de molécules de petites tailles, assimilées à des acides fulviques. Les ratios des SH autoclavées sont plus faibles (entre 4 et 7) et sont représentatifs de particules de poids moléculaires plus importants, de type acides humiques. L'autoclave semble provoquer l'extraction de molécules de plus grosses tailles.

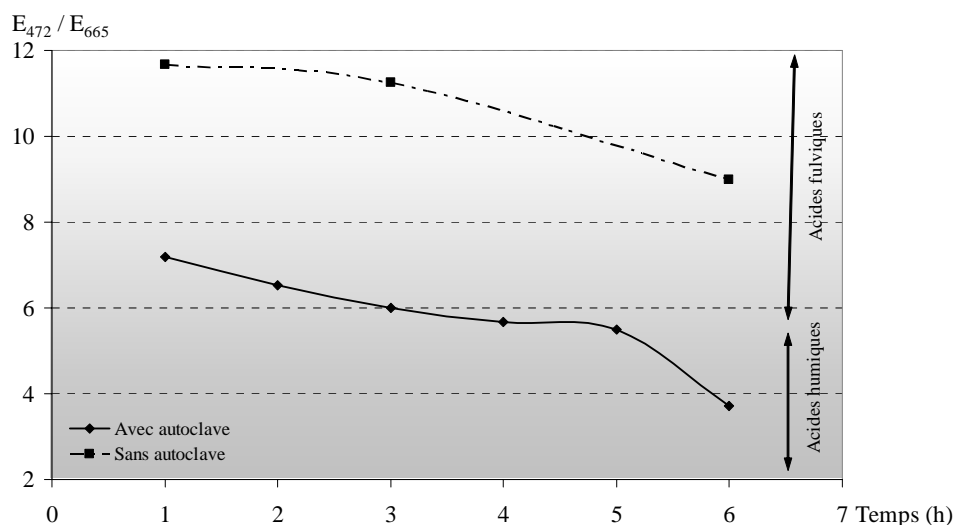


Figure 37 - Evolution du ratio E_4/E_6 des SH autoclavées et non autoclavées en fonction du temps de lavage

- Teneur en potassium

La teneur en potassium des SH autoclavées ou non, est logiquement très proche en raison de la teneur initiale en potassium du résidu (figure 38). Elle diminue au fur et à mesure des lavages mais de manière moins importante que le carbone. Cette diminution correspond au transfert des ions potassium vers les solutions de SHB. Ainsi au bout du troisième lavage, la concentration reste comprise entre 2.5 et 2.7 $g.L^{-1}$ alors qu'elle était de 2.9 à 3.1 $g.L^{-1}$ suite au premier lavage. La remise en solution des résidus permet l'augmentation du pH et la formation d'une solution alcaline qui explique en partie l'extraction de molécules humiques lors du premier lavage.

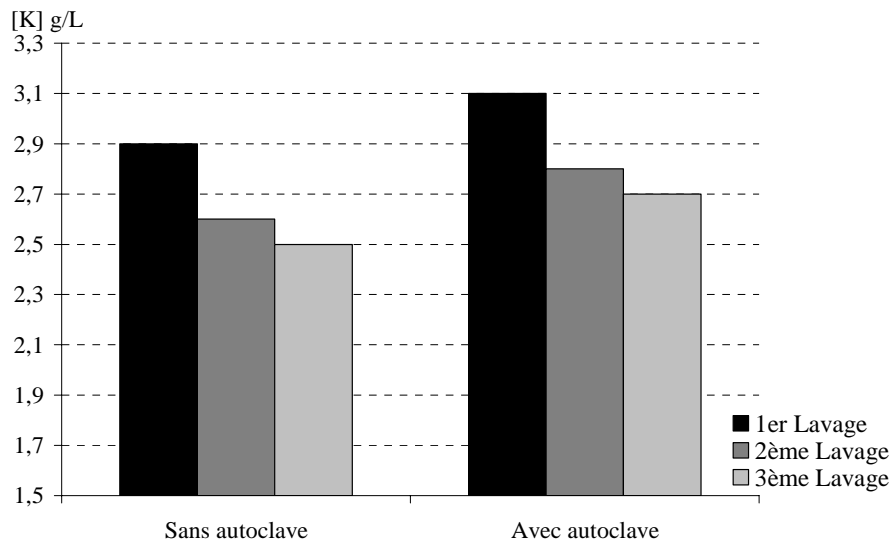


Figure 38 - Evolution de la concentration en potassium (K) des SH autoclavées et non autoclavées en fonction du nombre de lavage

⇒ Le lavage des résidus montre qu'il reste des SH à extraire au sein de la fraction solide.

⇒ Le poids moléculaire des particules extraites semble proportionnel au temps d'extraction (ratio E_4/E_6 plus élevé). Ceci s'explique par l'augmentation du temps de contact qui facilite l'action de la solution alcaline formée.

⇒ L'autoclave des solutions induit une extraction plus importante de SH du fait d'une probable synergie entre l'attaque de la température et l'extraction alcaline.

4.3 DISCUSSION

4.3.1 Transformation de la matière première

Pour évaluer l'efficacité du procédé sur la transformation de la matière première, le rendement de la fabrication est déterminé en mesurant la quantité de sciure transformée. Deux types de calcul sont effectués (tableau 31).

L'analyse des résidus de fabrication des substances humiques permet de comparer le poids sec des résidus à la matière sèche initiale et donc d'en déduire la masse de matière première transformée.

L'analyse du carbone, élément utilisé pour estimer la concentration des SHB, est également réalisée au sein des matières premières et des produits finaux, et permet aussi d'effectuer un bilan de la transformation du bois.

	Poids sec		Teneur en carbone	
	grammes	% de matière sèche	% de matière sèche	% de matière première
Matière première	50	-	52	100
Résidu	34.2	68.4	33	75
SHB (par déduction)	15.8	31.6	19	25

Tableau 31- Rendement du procédé

Quelle que soit la méthode employée, les rendements calculés sont proches. Un tiers de la matière sèche de la sciure est dégradée ; cette proportion correspond à un quart du carbone retrouvé dans la composition des SHB.

Ces observations rejoignent les résultats obtenus lors de l'étude de la dégradation des fibres du bois (§4.2.3) qui montrent que la teneur en composés lignocellulosiques diminue après chaque étape du procédé. Cette transformation de la sciure traduit l'enrichissement des solutions de substances humiques en matière organique. Au total, 27 % des constituants primaires initiaux ont été transformés pour se retrouver dans la phase liquide.

La transformation de matière première dégradée produit 60% d'acides humiques et 40% d'acides fulviques (§4.1.1). Les caractéristiques distinctes de ces deux fractions suggèrent une origine différente pour chacune d'entre elles.

4.3.2 Origine et formation des substances humiques biomimétiques

4.3.2.1 Comparaison de la dégradation de la sciure et d'un mélange des constituants du bois

La démarche expérimentale de notre étude consistait à observer les effets du procédé de fabrication sur les constituants primaires du bois (sciure) et de les comparer à ceux observés sur un mélange des composés (cellulose, hémicellulose, lignine) de composition analogue à celle du bois.

Les résultats montrent une détérioration assez proche des composés des deux échantillons. A l'issue du procédé de fabrication, la quantité de résidu produit (§4.2.2) et la fraction carbonée, transférée dans l'extrait liquide (§4.3.1) sont très proches. Les SHS et SHM comportent deux types de molécules (§4.1.2) représentant des compositions en acides humiques et fulviques (§4.1.1) similaires.

Les seules différences observées concernent le pourcentage de dégradation des échantillons : la sciure de bois (31.6%) est moins dégradée que le mélange des constituants (43.9%).

L'absence de liaisons intra et inter moléculaires dans le mélange des constituants primaires facilite probablement le procédé de dégradation et explique les valeurs supérieures mesurées pour cet échantillon.

La structure de la sciure observée en microscopie électronique à balayage (§4.2.4) confirme cette interprétation et montre la structure plus dégradée de la matière première attaquée seule.

L'observation de la dégradation du mélange, puis celle des constituants primaires seuls, peut être considérée comme une bonne estimation de la dégradation de la sciure et permet d'émettre des hypothèses sur l'origine des molécules présentes dans les SHB (§ 4.3.2.3).

4.3.2.2 Etude de la dégradation des constituants primaires du bois

Les effets du procédé de préparation des SHB, ont été étudiés sur les principaux constituants primaires pris séparément. La détermination du rendement du procédé sur les constituants primaires renseigne sur la réactivité de chaque composé et leur implication dans la production de SHB (tableau 32).

SHB	Sciure	Cellulose	Lignine	Hémicellulose	Mélange
Matière première (g)	50	50	50	50	50
Résidu (g)	34.2	44	0	2	28.05
SHB (g)	15.8	6	50	48	21.5

Tableau 32 - Rendement massique du procédé

Comme précédemment, le rendement massique (% de matière initiale) et le rendement calculé à partir de la teneur en carbone (% de matière première) sont déterminés (figure 39). Les rendements calculés d'après les deux méthodes sont proches et montrent que la dégradation des constituants varie en fonction de leur nature.

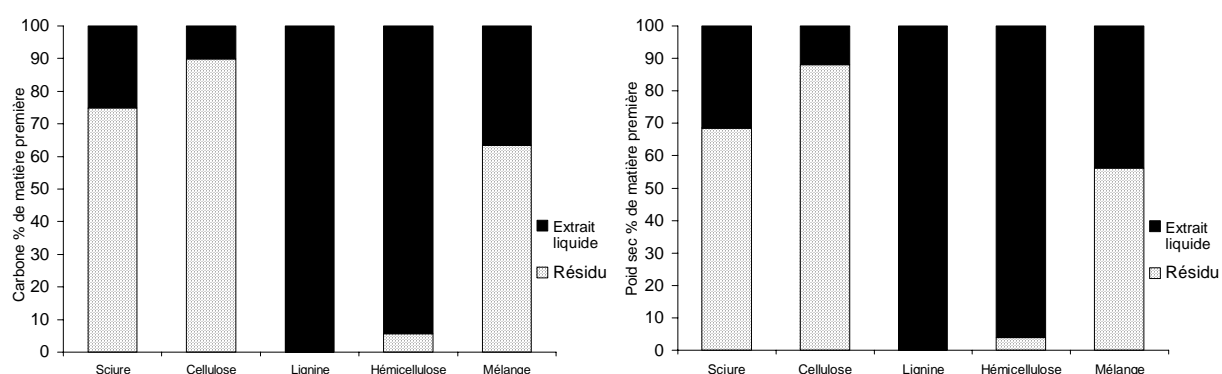


Figure 39 - Répartition du poids sec et du carbone des produits finaux

L'étude de la dégradation des fibres du bois (§4.2.3) est une troisième méthode permettant d'observer l'efficacité du procédé sur les constituants. Chacune des deux étapes du procédé induit des modifications particulières de ces composés. La nature des constituants les plus altérés indique les mêmes tendances que celle observées sur l'attaque des composés seuls. Elles permettent de préciser l'origine des substances humiques.

- Cellulose

La cellulose semble partiellement attaquée par le procédé. La couleur beige du résidu, sa texture (figure 31) et la couleur jaune des SH formées (figure 26) n'indiquent pas de grande transformation de la matière brute. Le poids sec de résidu obtenu à partir de cellulose pure ou la quantité de cellulose transformée au sein de la sciure, confirme la faible dégradation de ce constituant. La cellulose est plus sensible à la phase d'extraction alcaline (Blasej and Kosik, 1985; Garves, 1985).

L'analyse du carbone montre que 10 % du carbone total est transféré dans l'extrait liquide, la majorité restant dans le résidu. Cette faible concentration en carbone (7.2 g.L^{-1}) témoigne d'une transformation modérée et explique la couleur de la solution.

Le fort ratio E_4/E_6 (10) confirme la présence majoritairement d'acides fulviques (70%) qui indique la formation préférentielle de petites molécules.

La proportion importante de cellulose (55%) dans la composition du bois, explique le pourcentage élevé d'acides fulviques dans les SHB.

- Lignine

La lignine est très largement dégradée et ne fournit aucun résidu suite à l'extraction. Sa dégradation se traduit par un transfert de l'intégralité du carbone dans la phase liquide. La concentration de l'extrait de lignine est donc importante (13 g.L^{-1}) et lui fournit une couleur noire, intense.

Au sein des fibres du bois plus de 60% de la lignine est altérée (§4.2.3), sa dégradation est essentiellement réalisée lors de la phase thermique du procédé. En effet, les rendements de délignification sont faible en présence uniquement d'alcalis (Cang Sun et al., 2000)

Cette étape engendre la formation de particules de hauts poids moléculaires justifiant une forte teneur en acides humiques (99.2%). Le ratio E_4/E_6 (1.9) très faible, confirme cette forte teneur.

La lignine représente l'un des constituants les plus réactifs au procédé et peut être considérée comme la source majeure de carbone, cependant sa faible proportion relative (25%) dans la composition du bois limite l'apport de carbone dans les SHS et SHM.

- Hémicellulose

L'hémicellulose subit également une détérioration importante (96%) qui ne laisse qu'un faible résidu beige (4%). Ces résultats se confirment au niveau des fibres du bois où la transformation de l'hémicellulose est réalisée au cours de l'extraction alcaline. L'hémicellulose est facilement solubilisée en milieu alcalin (Patt and Kordsachia, 1991).

La forte concentration en carbone (41.7 g.L^{-1}) et la couleur des SH obtenues traduisent la conversion de la matière organique dans la phase liquide.

Le faible ratio E_4/E_6 (3.9) indique la formation majoritaire de particules de hauts poids moléculaires et confirme la teneur en acides humiques (82.5%).

4.3.2.3 Origine des SHB

Pour déterminer l'origine des molécules composant les SHB, il est nécessaire de tenir compte de la proportion relative de chaque constituant dans la matière première.

4 – Caractérisation et origine des substances humiques biomimétiques

La quantité de composé primaire (cellulose, hémicellulose et lignine) transformée et présente dans les SHB est déterminée selon la formule suivante :

$$\% \text{ de constituant dans les SHB} = \frac{(\text{Masse initiale} - \text{Masse dans le résidu})_{\text{constituant}} \times 100}{(\text{Masse initiale} - \text{Masse dans le résidu})_{\text{Somme des constituants}}}$$

NB : les calculs sont réalisés d'après les résultats obtenus dans l'étude de la dégradation des fibres du bois (§4.2.3).

La figure 40 résume et schématise la transformation des constituants primaires du bois.

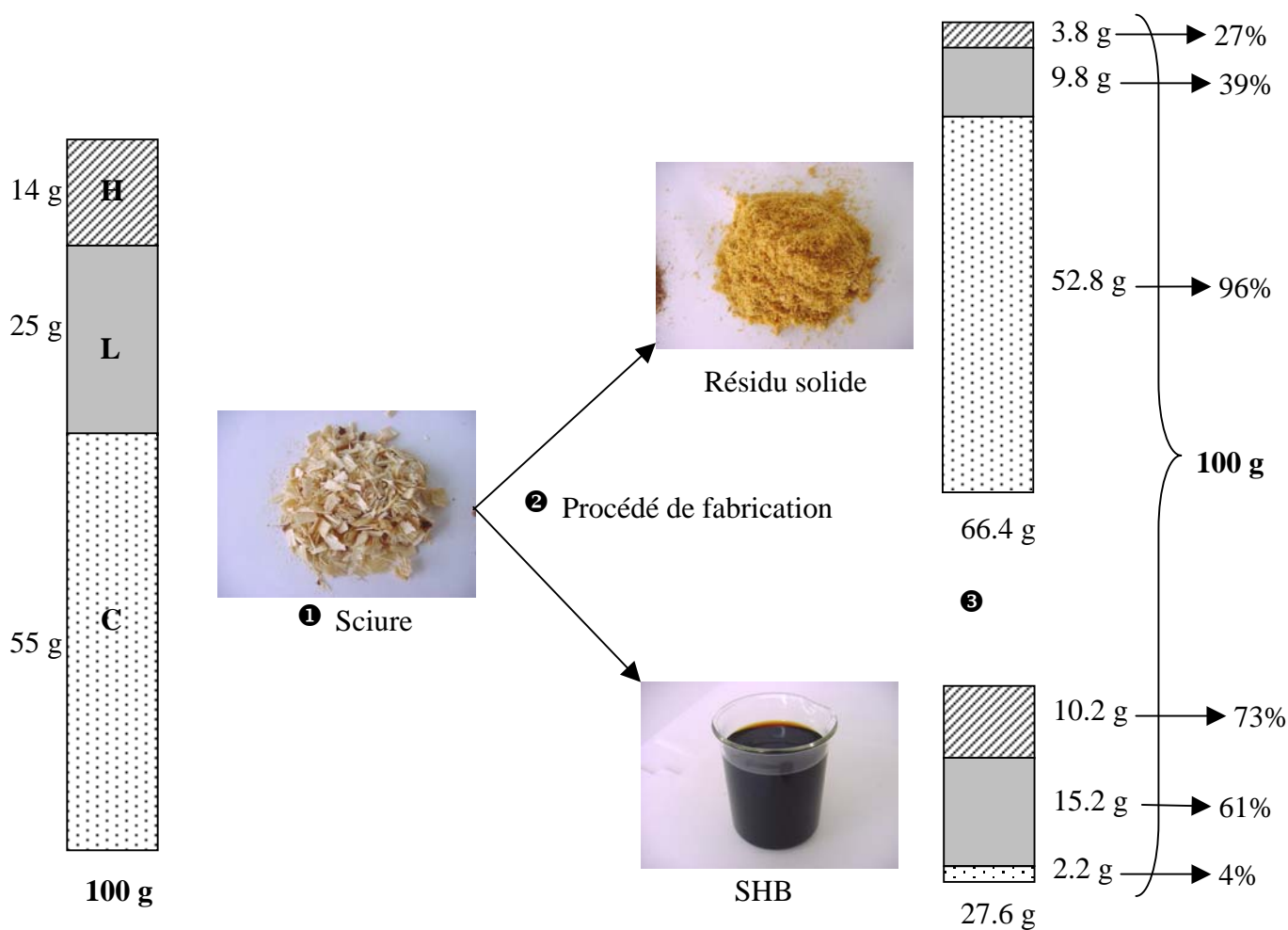


Figure 40 – Transformation des constituants primaires du bois

❶ La sciure de peuplier est constituée de 55% de cellulose, 14% d'hémicellulose et 25% de lignine.

❷ Le procédé de fabrication induit la dégradation de 4% de cellulose, 73% d'hémicellulose et 61% de lignine (§4.2.3) qui passe dans l'extrait liquide.

③ Le résidu solide contient 52.8 g de cellulose, 9.8 g de lignine et 3.8 g d'hémicellulose. La matière dégradée se retrouve dans les SHB à raison de 2.2 g de cellulose, 10.2 g d'hémicellulose et 15.2 g de lignine pour 100 g de sciure sèche initiale, soit 8% de cellulose, 37% d'hémicellulose et 55% de lignine (figure 41).

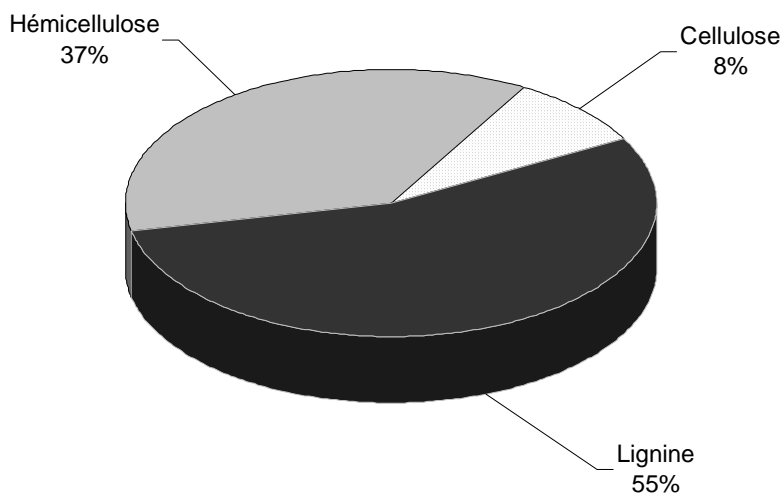


Figure 41 - Composition des SHB

Les SHB comportent 60% d'acides humiques et 40% d'acides fulviques. L'origine des fractions humiques et fulviques (figure 42) est calculée selon le calcul suivant:

les SHB contenant 8% de cellulose et la transformation de la cellulose produisant 30.5% d'acides humiques, la transformation de 100 g de sciure produit 2.4 g d'acides humiques issus de la cellulose, soit (3%).

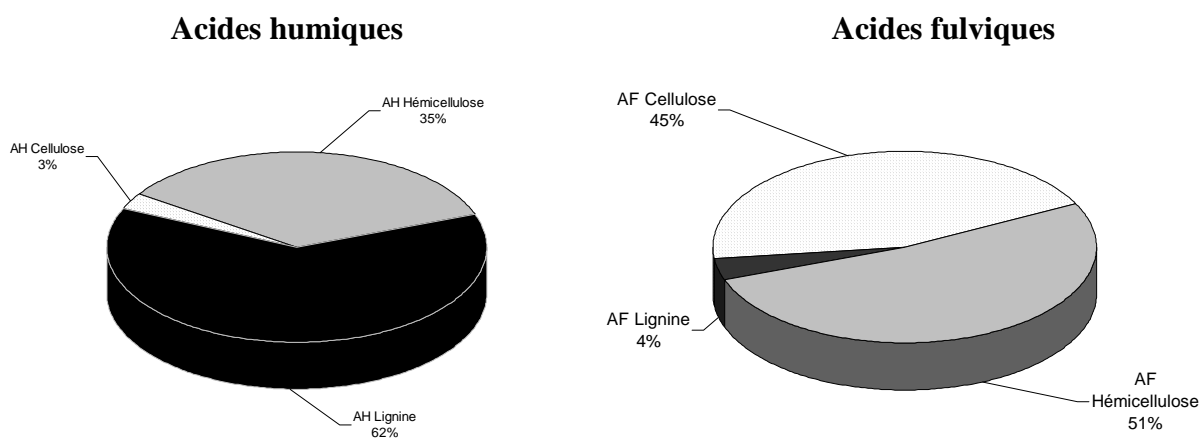


Figure 42 – Composition des acides humiques et fulviques

Les acides humiques comportent une majorité de molécules dérivées de la lignine (62%). Les acides fulviques sont formés à partir de la transformation de l'hémicellulose (51%) et de la cellulose (45%).

En résumé

⇒ Dans les conditions expérimentales utilisées, les SHB produites à partir de la sciure sont majoritairement issues de la dégradation de la lignine et de l'hémicellulose.

⇒ La dégradation de la lignine produit essentiellement des acides humiques.

⇒ La transformation de la cellulose fournit majoritairement des acides fulviques.

⇒ La transformation l'hémicellulose engendre des acides humiques et fulviques.

5 EFFETS DES SHB SUR PLANTES ENTIERES

5.1 OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'étude de la bibliographie concernant les effets des substances humiques sur les plantes (§2.3.2) montre clairement l'extrême hétérogénéité des résultats obtenus et des effets observés. La principale explication réside dans l'impossibilité d'expérimenter des produits humiques de qualité homogène et reproductible. L'intérêt et l'originalité des expérimentations réalisées dans ce travail reposent sur l'utilisation d'une matière première homogène, traitée par un procédé physico-chimique aux paramètres définis précisément et permettant l'obtention des SHB de qualité homogène et reproductible. D'après les nombreux essais effectués au laboratoire depuis 6 ans avec ces produits, les effets obtenus sur les plantes dépendent de l'espèce choisie et de la dose appliquée. L'objectif de ce chapitre est d'appliquer les SHB à deux espèces cultivées très différentes :

- le pélarгонium, (*Pélargonium x hortorum*) plante dicotylédone, vivace au feuillage persistant de la famille des Géraniacées, multipliée principalement par voie végétative, cultivée essentiellement pour sa floraison abondante et utilisée comme plante ornementale et odorante,
- le maïs (*Zea mays l.*) plante monocotylédone, annuelle au feuillage caduque de la famille des Poacées, multipliée par semis, cultivée pour ses grains essentiellement utilisés en alimentation animale.

Les effets des SHB seront étudiés sur des paramètres intéressant les horticulteurs et les agriculteurs, par des mesures biométriques de la croissance et du développement (§3.6.1), ainsi que par des mesures de consommation hydrique et minérale. La technique choisie pour étudier ces effets consiste à ajouter le produit humique à faible concentration dans la solution nutritive (10 millilitres de SHB par litre de solution nutritive).

Dans un premier temps, pour chaque espèce, la dose optimale sera déterminée en observant les effets d'une gamme de concentrations croissantes en SHB dans la solution nutritive apportée aux différents traitements.

Cette dose optimale sera ensuite utilisée lors d'un essai comportant un plus grand nombre de répétitions pour confirmer les résultats obtenus.

Enfin, pour chaque espèce et à la dose optimale, les effets des fractions humiques et fulviques issues des SHB seront étudiés et comparés à ceux obtenus avec les substances humiques complètes.

5.2 EFFETS DES SUBSTANCES HUMIQUES BIOMIMETIQUES SUR LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DU PELARGONIUM

5.2.1 Recherche de la dose efficace

5.2.1.1 Rappel des conditions expérimentales

Afin de préciser la dose d'utilisation optimale, les effets de concentrations croissantes de SHB (25 à 50 mg.L⁻¹) sont testés sur une culture hydroponique de pélargonium. L'essai est mené pendant 8 semaines sur 28 plantes.

Code	Traitement	Dose (mg.L-1)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	4
H25	Solution nutritive + SHB	25	4
H30	Solution nutritive + SHB	30	4
H35	Solution nutritive + SHB	35	4
H40	Solution nutritive + SHB	40	4
H45	Solution nutritive + SHB	45	4
H50	Solution nutritive + SHB	50	4
Total	7 traitements		28 plantes

Rappel du plan expérimental n°1

Les résultats présentés (chiffres détaillés en annexe n°4) ne révèlent pas d'écart significatif aux seuils de 5 et 10 % du fait de l'hétérogénéité induite par la variabilité génétique des plantes. Cependant les différentes mesures effectuées permettent de mettre en évidence des tendances relatives aux effets des SHB sur le pélargonium.

5.2.1.2 Croissance et développement des pélargoniums

- Etude de la croissance

L'observation de l'augmentation du poids frais des plantes au cours de la culture indique une croissance similaire pour tous les traitements durant les 4 premières semaines. A partir de la

semaine 5, les plantes traitées présentent une croissance légèrement supérieure aux plantes témoins. Cette tendance s'observe jusqu'à la récolte des plantes, les traitements H45 et H50 possèdent alors le poids frais le plus élevé (figure 43).

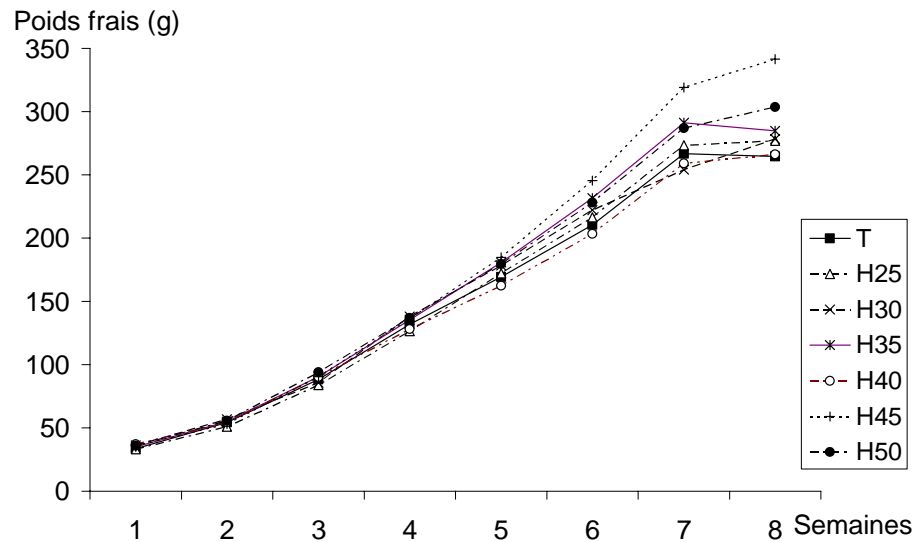


Figure 43 - Evolution du poids frais des plantes en cours de culture

L'effet des SHB sur le poids frais des pélargoniums semble positif pour toutes les concentrations appliquées, avec un maximum de croissance pour les traitements H45 et H50 (figure 44).

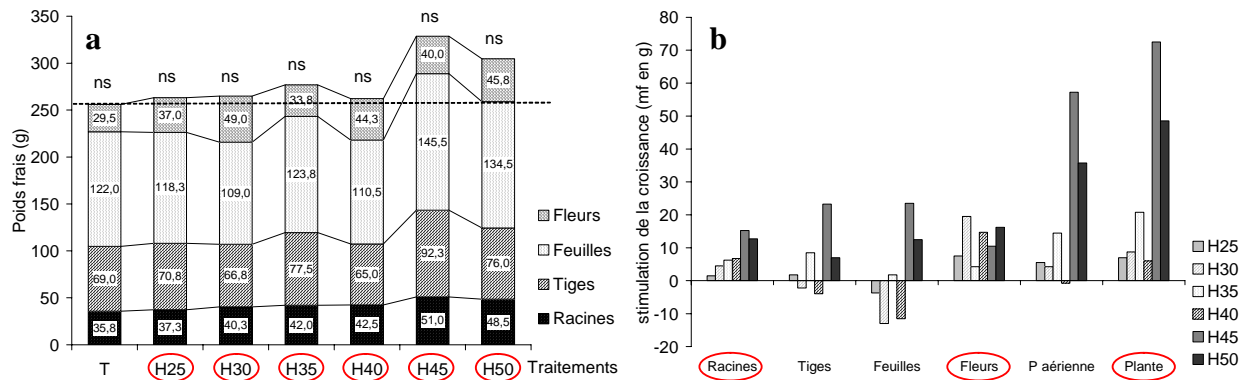


Figure 44 - Répartition du poids frais en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin)

L'étude comparative des traitements permet de calculer les différences de biomasse entre les plantes et d'estimer ainsi l'augmentation de la croissance induite par rapport au témoin, par les différents traitements au niveau de chaque plante et de chaque organe. Le calcul réalisé est le suivant :

$$\text{masse fraîche}_{\text{traitement}} - \text{masse fraîche}_{\text{témoin}}$$

Pour l'ensemble des plantes traitées l'accroissement du poids frais total des plantes entières est vérifié (figure 44). Cette stimulation semble proportionnelle aux concentrations de SHB testées, mêmes si les traitements H40 et H50 présentent des valeurs aléatoires. De manière générale, l'accroissement maximal apparaît pour les doses de 45 et 50 mg.L⁻¹ de carbone. Il correspond à une production de matière fraîche de 28.3% supérieure au témoin pour le traitement H45.

L'étude du poids frais des organes montre que seules les racines et les fleurs présentent un accroissement de leur masse pour tous les traitements. L'augmentation de biomasse des racines est proportionnelle à la concentration de SHB utilisée, hormis pour H50 qui reste inférieure à H45. Cet organe semble être le plus affecté par la présence de SHB.

Seuls les traitements H35, H45 et H50 ont un poids frais supérieur au témoin pour chaque organe. Les plantes de ces traitements semblent plus stimulées par les SHB.

Les tendances observées sur la matière fraîche des végétaux ne se confirment pas sur la matière sèche des plantes, car seuls les traitements H35 et H45 induisent un poids sec total supérieur à celui du témoin (figure 45).

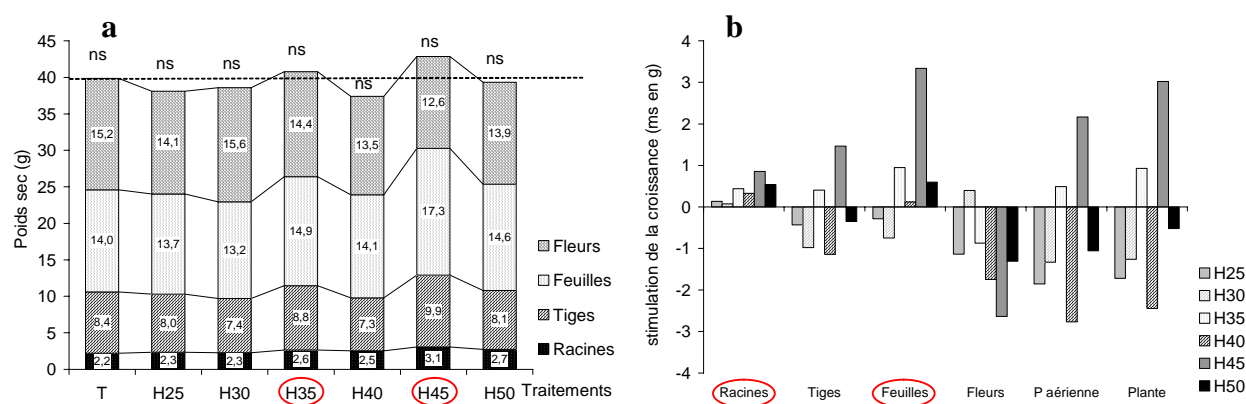


Figure 45 - Répartition du poids sec en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin)

L'accroissement du poids sec des plantes entières correspond à une faible augmentation de la masse sèche de 1% (H35) à 4% (H45). L'ensemble des autres traitements n'entraîne pas d'augmentation de la masse sèche des plantes.

L'étude des organes indique que seule la masse sèche des racines des plantes traitées est supérieure à celle du témoin confirmant la stimulation de la croissance observée pour les poids frais de cet organe par les SHB. Les feuilles présentent également un accroissement de matière

sèche pour des concentrations de SHB comprises entre 35 et 50 mg.L⁻¹. Le poids sec des autres organes varie de façon aléatoire.

Les traitements H45 et H35 dans une moindre mesure, induisent un gain de matière sèche pour chaque organe hormis pour les fleurs. Ceci explique que seuls ces traitements enregistrent une augmentation de matière sèche.

L'observation de la répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes permet de mieux comprendre les écarts observés entre les poids de matière fraîche et de matière sèche.

Le tableau 33 présente la teneur en eau des végétaux, déterminée à la récolte. Il indique une variabilité de composition entre les plantes témoins et les plantes traitées. En effet, ces dernières présentent une teneur en eau plus importante, pour les plantes entières (2.3 % entre H50 et le témoin) que pour les organes (jusqu'à 29.7% d'eau en plus pour les fleurs H40). La teneur en eau croît avec la concentration de SHB des traitements. Seule la teneur en eau des feuilles est inférieure à celle du témoin pour tous les traitements.

	Teneur en Eau (%)						
	Témoin	H25	H30	H35	H40	H45	H50
Racine	93.8	93.8	94.3	93.8	94.1	94	94.4
Tiges	87.9	88.9	89	88.7	88.7	89.3	89.2
Feuilles	88.4	88.1	87.8	87.8	86.1	87.4	88.7
Fleurs	39.4	51.5	68.5	56.3	69.1	67.8	61.5
P aérienne	82.4	83.1	84.2	83.6	83.4	85.4	84.8
Plante entière	84.1	84.8	85.7	85.2	85.3	86.8	86.4

Tableau 33 – Teneur en eau des organes et des plantes entières (%)

Ces résultats expliquent en partie, les différences précédemment observées entre les poids frais et les poids secs des plantes. Malgré un poids frais systématiquement supérieur par rapport aux plantes témoins, seules les plantes traitées par H35 et H45 présentent un poids sec supérieur aux témoins (flèche sur la figure 46). Les plantes traitées possèdent une teneur en eau généralement supérieure aux plantes témoins. De ce fait, les SHB ont donc un effet plus important sur le poids frais que sur le poids sec.

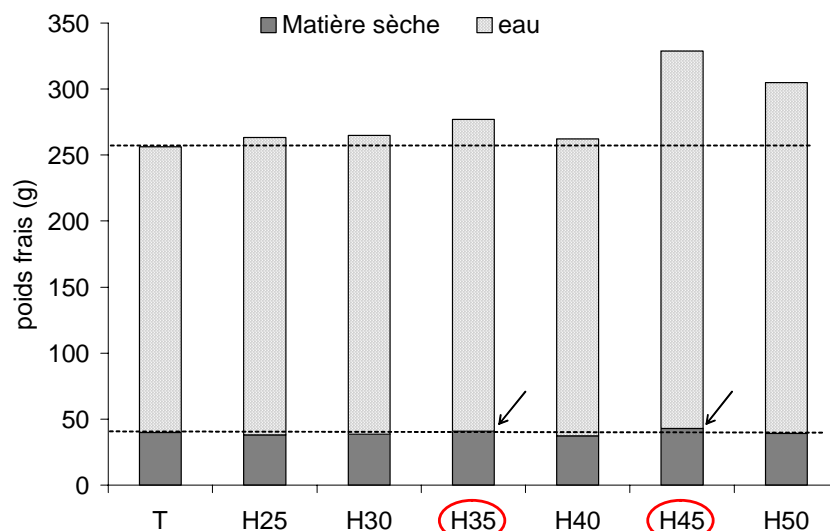


Figure 46 - Répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes

- Etude du développement

L'étude du développement consiste à observer et dénombrer l'apparition de nouveaux organes tels que les fleurs, les feuilles ou la structure des racines.

Le nombre de feuilles total à la récolte ne varie pas de manière significative, les valeurs sont proches de la moyenne du témoin (90) et comprise entre un minimum de 83.2 pour H25 et un maximum de 97 pour H45. Cependant la production de feuilles est stimulée de 2 à 7% pour les traitements H30, H35 et H50 et jusqu'à 12% pour les plantes H45 (tableau 34).

Code	Nb feuilles initiales	Nb feuilles finales	Feuilles produites	Stimulation / témoin	
				Nb	%
Témoin	16.50	90.00	73.50		
H25	13.75	83.25	69.50	- 4	- 5.4%
H30	16.75	95.75	79.00	+ 5.5	+ 7.5%
H35	14.75	92.00	77.25	+ 3.75	+ 5.1%
H40	17.75	90.25	72.50	- 1	- 1.3%
H45	14.50	97.00	82.50	+ 9	+ 12%
H50	17.00	92.25	75.25	+ 1.75	+ 2.3%

Tableau 34 - Nombre moyen de feuilles par plante

Pour l'ensemble des traitements, l'ajout de SHB semble stimuler la floraison. Le nombre de fleurs produites est plus important pour les traitements H30 et H35 qui présentent une augmentation respective de 12.5% et 15% par rapport au témoin. Il démontre l'influence des SHB sur la floraison à ces concentrations (tableau 35).

Le poids sec des fleurs ne reflète pas la taille réelle des bouquets récoltés, en raison d'une importante teneur en eau. Ainsi, les fleurs produites par les plantes traitées aux SHB s'avèrent de taille plus importante que les fleurs des plantes témoins.

	Fleurs	Stimulation / témoin	
		Nb	%
Témoin	16		
H25	16	+0	+0
H30	18	+2	+12.5%
H35	18,5	+2.5	+15.6%
H40	17	+1	+6.3%
H45	16,5	+0.5	+3%
H50	16,5	+0.05	+3%

Tableau 35 - Nombre moyen de fleurs par plante

La longueur maximale moyenne des racines présente des variations importantes autour de la valeur témoin (32.5 cm). La majorité des plantes traitées présentent une longueur du système racinaire inférieure de 3 à 20% à celle du témoin (tableau 36). La stimulation est positive pour le traitement H50 (+16.9%) et H35 (+1.5%).

	Racine (cm)	Stimulation / témoin	
		Longueur	%
Témoin	32,5		
H25	31,3	-1.2	-3,7%
H30	26,0	-6.5	-20,0%
H35	33,0	+0.5	+1,5%
H40	30,0	-2.5	-7,7%
H45	28,5	-4	-12,3%
H50	38,0	+5.5	+16,9%

Tableau 36 - Longueur des racines

A la récolte, l'étude des racines permet d'observer des morphologies de système racinaire différentes en fonction des traitements. Les plantes traitées présentent des racines moins longues et plus ramifiées que les plantes témoins (figure 47).



Figure 47 – Système racinaire de plantes témoins et traitées en fin de culture

Pour estimer l'influence des SHB sur la ramification du système racinaire, la corrélation entre l'évolution de la longueur et du poids sec des racines a été établie. Une corrélation positive représente l'augmentation simultanée de la longueur maximale et du poids sec des racines et indique un développement en longueur du système racinaire. En revanche, une corrélation négative correspond à une diminution de la longueur maximale, inversement proportionnelle à l'augmentation de poids sec. Elle caractérise la ramification du système racinaire.

La figure 48 montre que la longueur du système racinaire des plantes traitées diminue lorsque leur poids sec augmente. Les SHB induisent la formation de racines moins longues mais plus nombreuses et favorisent la ramification du système racinaire, rendant la surface de contact totale des racines probablement plus importante. Cette tendance semble augmenter avec la concentration de SHB (pente plus importante), elle est maximale pour le traitement H40.

Le système racinaire des plantes témoins et H35 se développe de manière nettement différente. La longueur des racines de ces plantes augmente avec leur poids sec. Les plantes produisent des racines longues et peu ramifiées.

Hormis pour le traitement H50, la longueur maximale des racines reflète la structure du système racinaire

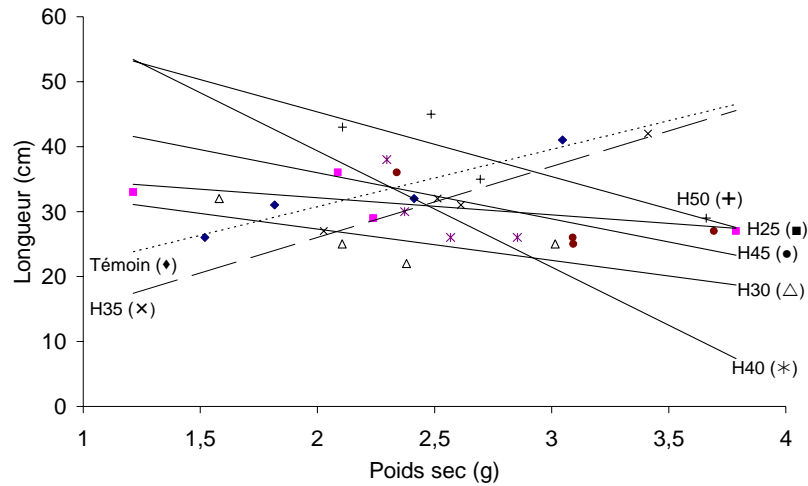


Figure 48 – Effet des SHB sur la ramification du système racinaire

Le calcul du rapport entre le poids sec de la partie aérienne sur le poids sec de la partie racinaire permet d'observer la croissance relative de chaque partie. La diminution du ratio avec des concentrations croissantes de SHB, traduit un développement supérieur de la partie racinaire par rapport à celui de la partie aérienne (figure 49).

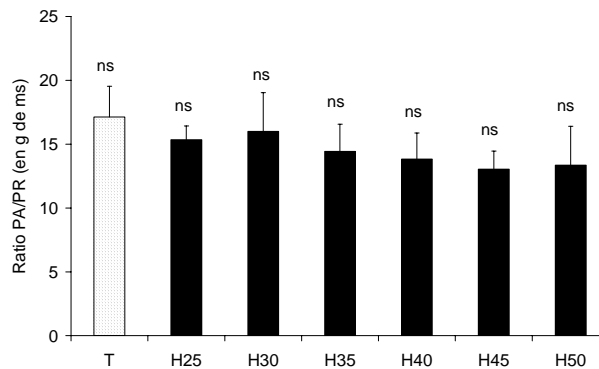


Figure 49 - Croissance relative des parties aériennes et racinaires

5.2.1.3 Evolution des solutions nutritives

Lors de la mise en culture, l'écart de pH entre les solutions est de 0.35 points. Dès la première semaine de culture, la présence de SHB dans les solutions induit une augmentation de pH proportionnelle à la concentration de l'extrait humique, de 0.53 pour H25 à 0.88 pour H50. Au cours de la culture, le pH varie de façon similaire pour tous les traitements. L'écart tend à se réduire mais demeure significatif, de 0.35 pour H25 à 0.66 pour H50 (figure 50).

La diminution de la conductivité des solutions traduit une consommation minérale identique pour chaque traitement (figure 50). L'épuisement du milieu nutritif est de 65%. Il confirme que les solutions ne sont pas épuisées et que l'alimentation minérale n'est pas limitante au cours de l'expérimentation.

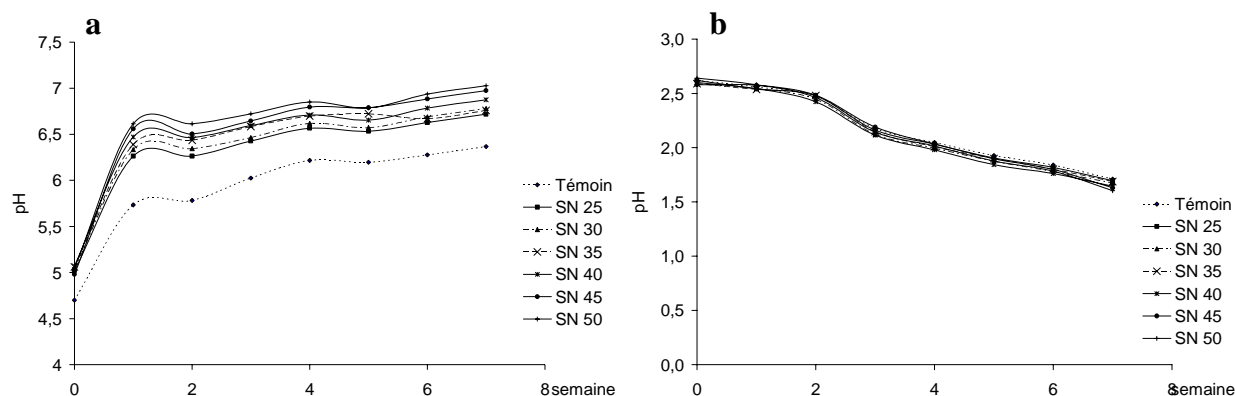


Figure 50 – Evolution du pH (a) et de la conductivité (b) des solutions nutritives

En présence de SHB, la consommation d'eau des plantes diminue sauf pour la dose de 50 mg.L⁻¹ (figure 51a). Seuls les plantes traitées par H25 et H50 ont une efficacité de l'eau supérieure au témoin (204 et 217 L.Kg⁻¹), ces plantes consomment donc plus d'eau pour fabriquer la même quantité de matière sèche. Dans les autres cas, l'efficacité de l'eau est inférieure donc meilleure mais pas de manière significative (figure 51b). Les plantes traitées H30, H35, H40 et H45 consomment moins d'eau pour fabriquer la même quantité de matière sèche que les plantes témoins.

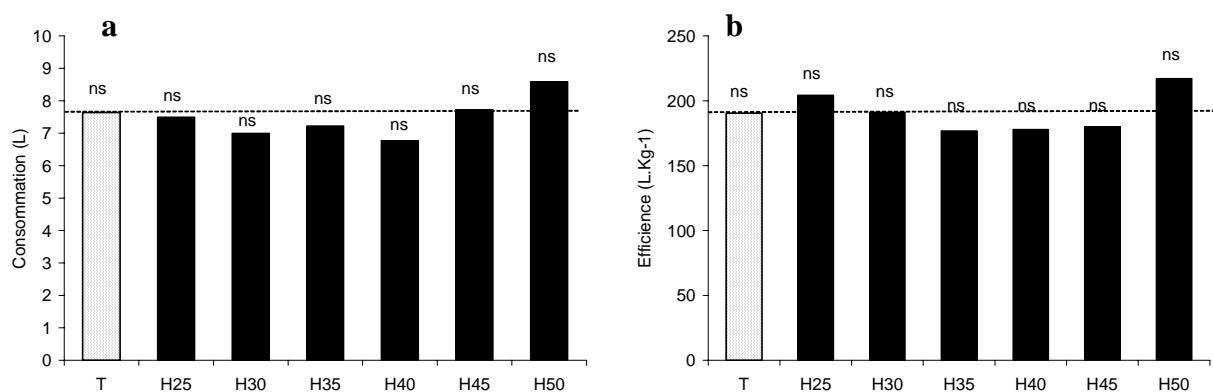


Figure 51 - Consommation d'eau (a) et efficacité de l'eau (b)

Le tableau 37 présente la concentration en éléments minéraux des solutions nutritives, ramenées à un même volume, en fin de culture. Une diminution de la concentration correspond à la disparition des éléments minéraux du milieu qui peut être corrélée avec une absorption par la plante. Pour tous les ions sauf le phosphate et le magnésium, les solutions nutritives des plantes traitées comportent globalement plus de macroéléments que les solutions nutritives des plantes témoins. Ceci peut traduire une consommation d'éléments minéraux inférieure pour les plantes traitées.

La consommation de potassium est significativement inférieure pour H35. De même, la consommation des sulfates diminue avec des concentrations en SHB croissantes pour H35, H45 et H50.

Dans le cas des ions phosphates la consommation des plantes traitées est plus importante que le témoin, hormis pour H35. Ces plantes semblent également consommer plus de nitrate pour les doses H45 et H50.

L'ensemble des résultats très hétérogènes et très peu significatifs donne peu d'informations sur l'effet des SHB sur la consommation de macro éléments.

	K	Ca	Mg	N	S	P
Témoin	387,9 a	33,8 ns	22,8 ns	452,8 ns	123,1 a	125,4 ns
H25	348,4 ab	42,7 ns	20,2 ns	453,7 ns	126,4 a	113,3 ns
H30	405,6 ab	50,3 ns	23,1ns	457,4 ns	129,6 a	122,3 ns
H35	457,8 b	42,5 ns	25,2 ns	454,2 ns	133,3 b	127,9 ns
H40	419,3 ab	41,4 ns	22,4 ns	452,2 ns	126,0 a	117,1 ns
H45	422,8 ab	38,0 ns	22,7 ns	427,4 ns	136,4 b	124,8 ns
H50	408,5 ab	45,3 ns	25,2 ns	413,0 ns	139,0 b	120,1 ns

Tableau 37 – Concentration finale en éléments minéraux des solutions nutritives (mg.L⁻¹)

Aucune différence de consommation d'oligo-éléments, n'est constatée pour les traitements humiques H25, H30 et H35. Cependant, au delà d'une concentration de 40 mg.L⁻¹ de SHB, les plantes traitées semblent consommer plus de cuivre et de zinc que les témoins (tableau 38). En effet, les concentrations respectives de ces éléments, restant dans les solutions nutritives en fin d'expérimentation sont significativement plus faibles. Cette observation reste subjective du fait qu'il ne s'agit pas d'un dosage des éléments minéraux présents dans les plantes. La formation de complexe au niveau de la solution nutritive est également possible pour expliquer cette diminution. En effet, le dosage des oligo-éléments est réalisé suite à la filtration des solutions nutritives, qui élimine les complexes [substances humiques-microéléments] formés et diminue la concentration en oligo-éléments de la solution.

	Cuivre	Manganèse	Zinc	Fer
Témoin	0,028 a	0,030	0,130 a	4,820 a
H25	0,028 a	0,030	0,113 ab	4,958 a
H30	0,032 a	0,030	0,138 a	4,010 a
H35	0,028 a	0,030	0,103 b	4,445 a
H40	0,022 b	0,030	0,103 b	6,410 b
H45	0,021 b	0,030	0,095 b	4,260 a
H50	0,022 b	0,030	0,095 b	5,208 a

Tableau 38 - Concentration finale en oligo-éléments des solutions nutritives (en ppm)

En résumé :

⇒ Les SHB testées influencent modérément la croissance des plantes. Les effets bénéfiques sont plus prononcés sur la matière fraîche pour les traitements H45 et H50 et se vérifient pour H45 sur le poids sec des plantes.

⇒ Ces effets correspondent à un plus grand nombre de feuille (H45) et à un développement racinaire plus ramifié (H50).

⇒ Les plantes H35 répondent aussi positivement à l'addition de SHB mais de manière moins importante (poids frais et poids sec). Elles produisent le plus grand nombre de fleurs.

⇒ Les SHB ne modifient pas l'absorption des macro éléments.

⇒ En conclusion de cette étude, l'ensemble des paramètres observés montre que la dose favorable de SHB se situe entre 35 et 50 mg.L⁻¹.

5.2.2 Comparaison des effets des substances humiques biomimétiques et des fractions humiques et fulviques

5.2.2.1 Rappel des conditions expérimentales

Les résultats précédents (§5.2.1) montrent que la dose favorable est comprise entre 35 et 50 mg.L⁻¹. En accord avec les travaux antérieurs réalisés au laboratoire sur le pélagonium (Galy, 2002), la dose de 50 mg.L⁻¹ a été choisie pour confirmer les effets des SHB.

L'objectif de l'expérimentation est de confirmer l'efficacité de la dose 50 mg précédemment définie et de la comparer aux effets des fractions humiques et fulviques sur une culture hydroponique de pélagonium.

La bibliographie rappelle que les travaux comparant les effets des fractions humiques et fulviques sont peu nombreux en raison de la difficulté à obtenir ces fractions en large proportion à partir de substances humiques naturelles. Le procédé de fabrication des SHB permet de produire des extraits humiques liquides en grande quantité. Il facilite donc la séparation et l'obtention de fractions humiques et fulviques importantes et suffisantes pour réaliser plusieurs applications.

Les concentrations en carbone des traitements humiques et fulviques appliquées sont calculées à partir de la dose efficace de 50 mg.L⁻¹. Les SHB contenant 60% d'acides humiques et 40% d'acides fulviques, les concentrations des traitements AH et AF correspondent respectivement à 60% de 50 mg soit 30 mg.L⁻¹ et 40% de 50 mg soit 20 mg.L⁻¹. L'essai est mené pendant 9 semaines sur 28 plantes.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	7
H50	Solution nutritive + SHB	50	7
AH	Solution nutritive + Acide humique	30	7
AF	Solution nutritive + Acide fulvique	20	7
Total	4 traitements	-	28 plantes

Rappel du plan expérimental n°2

5.2.2.2 Croissance et développement des pélagoniums

- Etude de la croissance

L'observation de l'augmentation du poids frais des plantes au cours de la culture indique une croissance similaire pour tous les traitements durant les 4 premières semaines. A partir de la semaine 5, les plantes H50 présentent une croissance légèrement supérieure aux plantes témoin, confirmant les résultats obtenus dans la première expérience. Seul le traitement AF20 reste toujours inférieur au témoin. Le traitement AH30 suit la même évolution que le témoin. Ces tendances s'observent jusqu'à la récolte des plantes, le traitement H50 possède alors le poids frais le plus élevé (figure 52).

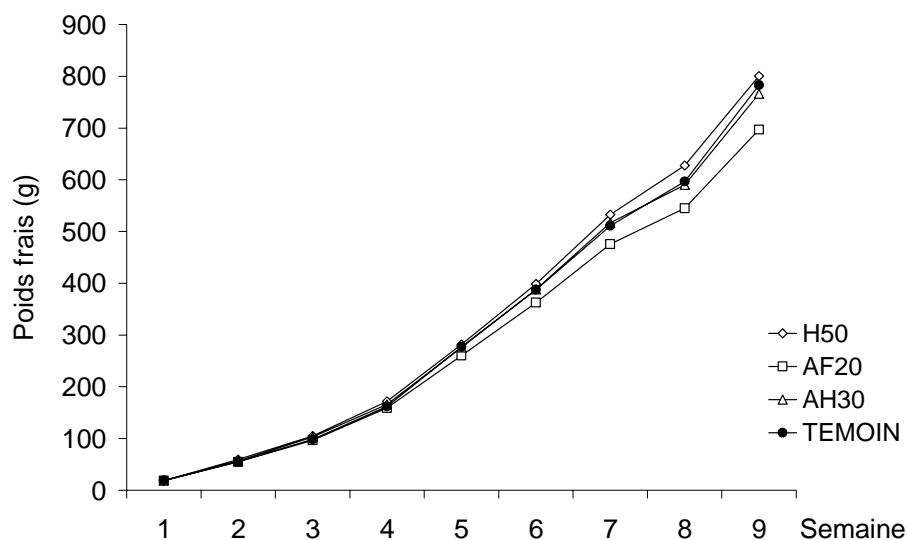


Figure 52 - Evolution du poids frais des plantes en cours de culture

L'effet des SHB sur le poids frais des pélagoniums est positif uniquement pour le traitement H50 qui est le seul à engendrer une augmentation de poids frais par rapport au témoin (figure 53). Elle correspond à une production de matière fraîche de 2.1% supérieure au témoin, confirmant les résultats de la première expérimentation.

L'augmentation de poids frais observée pour H50 se retrouve au niveau de tous les organes des plantes, hormis les racines (figure 53a).

L'étude du poids frais des organes montre que seules les fleurs présentent un accroissement de leur masse pour tous les traitements.

Les racines semblent sensibles à la seule présence des fractions AH30.

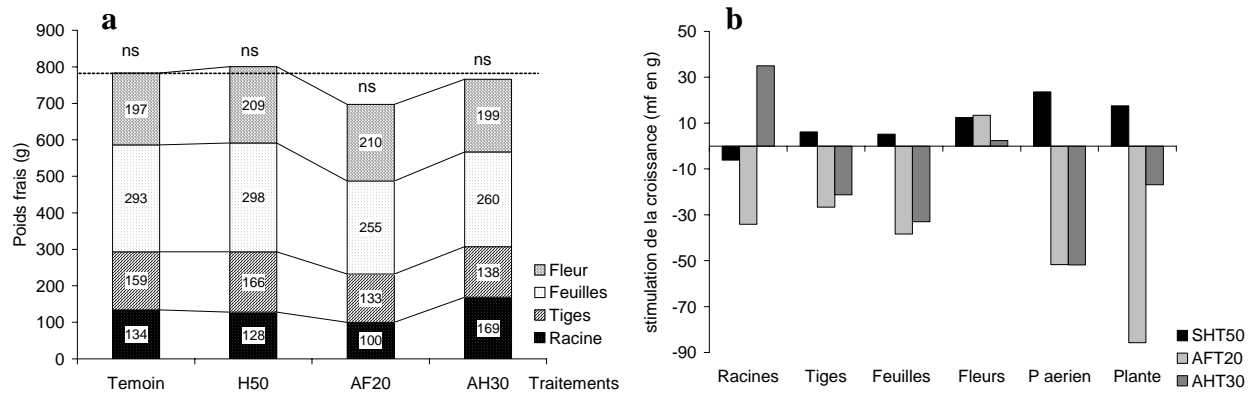


Figure 53 - Répartition du poids frais en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin)

Ces tendances observées sur la matière fraîche des végétaux se confirment sur la matière sèche des plantes. Seul le traitement H50 possède un poids sec supérieur au témoin (figure 54).

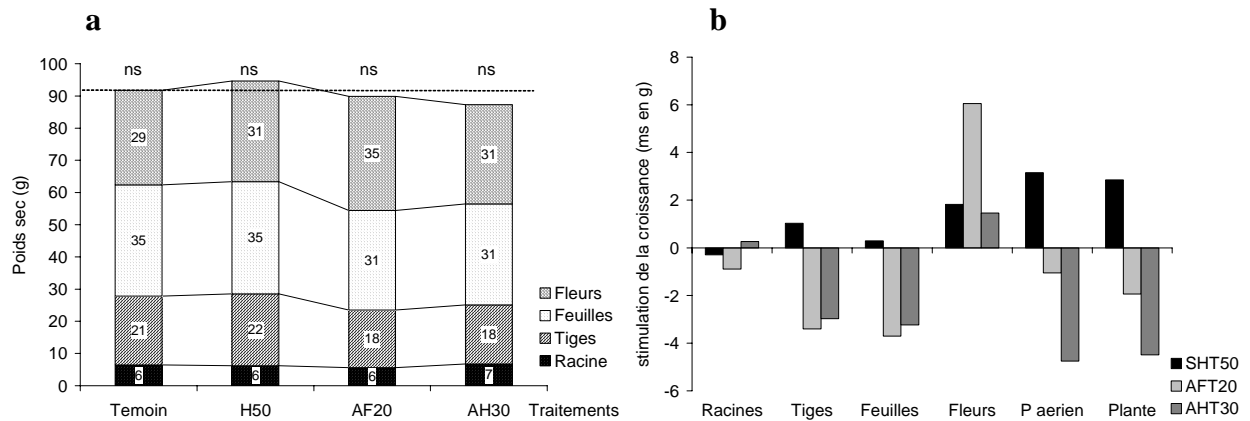


Figure 54 - Répartition du poids sec en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin)

L'accroissement du poids sec des plantes H50 correspond à une faible augmentation de la masse sèche de 3%. Cet accroissement est vérifié sur tous les organes sauf les racines.

L'étude des organes indique que seule la masse sèche des fleurs des traitements humiques est systématiquement supérieure à celle du témoin. Ceci peut indiquer une stimulation de la floraison par les SHB.

Enfin, à nouveau, seul le traitement AH30 induit une augmentation de la matière sèche des racines.

L'observation de la répartition de l'eau et de la matière sèche indique que les plantes traitées H50 et AH30 présentent une teneur en eau plus importante que les plantes témoins, confirmant les résultats précédemment observés (tableau 39). En revanche, les plantes AF20 ont une teneur en eau inférieure au témoin.

	Eau (%)			
	Témoin	H50	AF20	AH30
Racine	95.1	95.2	93.6	95.4
Tiges	86.6	86.5	86.4	86.5
Feuilles	88.1	88.3	88.1	88.0
Fleurs	85.0	85.1	83.1	84.5
P aérienne	85.5	86.8	85.9	86.4
Plante entière	88.1	88.2	87.1	88.5

Tableau 39 - Teneur en eau des plantes et des organes (%)

Pour le traitement H50, la tendance s'observe sur tous les organes à l'exception des tiges (tableau 38) et traduit en partie l'accroissement de matière fraîche. De même, le traitement AF20 possède une teneur en eau inférieure sur chaque organe qui explique la différence de biomasse fraîche observée (figure 55). Le traitement AH30 présente des teneurs en eau inférieures à celle des témoins pour chaque organe sauf les racines.

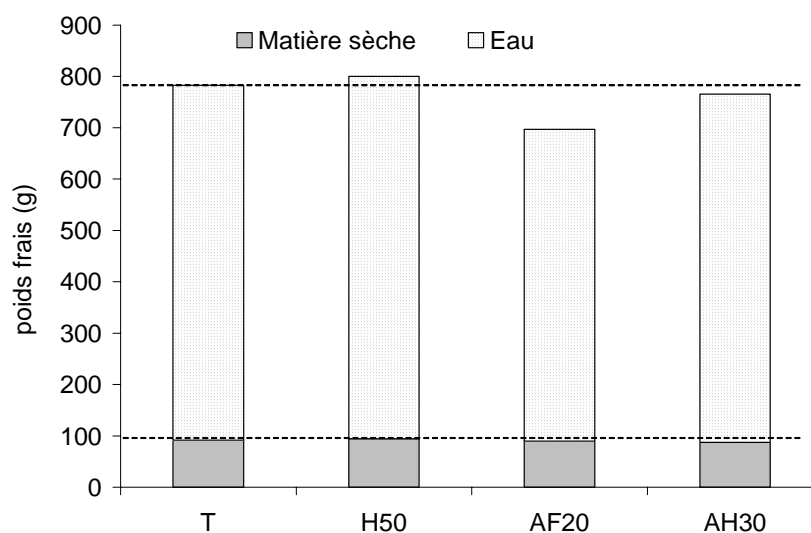


Figure 55 - Répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes

- Etude du développement

Le nombre de feuilles produites par les plantes traitées est systématiquement inférieur aux valeurs des plantes témoins. Le traitement H50 se rapproche le plus de la production du témoin (-1%) (tableau 40). Le traitement AF20 produit 14% de feuille en moins. L'ensemble des feuilles produites ne présente aucune différence de taille ou de poids.

	Nb feuilles initiales	Nb feuilles finales	Feuilles produites	Stimulation / témoin Nb	%
Témoin	27,4	181,9	154,4		
H50	26,3	179,0	152,7	-1.7	-1%
AF20	26,0	158,3	132,3	-22.1	-14%
AH30	21,7	162,6	140,9	-13.5	-8.7%

Tableau 40 - Nombre moyen de feuilles produites par plante

Le nombre de fleurs produites est proche pour tous les traitements mais plus élevé pour le traitement AF20 (+15 %), indiquant une influence des SHB sur la floraison (tableau 41). La floraison des plantes H50 est légèrement stimulée (+2.5%) alors que celle des plantes AH30 est inhibée (-2.5%).

	Fleurs	Stimulation / témoin Nb	%
Témoin	11.3		
H50	11.6	+0.3	+2.6%
AF20	13	+1.7	+15%
AH30	11	-.3	-2.5%

Tableau 41 - Nombre moyen de fleurs produites par plante

La figure 48 représente la cinétique d'apparition des fleurs. Elle traduit le pourcentage de plantes fleuries après 2, 3 et 4 semaines de culture.

L'augmentation du nombre de fleurs est observée très tôt au cours de la culture pour le traitement AF20. Ainsi dès la 2^{ème} semaine de culture, 57% des plantes de ce traitement ont fleuri, seulement 14% pour les plantes témoin et aucune pour le traitement AH 30. Le traitement H50 induit également une floraison plus rapide que le témoin, 28 % des plantes produisent des fleurs dès la 2^{ème} semaine et 57% la 3^{ème}. Les acides fulviques permettent à la totalité des plantes de fleurir à partir de la 4^{ème} semaine, quand les autres traitements attendent la 5^{ème} semaine pour avoir l'ensemble des plantes fleuries (figure 56).

Du fait de cette précocité de floraison, le traitement fulvique permet de produire chaque semaine le plus grand nombre de fleurs (figure 56).

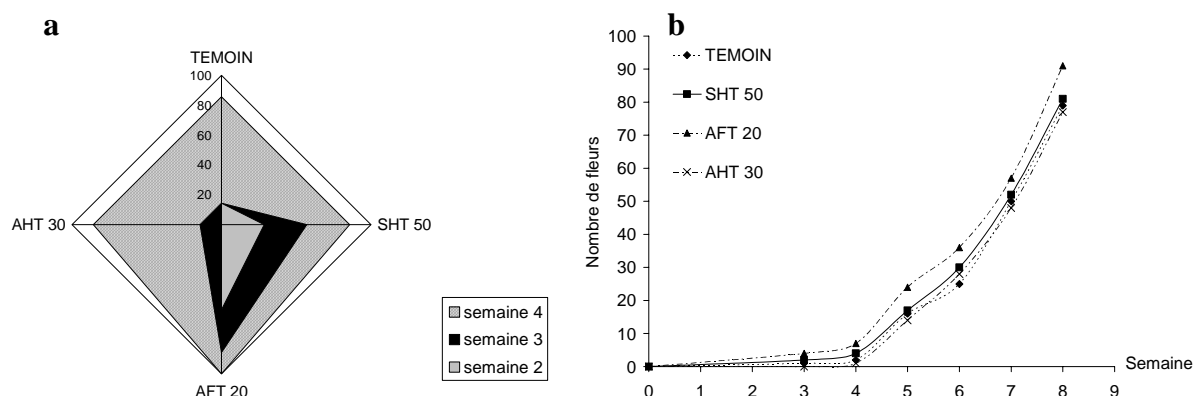


Figure 56 - Pourcentage de plantes fleuries (a) et cinétique d'apparition du nombre de fleurs (b)

La longueur maximale moyenne des racines des plantes traitées est systématiquement inférieure (de 9 à 13% en moins) à celle des plantes témoins (tableau 42). Ceci confirme les résultats observés sur l'expérimentation précédente.

	Racine (cm)	Stimulation / témoin	
		Longueur	%
Témoin	54		
H50	46.7	-7.3	-13,5%
AF20	49.1	-4.9	-9,1%
AH30	48.9	-5.1	-9,4%

Tableau 42 - Longueur des racines

Comme précédemment, les plantes H50 produisent un système racinaire plus petit avec un plus grand nombre de ramification qui semble augmenter leur surface de contact total (figure 57).



Figure 57 - Racines de plantes témoins et traitées en fin de culture

La longueur maximale des racines des plantes H50 diminue lorsque leur poids sec augmente (figure 58). La longueur des racines des plantes témoins augmente avec leur poids sec. Ces plantes produisent des racines longues et peu ramifiées.

Les traitements AF20 et AH30 provoquent un développement du système racinaire similaire à celui du témoin. La longueur et le poids sec des racines augmentent proportionnellement

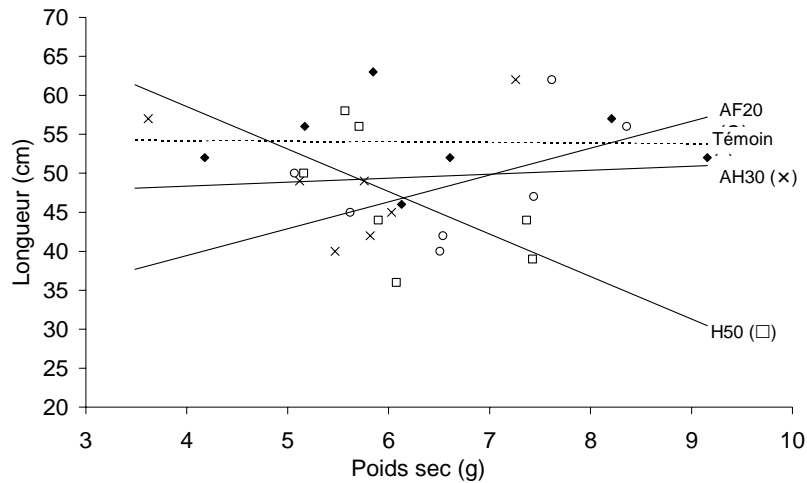


Figure 58 - Effet des SHB sur la ramification du système racinaire

Le calcul du ratio du poids sec de la partie aérienne (PA) sur le poids sec de la partie racinaire (PR) indique que la partie aérienne des plantes H50 et AF20 est plus développée que celle du témoin (figure 59). Ceci correspond à la conclusion selon laquelle ces deux traitements produisent plus de fleurs.

La diminution du ratio pour les plantes AH30, traduit le développement supérieur de la partie racinaire de ces plantes au détriment de la partie aérienne et rappelle que ce traitement produit le moins de fleurs.

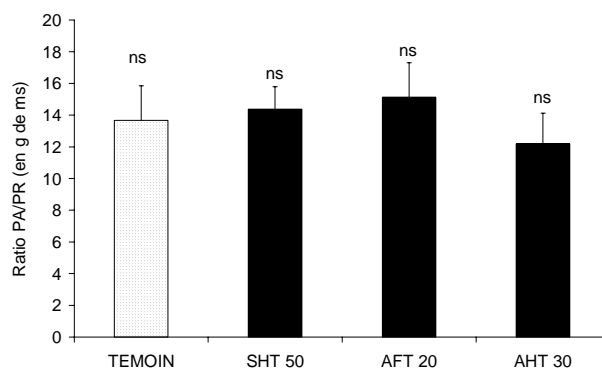


Figure 59 - Croissance relative des parties aériennes et racinaires

Enfin l'observation du ratio du poids sec de la partie végétative (PV) sur le poids sec de la partie reproductrice (PF = fleurs) montre une diminution de la partie végétative indiquant dans le cas des plantes AF20 une tendance à favoriser la production de fleurs au détriment de la matière fraîche (figure 60).

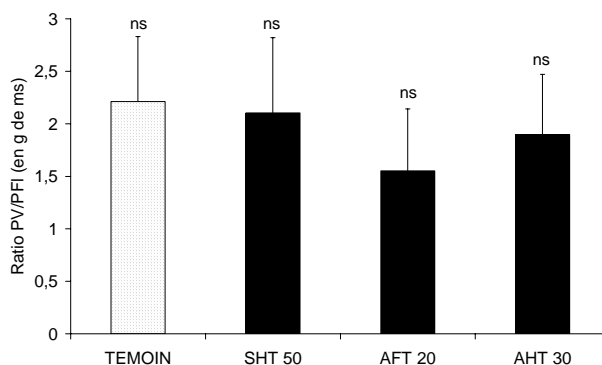


Figure 60 - Croissance relative des parties végétatives et reproductrices

5.2.2.3 Evolution des solutions nutritives

L'observation du pH et de la conductivité des solutions indique des variations similaires entre les traitements humiques et le témoin. Le pH augmente régulièrement pour atteindre des valeurs de 7,6 (figure 61a). La conductivité des solutions diminue de manière parallèle, traduisant une consommation en éléments minéraux similaire (Figure 61b). L'épuisement du milieu nutritif de 45% indique que l'alimentation minérale n'est pas limitante au cours de l'expérimentation.

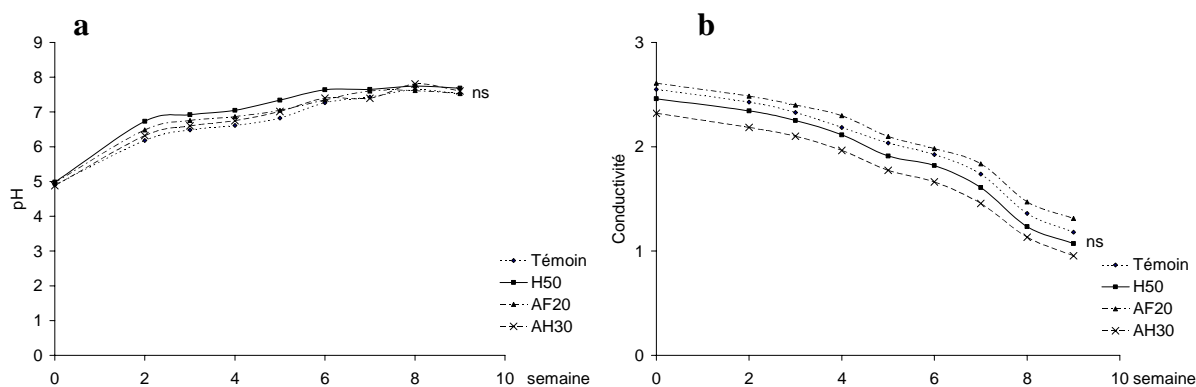


Figure 61 – Evolution du pH (a) et de la conductivité (b) des solutions nutritive

L'ensemble des traitements présente une consommation d'eau identique lors des 6 premières semaines. A partir de la 7^{ième} semaine, la consommation des traitements H50 et AH30 est légèrement supérieure à celle du témoin (figure 62a).

Le coefficient de transpiration des plantes H50 (+3%) et AH30 (+10%) est plus élevé que celui des plantes témoins. Ces plantes utilisent plus d'eau que les plantes témoins pour synthétiser une unité de matière sèche (figure 62). Le coefficient de transpiration des plantes AF20 est inférieur de 3 % à celui des témoins.

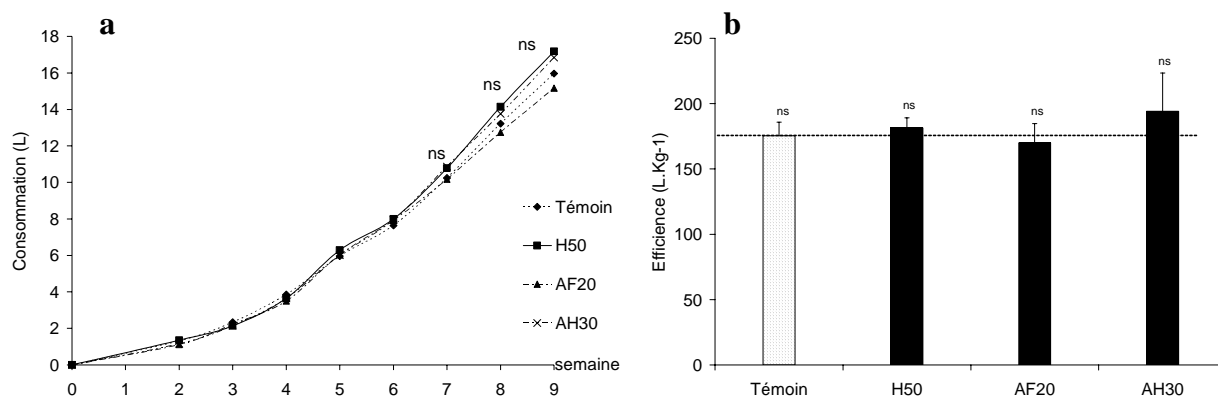


Figure 62 - Consommation d'eau (a) et efficacité de l'eau (b)

5.2.2.4 Teneur en éléments minéraux des plantes

- Teneur en macroéléments

Les SHB induisent une augmentation de la teneur totale en éléments minéraux des racines des plantes H50. Cette augmentation est significative pour le calcium, le magnésium et le phosphore (tableau 43).

La teneur des tiges des plantes H50 est aussi systématiquement supérieure à la teneur des plantes témoins et de manière significative pour le potassium, le magnésium, le soufre et le phosphore. Cette augmentation se vérifie sur les fleurs pour le potassium et le phosphore.

Enfin la teneur en éléments minéraux des feuilles des plantes traitées est toujours inférieure aux valeurs témoins, Cette diminution est significative pour le calcium, le magnésium, le soufre et le phosphore des feuilles H50 (tableau 43).

5 - Effets des substances humiques biomimétiques sur les plantes

		K	Ca	Mg	N	S	P
Racine	Témoin	5.47 a	0.95 a	0.272 a	2,77 ns	0.39 a	3.02 a
	H50	5.79 a	1.51 b	0.379 b	2,92 ns	0.47 ab	3.74 b
	AF20	5.09 ab	1.35 b	0.345 bc	2,84 ns	0.52 b	3.20 a
	AH30	4.94 b	1.12 ab	0.318 c	2,66 ns	0.44 ab	2.59 a
Tige	Témoin	4.84 a	1.31 ns	0.236 a	1,33 ns	0.16 a	1.53 a
	H50	5.60 b	1.37 ns	0.246 b	1,32 ns	0.18 b	1.85 b
	AF20	5.03 ab	1.29 ns	0.214 c	1,30 ns	0.17 ab	1.77 ab
	AH30	4.93 a	1.39 ns	0.238 ab	1,33 ns	0.16 ab	1.61a
Feuille	Témoin	5.11 ns	1.85 a	0.368 a	3,42 ns	0.38 a	1.60 a
	H50	5.04 ns	1.62 b	0.345 b	3,39 ns	0.32 b	1.46 b
	AF20	5.05 ns	1.77 ab	0.338 ab	3,35 ns	0.32 b	1.27 ab
	AH30	5.02 ns	1.85 ab	0.363 ab	3,39 ns	0.35 a	1.44 ab
Fleur	Témoin	3.49 a	0.41 ns	0.132 ns	2,25 ns	0.19 ns	1.64 a
	H50	3.85 b	0.39 ns	0.135 ns	2,24 ns	0.16 ns	1.86 b
	AF20	3.68 ab	0.42 ns	0.139 ns	2,21 ns	0.19 ns	1.62 ab
	AH30	3.68 ab	0.38 ns	0.132 ns	2,27 ns	0.17 ns	1.56 a

Tableau 43 - Teneur en macroéléments des organes (%)

Les lettres représentent une différence significative à un seuil de 5%

La consommation totale ainsi que les teneurs moyennes des plantes ne révèlent aucune différence significative (tableau 44).

		K	Ca	Mg	N	S	P
Consommation Totale	Témoin	4,18 ns	1,10 ns	0,23 ns	2,31 ns	2,46 ns	1,56 ns
	SHT 50	4,57 ns	1,09 ns	0,24 ns	2,36 ns	2,31 ns	1,73 ns
	AFT 20	4,05 ns	1,00 ns	0,21 ns	2,21 ns	2,26 ns	1,46 ns
	AHT 30	3,95 ns	1,03 ns	0,22 ns	2,19 ns	2,21 ns	1,40 ns
Teneur moyenne	Témoin	4,55 ns	1,20 ns	0,25 ns	2,51 ns	0,27 ns	1,70 ns
	H50	4,83 ns	1,15 ns	0,25 ns	2,49 ns	0,24 ns	1,83 ns
	AF20	4,51 ns	1,12 ns	0,24 ns	2,46 ns	0,25 ns	1,63 ns
	AH30	4,52 ns	1,18 ns	0,25 ns	2,51 ns	0,25 ns	1,61 ns

Tableau 44 - Consommation totale (g) et teneurs moyennes (%)

- Teneur en micro élément

Les SHB induisent une augmentation significative de la teneur en zinc des racines des plantes traitées, et des tiges des plantes H50 (tableau 45). Les teneurs en fer et en cuivre des plantes traitées sont également supérieures respectivement au niveau des fleurs et des feuilles. Enfin les

SHB diminuent les teneurs en manganèse des plantes de manière significative pour tous les organes.

		Cuivre	Manganèse	Zinc	Fer
Racine	Témoin	0,79 ns	28,55 a	2,93 a	57,52 ns
	H50	0,79 ns	22,28 ab	4,75 b	73,78 ns
	AF20	0,77 ns	18,37 b	4,55 b	71,45 ns
	AH30	0,72 ns	19,93 ab	3,57 b	57,77 ns
Tige	Témoin	0,20 ns	3,53 a	0,88 a	4,42 ns
	H50	0,24 ns	3,07 b	1,55 b	2,87 ns
	AF20	0,27 ns	2,82 b	1,07 ab	4,20 ns
	AH30	0,23 ns	4,02 a	1,17 ab	5,88 ns
Feuille	Témoin	0,36 a	13,65 a	2,63 a	12,35 ns
	H50	0,39 b	9,38 b	2,72 a	10,45 ns
	AF20	0,40 b	9,40 b	2,80 a	14,32 ns
	AH30	0,31 a	14,12 a	2,88 b	14,90 ns
Fleur	Témoin	0,26 a	1,93 a	1,48 ns	3,08 a
	H50	0,22 a	1,25 b	1,42 ns	3,92 b
	AF20	0,24 a	1,52 b	1,40 ns	3,97 b
	AH30	0,35 b	1,23 b	1,63 ns	3,62 b

Tableau 45 -Teneur en micro-éléments des organes (ppm)

Les SHB induisent une augmentation de la consommation en zinc des plantes H50 et de la teneur en zinc des plantes traitées. Cependant la teneur maximale en zinc des organes se trouvant au niveau des racines, l'adsorption de complexes SHB-Zinc à la surface racinaire peut expliquer l'augmentation de la teneur des plantes entières.

Les extraits humiques diminuent la consommation et la teneur en manganèse des plantes traitées (tableau 46)

		Cuivre	Manganèse	Zinc	Fer
Consommation totale	Témoin	0,295 ns	7,891 a	1,725 a	9,842 ns
	H50	0,308 ns	5,724 b	2,030 b	10,063 ns
	AF20	0,299 ns	4,970 b	1,806 a	10,568 ns
	AH30	0,295 ns	6,886 b	1,862 a	10,758 ns
Teneur moyenne	Témoin	0,322 ns	8,597 a	1,880 a	10,723 ns
	H50	0,325 ns	6,049 b	2,145 b	10,633 ns
	AF20	0,332 ns	5,532 b	2,010 b	11,763 ns
	AH30	0,338 ns	7,888 b	2,133 b	12,323 ns

Tableau 46 - Consommation totale (mg) et teneurs moyennes (%)

En résumé

- ⇒ Les AF et AH dans leur mode d'application ne semblent pas suffisants pour induire des effets sur la biomasse totale des plantes. Cependant, un effet commun aux trois traitements apparaît sur le gain de matière fraîche et sèche des fleurs.
- ⇒ Les plantes traitées limitent le développement de leur appareil végétatif au profit de leur appareil reproducteur. Les SHB ont donc un effet sur les mécanismes de développement des plantes entières.
- ⇒ Les fractions humiques et fulviques ont un impact plus ciblé sur certains paramètres du développement.
- ⇒ Le nombre de fleurs est plus largement influencé par la fraction fulvique. De plus, ce traitement semble induire une floraison plus précoce.
- ⇒ Les SHB induisent une augmentation de la teneur en éléments minéraux des racines, des tiges et des fleurs des plantes traitées, le plus souvent significative pour les plantes H50.
- ⇒ Les SHB diminuent leur teneur en manganèse de tous les traitements humiques.

5.3 EFFETS DES SUBSTANCES HUMIQUES BIOMIMÉTIQUES SUR LA CROISSANCE ET LE DÉVELOPPEMENT DU MAÏS

La même approche expérimentale a été utilisée pour déterminer l'effet des SHB sur le maïs. Dans un premier temps, la recherche de la dose optimale a été réalisée (§5.3.1) et l'efficacité de cette concentration a été confirmée dans une seconde expérience (§3.5.2). Les effets des fractions humiques et fulviques ont ensuite été observés et comparés aux effets des SHB (§3.5.3). Enfin, l'observation de l'influence des SHB sur la germination et la rhizogenèse et un essai d'application de SHB en pots a permis de compléter l'étude.

5.3.1 Recherche de la dose efficace

5.3.1.1 Rappel des conditions expérimentales

L'objectif de cet essai est de définir la concentration de SHB favorable pour la croissance du maïs. Des doses croissantes de 50 à 200 mg.L⁻¹ de SHB sont testées sur une culture hydroponique de maïs. Cette expérimentation comporte deux témoins T et T200 pour tenir compte des différences de salinité introduites par l'ajout des SHB au delà d'une concentration de 150 mg.L⁻¹. L'essai est mené pendant 6 semaines sur 28 plantes.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	4
H50	Solution nutritive + SHB	50	4
H100	Solution nutritive + SHB	100	4
H150	Solution nutritive + SHB	150	4
T200	Solution nutritive standard	0	4
H200	Solution nutritive + SHB	200	4
Total	6 traitements		24 plantes

Rappel du plan expérimental n°3

5.3.1.2 Croissance et développement du maïs

- Etude de la croissance

Le suivi de l'augmentation du poids frais des plantes au cours de la culture n'a pu être observée en raison de la difficulté à manipuler les plantes et du stress provoqué par ces manipulations.

L'effet des SHB sur le poids frais du maïs est positif pour tous les traitements et engendre une augmentation de poids frais de 5 à 25% par rapport au témoin (figure 63). Les plantes traitées H50 possèdent l'accroissement de poids frais total le plus important. Il correspond à une production de matière fraîche de 25% supérieure au témoin.

Globalement, les plantes traitées produisent une matière fraîche plus importante, principalement au niveau des racines et des tiges (figure 63). L'augmentation de poids frais observée pour H50 se retrouve au niveau de tous les organes des plantes, à l'exception des épis.

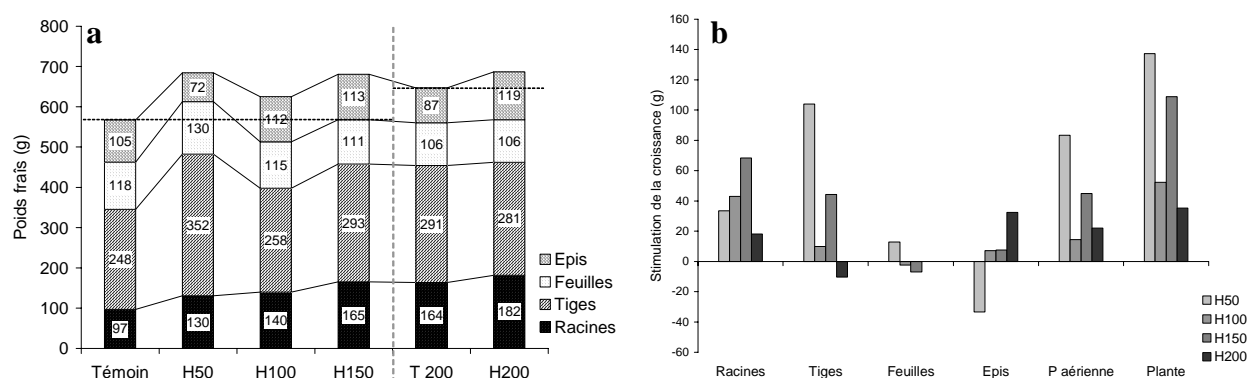


Figure 63 - Répartition du poids frais en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin)

Les tendances observées sur la matière fraîche des végétaux se confirment sur la matière sèche des plantes, uniquement pour les traitements H50 et H150, dont le poids sec total est supérieur à celui du témoin (figure 64). Le traitement H50 induit un accroissement significatif du poids sec total des plantes, représentant une augmentation de la masse sèche de 25% supérieure à celle du témoin. L'accroissement du poids sec des plantes H150 est plus faible et correspond à une faible augmentation de la masse sèche de 2%.

Les plantes du traitement H50 réalisent un gain de matière sèche sur tous les organes principalement sur les tiges et les feuilles. Le poids sec des fleurs est identique à celui du témoin. Les organes des plantes des autres traitements présentent une augmentation de poids sec essentiellement sur les racines, de l'ordre de 15 % par rapport aux plantes témoins (figure 64).

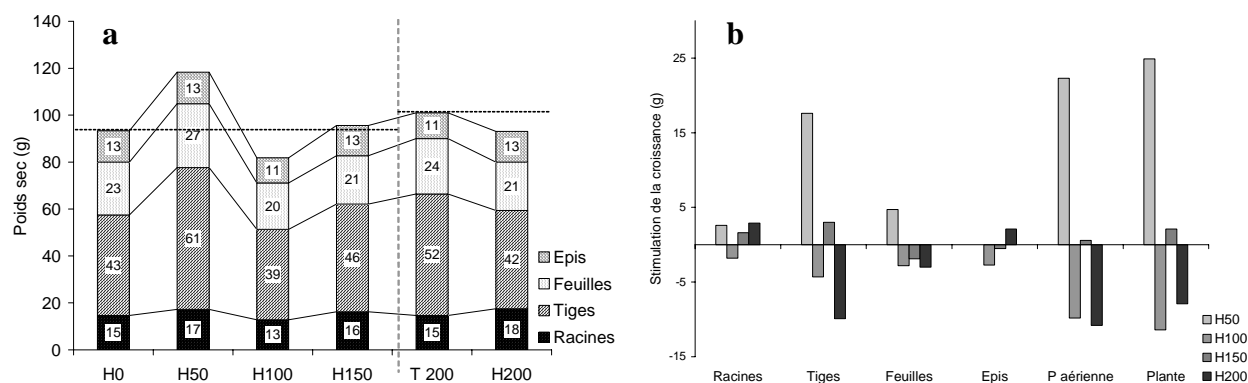


Figure 64 - Répartition du poids sec en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin)

Comme précédemment (§5.2.1.2), l'observation de la répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes permet de mieux comprendre les écarts observés entre les masses de matière fraîche et les masses de matière sèche. Il existe une variabilité de composition entre les plantes témoins et les plantes traitées (tableau 47).

Les plantes traitées avec les substances humiques ont une teneur totale en eau supérieure à celles des témoins. La teneur en eau semble augmenter avec la concentration de SHB des traitements. Cette tendance s'observe pour chaque traitement sur tous les organes sauf pour les plantes H50 où la teneur en eau est inférieure à celle du témoin pour les tiges, les feuilles et les épis. Ceci renforce les conclusions sur les effets des SHB observés sur la production de matière sèche.

	Teneur en Eau (%)				
	Témoin	H50	H100	H150	H200
Racine	90,7	91,1	93,7	92,7	93,0
Tiges	83,8	81,9	85,5	83,7	85,8
Feuilles	80,9	79,0	82,9	81,2	80,5
Epis	87,2	86,3	90,3	88,4	88,9
P aérienne	83,2	82,5	85,8	84,6	85,0
Plante entière	81,2	82,5	86,2	85,9	86,3

Tableau 47 - Répartition de la matière sèche et de l'eau (%)

La répartition de la matière sèche et de l'eau des plantes H50 indique que l'accroissement de matière fraîche est dû à une augmentation simultanée de la matière sèche et de la quantité d'eau (figure 65).

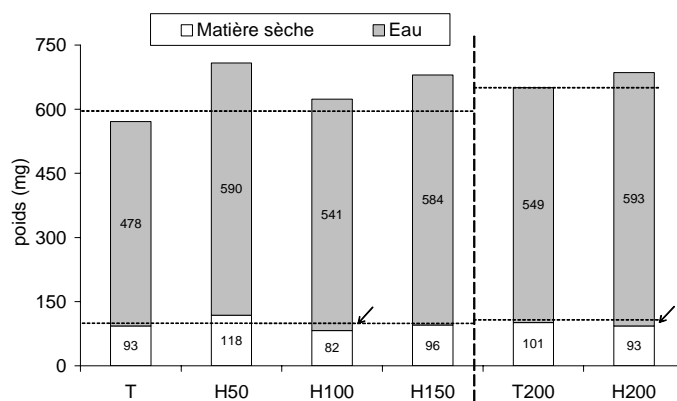


Figure 65 - Répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes

- Etude du développement

Selon les variétés, le maïs produit en moyenne 13 à 15 feuilles engainantes dont le pétiole entoure entièrement la tige. A la récolte, tous les traitements présentent un nombre de feuilles identique (13) traduisant la fin du stade végétatif de toutes les plantes (tableau 48).

	Témoin	H50	H100	H150	T200	H200
Nombre de feuilles	13	13	13	13	13	13
Nombre d'épis moyens (Fleurs ♀)	1	1.25	1.5	1.5	1.25	1.75
Nombre de panicules (Fleurs ♂)	1	1	1	1	1	1

Tableau 48 - Nombre de feuilles et de fleurs

Le maïs est dioïque et produit deux types de fleurs : mâle et femelle. La tige unique et de gros diamètre porte les feuilles, à l'aisselle desquelles se situent les fleurs femelles qui donneront, après fécondation plusieurs épis. Les fleurs mâles sont groupées dans une panicule terminale située à l'extrémité supérieure des plantes (figure 66). Avant la fin du stade végétatif, les épis et les panicules dont la croissance est amorcée au stade 8 feuilles sont visibles uniquement à la dissection du plant. Suite au stade végétatif, le stade reproductif est amorcé. La sortie de la panicule (floraison mâle) précède de quelques jours l'apparition des soies (floraison femelle), pour permettre la dissémination du pollen.

A la récolte, tous les traitements présentent des panicules épanouies, indiquant que toutes les plantes ont débuté leur stade reproductif. Cependant, le nombre d'épis formés est toujours supérieur chez les plantes traitées et augmente avec la dose de SHB utilisée (tableau 45). Les SHB induisent la formation de plusieurs épis par plante (en moyenne 1.25 à 1.75) alors que les plantes témoin ne produisent qu'un seul épi. Cette observation montre clairement une stimulation de la floraison des les plantes traitées.

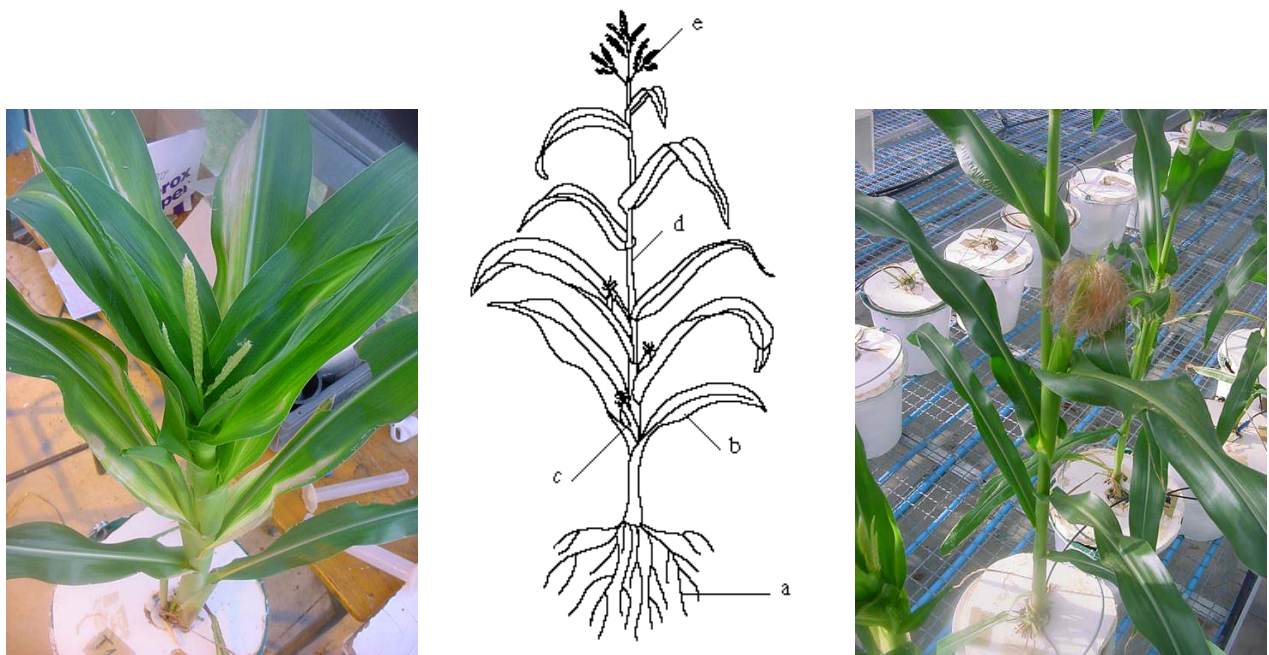


Figure 66 - Anatomie du maïs

Le début d'élongation rapide de la tige a lieu à partir du stade 11 feuilles. En fin d'expérimentation, la hauteur des plantes traitées augmente régulièrement jusqu'à la dose H150, mais reste inférieure ou égale à la hauteur du témoin. Seul le traitement H200 produit des plantes de plus grande taille que les témoins (figure 67). Ce résultat confirme que les plantes ont toutes terminé leur stade végétatif.

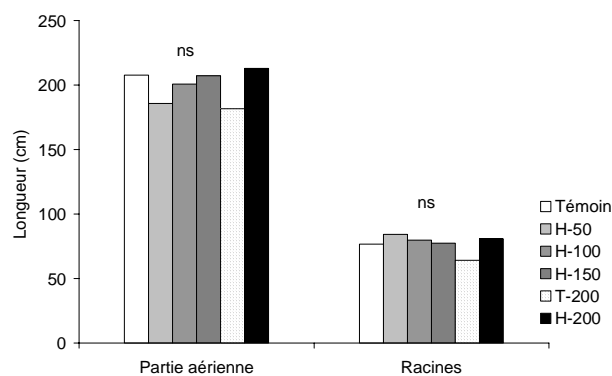


Figure 67 - Longueur des racines et de la partie aérienne

L'élongation racinaire est favorisée par la présence de SHB quelle que soit la dose, elle est maximale pour les concentrations H50 (+10% par rapport au témoin) et H200 (+25%) (figure 67).

L'expression de la longueur des racines en fonction de leur poids sec traduit le développement d'un système racinaire très ramifié (figure 68). En effet, l'augmentation du poids sec des racines

correspond à une diminution de leur longueur maximale. Cette tendance est maximale pour les traitements H50 et H150. Les SHB induisent la formation de racines moins longues mais plus nombreuses.

Les traitements T et T200 ont un développement similaire pour lequel l'élongation racinaire est proportionnelle à l'accroissement du poids sec.

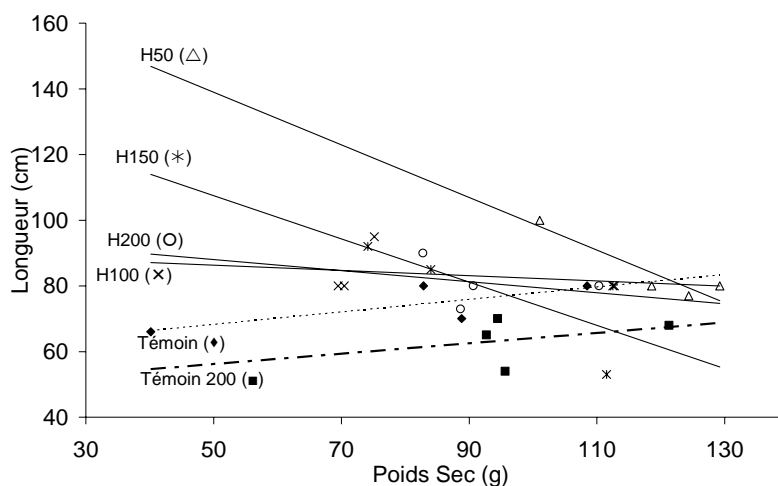


Figure 68 - Effet des SHB sur la ramification du système racinaire

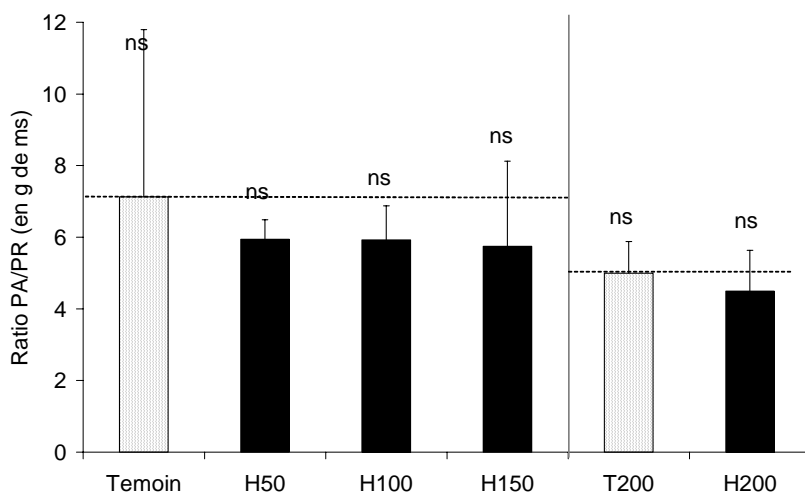


Figure 69 - Croissance relative des parties aériennes et racinaires

Le calcul du ratio du poids sec de la partie aérienne sur le poids sec de la partie racinaire indique que la partie aérienne des plantes H50, H150 et H200 est moins développée que celle du témoin (figure 69).

5.3.1.3 Evolution des solutions nutritives

Le pH des solutions croit rapidement pour atteindre une valeur proche de 8 au bout de la troisième semaine. Suite au réajustement du pH (à des valeurs comprises entre 4 et 5 en fonction du pouvoir tampons des solutions), l'augmentation est similaire aux variations enregistrées en début de culture (figure 70).

La conductivité des solutions T200, H150 et H200 diminue de manière proportionnelle aux concentrations ioniques initiales des solutions, traduisant une consommation en éléments minéraux similaire. La conductivité des autres solutions, identique en début de culture, enregistre des variations plus importantes indiquant une consommation d'éléments minéraux supérieure pour les plantes H50 et H100 (figure 70).

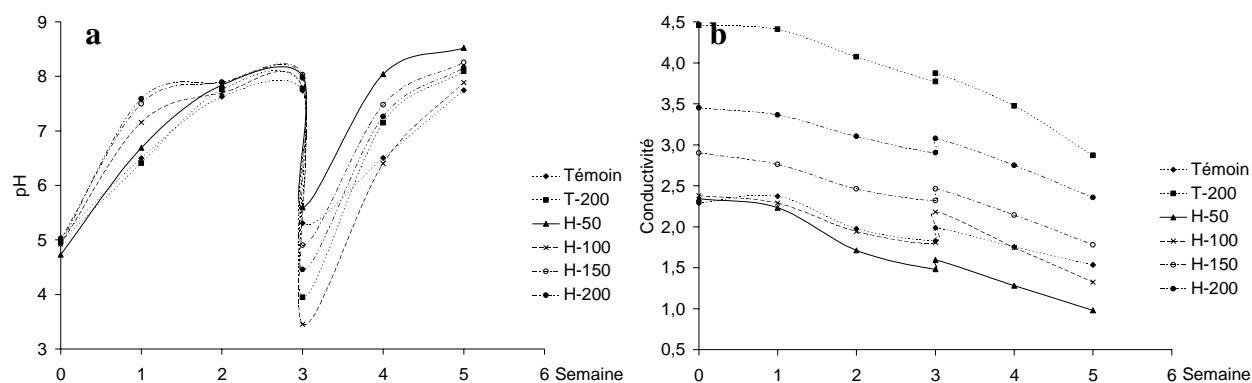


Figure 70 –Evolution du pH (a) et de la conductivité (b) des solutions nutritives

La consommation d'eau des plantes traitées augmente avec la concentration de SHB jusqu'à 150 mg.L⁻¹ de carbone. Cependant, la consommation du traitement H50 est moins importante que celle des témoins tandis que celle de H100 et H150 est supérieure ou égale à celle des témoins. A la concentration de 200 mg.L⁻¹ de carbone, les plantes traitées consomment moins d'eau que les plantes témoins.

Les coefficients de transpiration des plantes traitées aux SHB ne sont pas significativement différents de ceux des plantes témoins (figure 71)

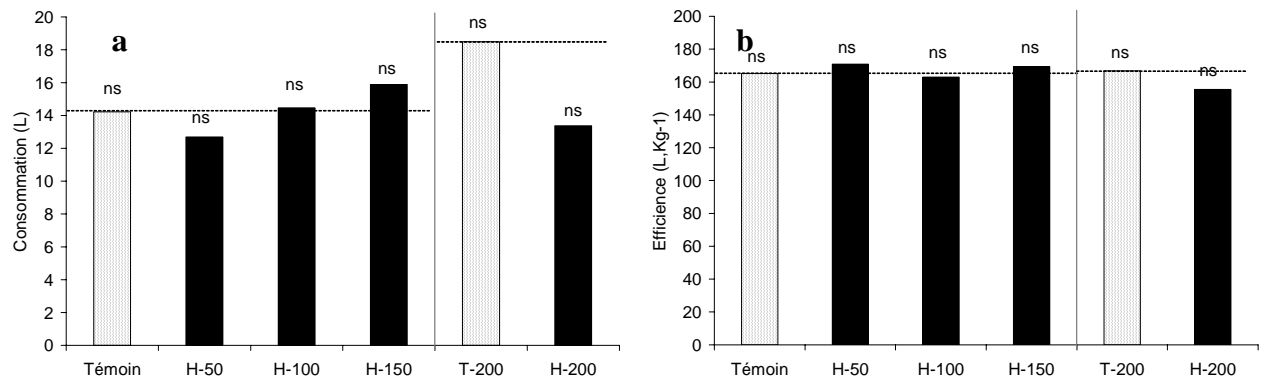


Figure 71 - Consommation d'eau (a) et efficacité de l'eau (b)

Le dosage des éléments minéraux présents dans les solutions nutritives en fin de culture n'a révélé aucune différence de consommation entre les traitements, en raison d'une disparité trop grande entre les valeurs obtenues au sein d'un même traitement.

En résumé

- ⇒ la concentration de SHB favorable à la croissance du maïs est de 50 mg.L⁻¹ de carbone.
- ⇒ Un effet positif se retrouve sur le poids frais et le poids sec total des plantes, réparti sur tous les organes.
- ⇒ Un effet net s'observe sur le développement : les plantes traitées produisent plus d'épis.
- ⇒ La consommation en eau du traitement H50 est moins importante que celle des témoins.

5.3.2 Effets de la dose efficace de substances humiques biomimétiques

5.3.2.1 Rappel des conditions expérimentales

L'objectif de l'expérimentation est de confirmer l'efficacité de la dose 50 mg.L⁻¹ précédemment définie, sur une culture hydroponique de maïs comportant un plus grand nombre de répétitions.. L'essai est mené pendant 8 semaines sur 16 plantes.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	8
H50	Solution nutritive + SHB	50	8
Total	2 traitements	-	16 plantes

Rappel du plan expérimental n°3

5.3.2.2 Croissance et développement du maïs

- Etude de la croissance

L'accroissement du poids frais des plantes est plus important pour les plantes traitées avec les substances humiques (figure 72). Cette croissance correspond à une production de matière sèche de 63% supérieure à celle du témoin. De plus, cette augmentation s'observe de manière significative sur tous les organes.

Le traitement H50 induit la même stimulation au niveau du poids sec total des plantes (figure 72), confirmant les résultats obtenus précédemment. Pour chaque organe, les plantes produisent une quantité de matière sèche plus importante.

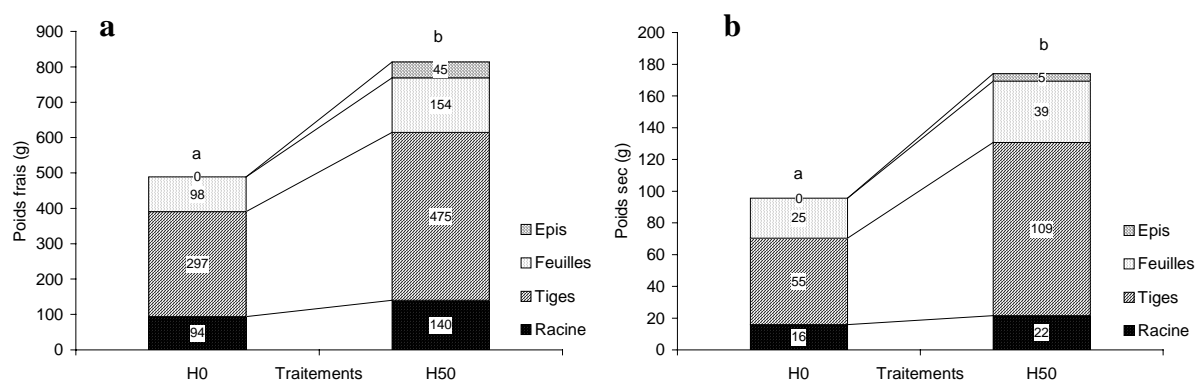


Figure 72 - Répartition du poids frais (a) et du poids sec (b) en fonction des organes

La production de matière fraîche totale (63.5 %) est moins importante que celle de matière sèche totale (93 %). L'accroissement s'observe dans chaque cas sur tous les organes de la plante.

Le maximum de biomasse enregistré concerne les épis, organes néoformés absents chez les témoins et des tiges où il atteint +100 % dans le cas de la matière sèche (tableau 49). Le poids frais et sec des racines connaît l'augmentation la plus faible avec respectivement 48.8% et 35.8 %.

	Accroissement de matière fraîche		Accroissement de matière sèche	
	g	%	g	%
Racine	45.9	48.8	5.7	35.8
Tiges	177.9	59.9	54.6	100.2
Feuilles	56.4	57.6	13.74	53.2
Epis	44.6	100	4.8	100
Partie aérienne	278.9	70.6	72.8	91.3
Plante entière	321.6	63.5	83.9	93

Tableau 49 - Stimulation de la production de matière fraîche et de matière sèche par rapport au témoin

La figure 73 montre que l'accroissement de matière fraîche correspond à une augmentation simultanée de la matière sèche et de l'eau contenue dans la plante.

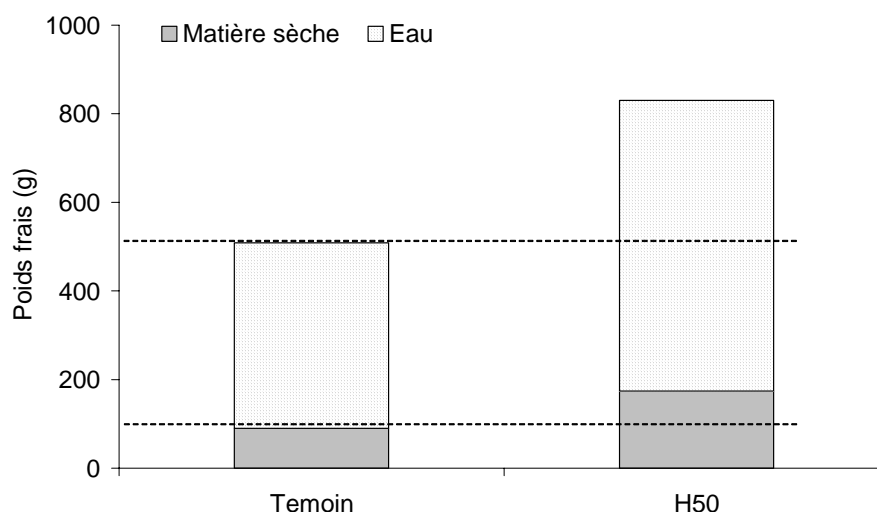


Figure 73 - Répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes

Cependant, inversement à l'expérimentation précédente, les plantes traitées avec les substances humiques ont une teneur en eau inférieure de 3.3% aux plantes témoins (tableau 50). Cette tendance est vérifiée pour tous les organes sauf les racines (+1.4%), probablement en raison de la quantité d'eau adsorbée au niveau racinaire lors de la détermination du poids frais de cet organe.

Ces écarts peuvent expliquer dans le cas de la plante entière, des tiges ou des feuilles, que l'accroissement de la biomasse sèche soit supérieur (tableau 50).

Les tiges des plantes traitées présentent la teneur en eau la plus faible (-4.7%). La diminution des teneurs totales en eau souligne le début de stockage de la matière sèche des grains. Le stade végétatif étant terminé, les tiges et les feuilles ont atteint leur maximum et les éléments nutritifs commencent à migrer des feuilles et des tiges vers les épis. Les organes commencent à se dessécher.

	Eau (%)	
	Témoin	H50
Racine	83.2	84.6
Tiges	81.7	77
Feuilles	74.3	77
Epis	-	89.2
Partie aérienne	79.8	77.1
Plante entière	82.3	79

Tableau 50-Répartition de l'eau et de la matière sèche (%)

- Etude du développement

A la récolte, le traitement H50 présente un nombre de feuilles supérieur (15) au témoin (13.4) indiquant un stade végétatif plus avancé pour les plantes traitées (tableau 51). Les plantes témoins n'ont vraisemblablement pas terminé leur développement végétatif.

Le nombre de panicule confirme cette différence de développement. En effet, toutes les plantes témoins ne possèdent pas de fleur mâle épanouie. De même, l'apparition de fleurs femelle est fortement avancée pour les plantes traitées (tableau 51). En fin d'expérimentation, seules les plantes traitées présentent des épis (5 plantes sur 8 possèdent 2 épis), reflétant une floraison plus précoce.

	Témoin	H50
Nombre de feuilles	13.4	15.1
Nombre d'épis moyens (Fleurs ♀)	0	1.6
Nombre de panicules (Fleurs ♂)	0.8	1

Tableau 51 - Nombre de feuilles et de fleurs

Les plantes traitées présentent également une hauteur (180 cm) significativement supérieure à celle des plantes témoins (103 cm) soit 71% de plus (figure 74). L'écart observé sur la mesure de

la partie aérienne confirme que les plantes traitées n'ont pas atteint le même stade de développement que les plantes témoins.

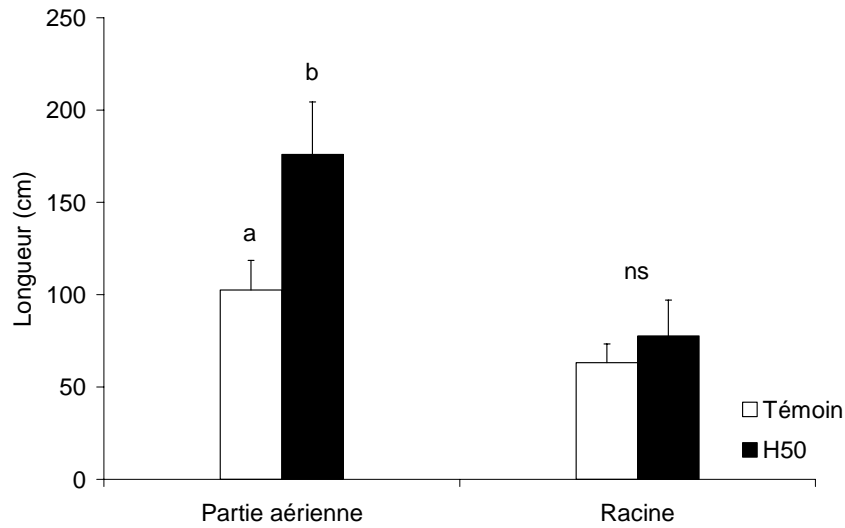


Figure 74 - Hauteur des plantes et longueur du système racinaire

L'élongation racinaire est favorisée par la présence de SHB. La longueur maximale des racines des plantes traitées est supérieure de 23% à celle des plantes témoins (figure 74). Ce résultat est similaire à celui obtenu dans l'expérience précédente.

La structure et le développement du système racinaire sont également identiques aux résultats observés auparavant (§5.3.1.2). La longueur des racines des plantes traitées varie inversement à l'augmentation de leur poids sec (figure 75). Les SHB induisent la formation de racines plus petites et plus ramifiées. A l'inverse, la longueur des racines des plantes témoins augmente avec leur poids sec. Les plantes produisent des racines plus longues et peu ramifiées.

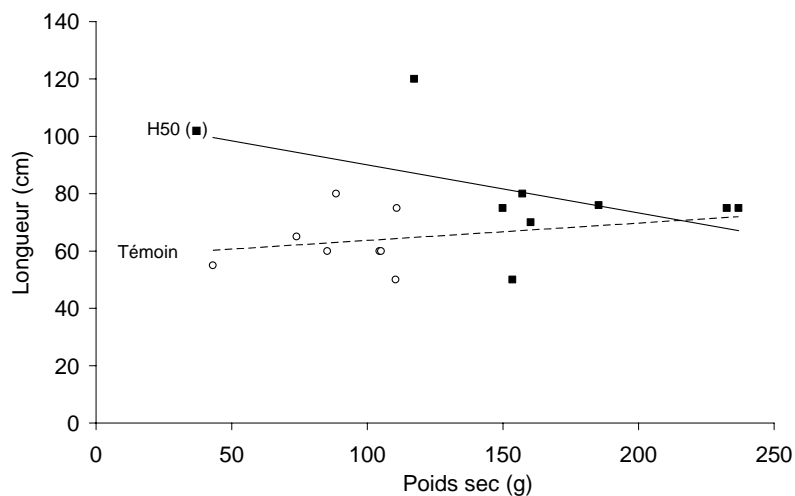


Figure 75 - Effet des SHB sur la ramification du système racinaire

Ces résultats sont confirmés par l'observation macroscopique des racines secondaires à la récolte (figure 76). Les racines des plantes traitées, apparaissent plus nombreuses et de taille plus petite. Les SHB semblent augmenter la ramification du système racinaire et peut être la surface de contact des racines.

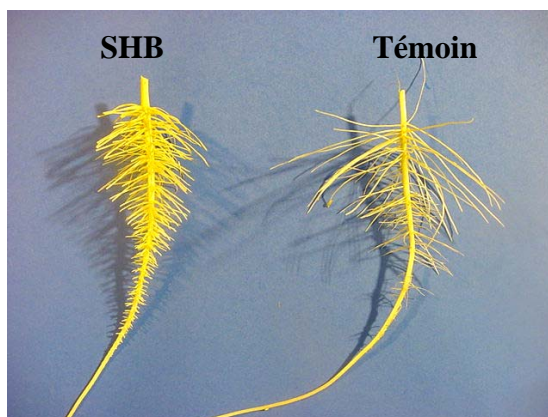


Figure 76 - Structure des racines secondaires fonction du poids frais

5.3.2.3 Evolution des solutions nutritives

Le pH des solutions nutritives augmente de manière identique pour les deux traitements. La diminution plus rapide de la conductivité de la solution H50 indique une consommation d'éléments minéraux significativement plus importante ou la formation de complexes (figure 77).

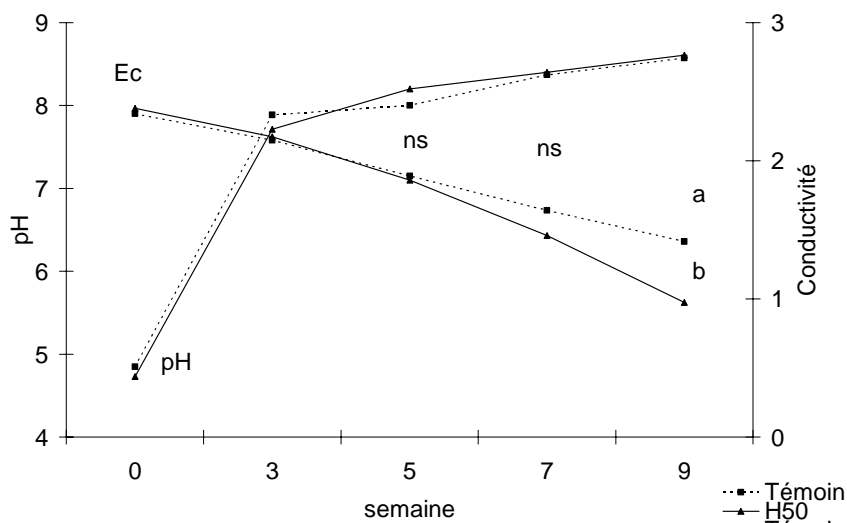


Figure 77 – Evolution du pH et de la conductivité des solutions

Les plantes traitées avec substances humiques consomment plus d'eau que les plantes témoins (+46%), probablement en raison de leur stade de développement plus avancé. Le coefficient de transpiration des plantes traitées est en revanche, moins élevé que celui des plantes témoins. Cette différence est significative, et indique que les plantes traitées utilisent 27% d'eau en moins que les plantes témoins pour synthétiser une unité de matière sèche (figure 78).

Ce résultat est très intéressant pour la culture du maïs en plein champ qui nécessite une irrigation importante. L'utilisation des SHB pour ce type de culture aurait un grand intérêt si leur application en plein champ confirmait l'économie d'eau observée.

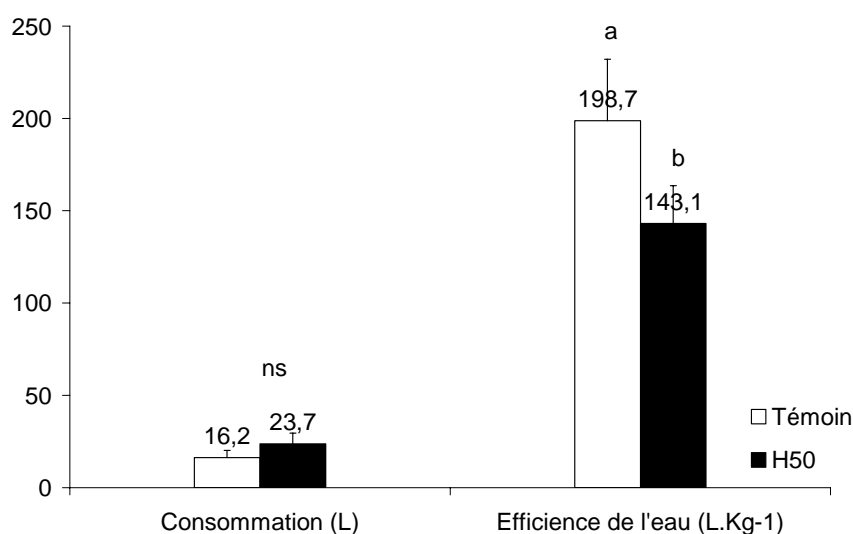


Figure 78 - Consommation et efficience de l'eau

L'épuisement de la solution nutritive, mesuré par la conductivité (figure 77), est confirmé par le dosage des éléments minéraux dans les solutions nutritives en fin de culture. Cet épuisement traduit l'absorption des éléments minéraux par les plantes et la formation de précipités. Les concentrations sont systématiquement plus faibles en fin de culture. A l'exception du calcium, les plantes traitées ont une consommation plus importante en macroéléments. Elles consomment 30% de potassium et de nitrate en plus, 20% de phosphate et 15% de magnésium et de sulfate (tableau 52). Ces écarts peuvent un nouvelle fois être dus aux différences de développement existant entre les traitements. Les plantes H50, plus matures, ont consommé plus d'éléments minéraux que les plantes témoins.

	K	Ca	Mg	N	S	P
Témoin	347.05 a	140 ns	31.56 a	94.48 a	184.87 a	15.19 a
H50	225.21 b	137 ns	27.77 b	65.02 b	153.05 b	11.96 b

Tableau 52 - Concentration en macro éléments des solutions nutritives en fin de culture (g.L⁻¹)

Les mêmes tendances s’observent sur la consommation d’oligo-éléments. Les concentrations en manganèse, zinc et fer des solutions nutritives H50 en fin de culture sont plus faibles et indiquent une plus forte absorption de ces éléments ou la formation de précipité (tableau 53).

	Cuivre	Manganèse	Zinc	Fer
Témoin	0,034 ns	0,105 a	0,263 a	12,560 a
H50	0,037 ns	0,088 b	0,148 b	10,248 b

Tableau 53 - Concentration en micro éléments des solutions nutritives en fin de culture (ppm)

5.3.2.4 Teneur en éléments minéraux des plantes

L’analyse minérale des plantes permet de confirmer ou non la consommation d’éléments minéraux des solutions nutritives (tableau 52-53).

De manière générale et à l’exception du potassium, des teneurs plus élevées apparaissent au niveau des racines des plantes traitées pour tous les éléments. Les teneurs en soufre et magnésium sont augmentées significativement (tableau 54).

De plus, les tiges des plantes traitées possèdent des teneurs en calcium et en azote plus élevées que les plantes témoins, mais des teneurs inférieures pour l’ensemble des autres éléments.

Les feuilles des plantes traitées présentent également des teneurs inférieures aux témoins pour tous les éléments à l’exception de l’azote.

Ceci pourrait illustrer la translocation des ions au niveau de l’épi lors de son remplissage.

		K	Ca	Mg	N	S	P
Racine	Témoin	3,19 ns	1,68 ns	0,08 a	2,35 ns	0,98 a	1,73 ns
	H50	2,99 ns	2,89 ns	0,14 b	3,12 ns	1,51 b	1,95 ns
Tige	Témoin	3,34 ns	0,18 ns	0,07 ns	1,43 ns	0,25 ns	0,66 ns
	H50	2,55 ns	0,32 ns	0,04 ns	2,27 ns	0,08 ns	0,40 ns
Feuille	Témoin	3,76 ns	0,92 ns	0,24 ns	2,38 ns	0,74 a	0,90 ns
	H50	3,17 ns	0,80 ns	0,14 ns	3,03 ns	0,33 b	0,75 ns
Fleur	Témoin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	H50	1,57	0,18	0,06	1,82	0,11	0,18

Tableau 54 - Teneur en macroéléments des organes (%)

5 - Effets des substances humiques biomimétiques sur les plantes

La consommation en anions et cations des plantes traitées est supérieure à celle des témoins et exprime les tendances observées auparavant sur la consommation des éléments minéraux des solutions nutritives. Cependant, cette différence est significative uniquement pour l'azote (tableau 55) et reflète probablement un stade de développement plus avancé des plantes traitées.

De plus, la teneur moyenne des plantes traitées est significativement inférieure aux valeurs des plantes témoins pour le magnésium, le soufre et le phosphore. Elle est également inférieure pour le potassium. Seule la teneur en azote des plantes traitées est plus importante de manière significative.

		K	Ca	Mg	N	S	P
Consommation totale	Témoin	3,71 ns	0,67 ns	0,127 ns	1,93 a	0,54 ns	0,97 ns
	H50	4,41 ns	1,19 ns	0,123 ns	4,0 b	0,57 ns	1,08 ns
Teneur moyenne	Témoin	3,61 ns	0,66 ns	0,12 a	1,93 a	0,53 a	0,95 a
	H50	2,75 ns	0,69 ns	0,08 b	2,36 b	0,35 b	0,68 b

Tableau 55 - Consommation totale (g) et teneurs moyennes (%)

La teneur en micro-éléments des organes varie de façon similaire à celles des macroéléments. Ainsi, les SHB provoquent l'augmentation systématique de la teneur en micro-éléments des racines (tableau 56).

Les tiges des plantes traitées possèdent des teneurs en micro-éléments inférieures aux valeurs des plantes témoins, sauf pour le cuivre.

Les feuilles H50 présentent des teneurs en cuivre et en zinc supérieures.

On peut supposer que les teneurs déterminées sur les épis des plantes traitées proviennent de la translocation des éléments minéraux des feuilles et des tiges.

		Cuivre	Manganèse	Zinc	Fer
Racine	Témoin	0,787 a	4,217 ns	1,650 ns	93,200 ns
	H50	0,902 b	4,517 ns	2,000 ns	107,267 ns
Tige	Témoin	0,192 ns	0,600 ns	0,633 ns	6,800 a
	H50	0,213 ns	0,567 ns	0,517 ns	2,150 b
Feuille	Témoin	0,425 ns	6,583 ns	0,617 a	8,700 ns
	H50	0,432 ns	5,117 ns	1,150 b	7,600 ns
Fleur	Témoin	0,00	0,00	0,00	0,00
	H50	0,293	0,675	0,675	3,875

Tableau 56 - Teneur en micro-éléments des organes (ppm)

Les SHB augmentent la consommation des micro-éléments, de façon significative pour le cuivre et pour le zinc (tableau 57). Cette augmentation peut être liée au stade de développement plus avancé des plantes traitées.

Les teneurs en oligo-éléments des différentes plantes ne présentent pas de différence significative.

		Cuivre	Manganèse	Zinc	Fer
Consommation totale	Témoin	0,38 a	2,96 ns	0,86 a	23,08 ns
	H50	0,62 b	4,30 ns	1,53 b	28,51 ns
Teneur totale	Témoin	0,37 ns	2,90 ns	0,84 ns	22,80 ns
	H50	0,37 ns	2,86 ns	0,91 ns	18,96 ns

Tableau 57 - Consommation totale (g) et teneurs moyennes (%)

En résumé

- ⇒ Les effets positifs des SHB se manifestent sur la croissance des plantes au niveau de tous les organes.
- ⇒ un effet net apparaît sur le développement : seules les plantes traitées ont des inflorescences femelles.
- ⇒ Les nombreux paramètres de croissances stimulés précisent l'action des SHB sur la précocité du développement.
- ⇒ L'apport de SHB dans la solution nutritive diminue la quantité d'eau consommée pour produire la même quantité de matière sèche.
- ⇒ Les SHB augmentent la consommation totale de macro et micro-éléments. Cette augmentation est significative pour l'azote, le cuivre et le zinc.
- ⇒ L'augmentation des différents paramètres de croissance et de développement est relative au stade de développement atteint par les plantes traitées.

5.3.3 Comparaison des effets des substances humiques biomimétiques et des fractions humiques et fulviques

5.3.3.1 Rappel des conditions expérimentales

L'objectif de l'expérimentation est de tester les effets des fractions humiques et fulviques sur une culture hydroponique de maïs et de les comparer aux effets des SHB. Les concentrations en carbone des traitements humiques et fulviques appliquées sont calculées à partir de la dose efficace de SHB déterminée précédemment, soit 50 mg.L^{-1} . L'essai est mené pendant 8 semaines sur 20 plantes.

Code	Traitement	Dose (mg.L^{-1})	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	5
H50	Solution nutritive + SHB	50	5
AF20	Solution nutritive + Acide fulvique	20	5
AH30	Solution nutritive + Acide humique	30	5
Total	4 traitements	-	20 plantes

Rappel du plan expérimental n°3

5.3.3.2 Croissance et développement du maïs

- Etude de la croissance

L'accroissement du poids frais des plantes est plus important pour les plantes traitées avec les substances humiques (figure 79). Comme lors des deux précédentes expérimentations, le traitement H50 entraîne l'augmentation significative de poids frais la plus importante (+38%). Les plantes traitées par les acides fulviques et humiques ont une production de matière fraîche supérieure au témoin de 15 et 9 % respectivement.

Cette augmentation de poids frais s'observe de manière significative sur tous les organes. Le traitement H50 induit l'augmentation la plus significative du poids frais total des plantes traitées et de leurs organes (figure 79). L'accroissement de matière fraîche s'observe également sur tous les organes des plantes AF20 et AH30. Pour tous les traitements, les organes les plus stimulés sont les tiges, les épis puis les racines et les feuilles.

5 - Effets des substances humiques biomimétiques sur les plantes

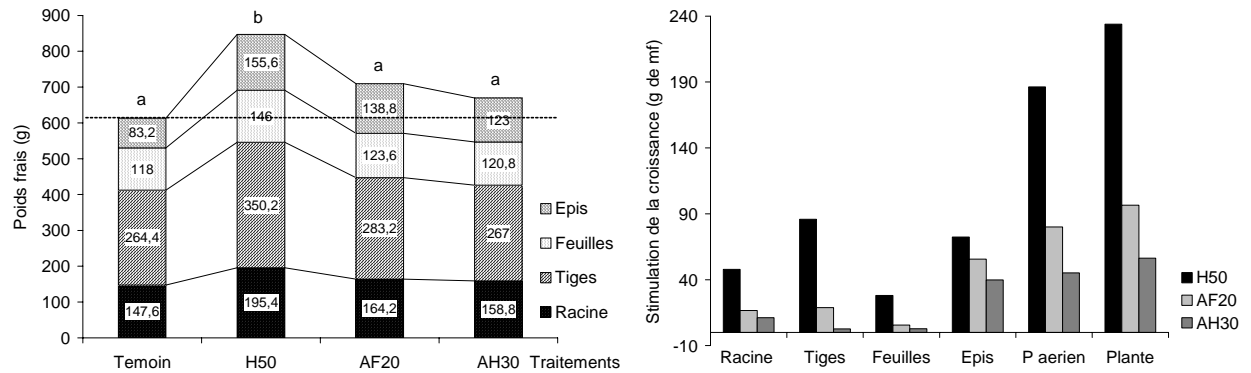


Figure 79 - Répartition du poids frais en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (par rapport au témoin)

Les tendances observées sur la matière fraîche des végétaux se confirment sur la matière sèche des plantes. Le traitement H50 induit la même stimulation au niveau du poids sec total des plantes (figure 80), confirmant les résultats obtenus précédemment, les plantes produisent une quantité de matière sèche plus importante. Le traitement H50 possède un poids sec supérieur au témoin de manière significative (+52.4 %). Il est ensuite respectivement plus élevé pour les traitements AF20 (+24.4 %) et AH30 (+12.3 %).

La production maximale de biomasse sèche est observée pour les tiges, les épis puis les racines et les feuilles (figure 80).

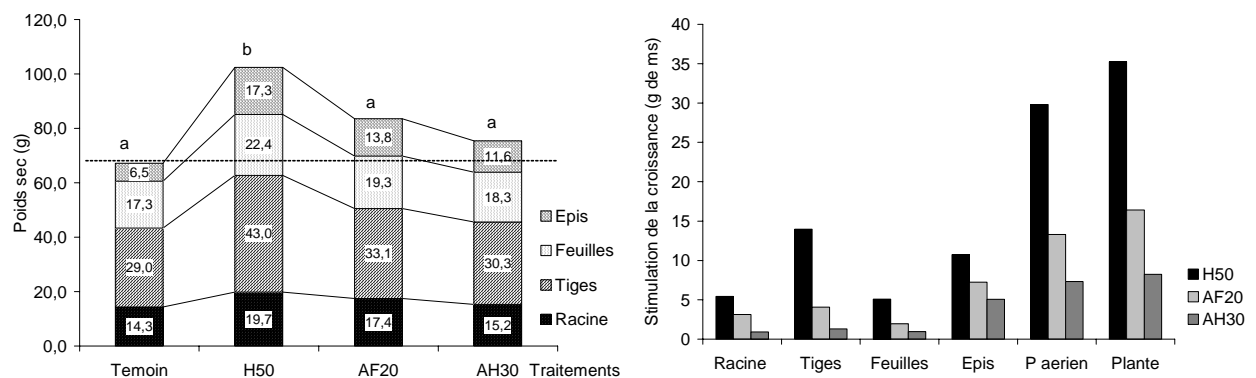


Figure 80 - Répartition du poids sec en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (par rapport témoin)

Comme dans l'expérimentation précédente, les plantes traitées avec les substances humiques ont une teneur en eau inférieure de 1 à 2% aux plantes témoins (tableau 58). Cette tendance est vérifiée pour tous les organes.

	Eau (%)			
	Témoin	H50	AF20	AH30
Racine	90.3	89,9	89,4	90,4
Tiges	89	87,7	88,3	88,6
Feuilles	85.3	84,7	84,4	84,9
Epis	92.1	88,9	90,1	90,6
Partie aérienne	88.7	87.3	87.9	88.2
Plante entière	89	87,9	88,2	88,7

Tableau 58 - Répartition de la matière sèche et de l'eau (%)

L'accroissement de matière fraîche des plantes traitées correspond une nouvelle fois à un accroissement de la matière sèche et de l'eau contenue dans la plante (figure 81).

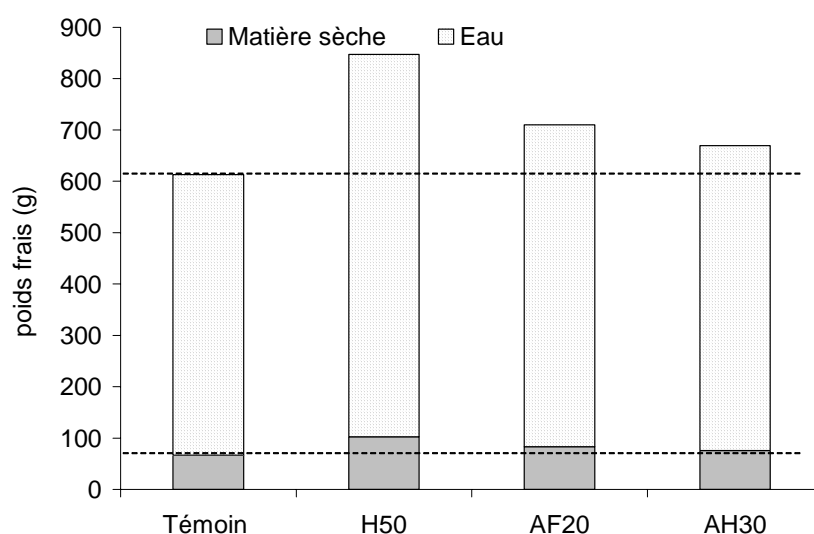


Figure 81 - Répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes

- Etude du développement

A la récolte, l'ensemble des plantes traitées présente un nombre de feuilles identique (13) traduisant la fin du stade végétatif de toutes les plantes (tableau 59); ainsi que des panicules épanouies, indiquant que toutes les plantes ont débuté leur stade reproductif. Le nombre d'épis formés est toujours supérieur chez les plantes traitées (tableau 59). Les SHB induisent la formation de plusieurs épis par plante et le traitement fulvique semble en produire le plus (1.6). En revanche, les plantes témoins n'ont pas toutes produit de fleurs femelles. Cette observation indique que l'induction de la floraison est plus précoce pour les plantes traitées.

	Témoin	H50	AF20	AH30
Nombre de feuilles	13	13	13	13
Nombre d'épis moyen (Fleurs ♀)	0.8	1.2	1.6	1
Nombre de panicules moyen (Fleurs ♂)	1	1	1	1

Tableau 59 - Nombre de feuilles et de fleurs

Tous les traitements humiques stimulent la croissance en hauteur des plantes, confirmant les résultats précédemment observés et indiquant la fin du développement végétatif (figure 82). Le traitement H50 (+12%) est, une nouvelle fois, supérieur aux traitements AF20 (+8%) et AH30 (+3%).

L'élongation racinaire est également favorisée par la présence de SHB de manière significative (figure 82). Elle est plus importante pour H50 (+20%) que pour AF20 ou AH30 (+10%).

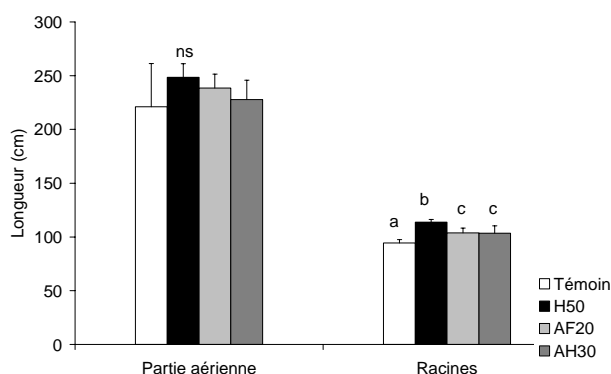


Figure 82 - Hauteur des plantes et longueur racinaire

Comme précédemment, la longueur maximale des racines des plantes H50 diminue lorsque leur poids frais augmente (figure 83). Ces plantes produisent un système racinaire plus petit avec un plus grand nombre de ramifications. A l'inverse, la longueur des racines des plantes témoins augmente avec leur poids sec. Les plantes produisent des racines longues et peu ramifiées.

Les traitements AF20 et AH30 provoquent un développement du système racinaire similaire à celui du témoin. La longueur et le poids sec des racines augmentent proportionnellement.

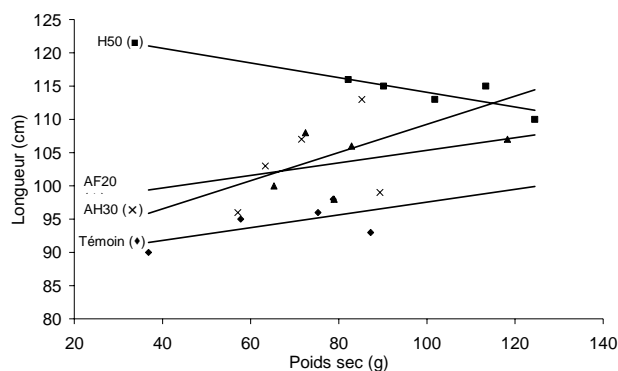


Figure 83 – Effet des SHB sur la ramification du système racinaire

5.3.3.3 Evolutions des solutions nutritives

Malgré la variabilité des valeurs initiales, le pH des solutions nutritives augmente de manière similaire pour atteindre des valeurs proches de 8, la 4^{ème} semaine. Le pH de la solution H50 continue d'augmenter jusqu'à la fin de la culture (figure 84).

La conductivité des solutions diminue de façon identique, l'écart le plus important demeure entre H50 et le témoin (figure 94).

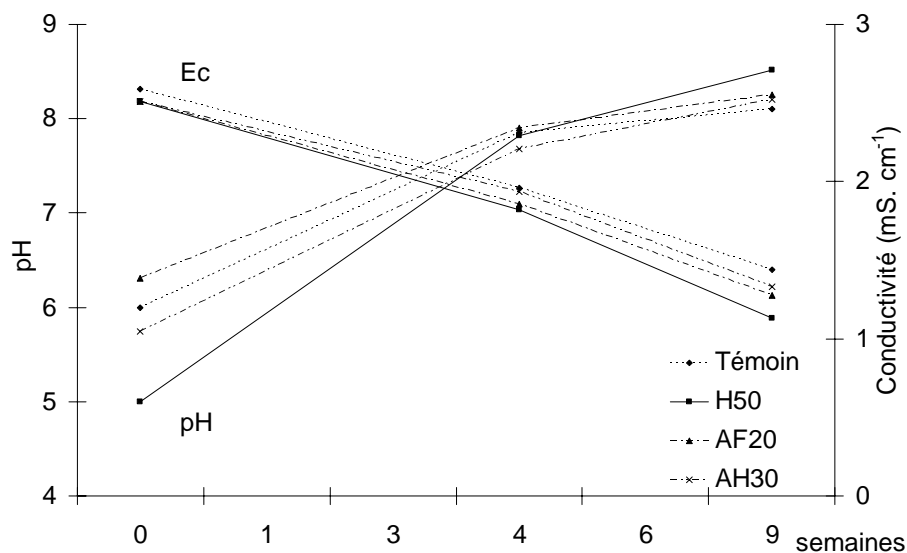


Figure 84 - pH et conductivité des solutions

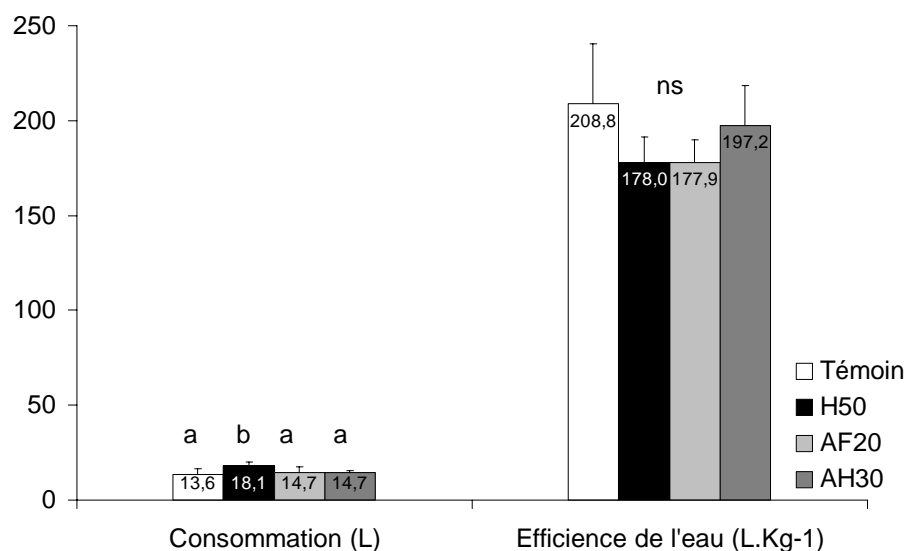


Figure 85 - Consommation et efficiéce de l'eau

Les plantes traitées avec les substances humiques consomment une quantité d'eau supérieure aux plantes témoins. Les plantes H50 consomment 33% d'eau de plus que les témoins, les plantes AF20 et AH30 14% de plus. L'application de SHB diminue le coefficient de transpiration des plantes. Cette observation confirme les résultats précédents et indique que les plantes traitées réalisent une économie d'eau de 5% (AH30) à 14% (AF20 et H50) pour synthétiser une unité de matière sèche (figure 85).

5.3.3.4 Teneur en éléments minéraux des plantes

- Teneur en micro-éléments

Les SHB ont un impact variable sur l'absorption des oligo-éléments (tableau 60).

Les acides humiques induisent une augmentation de la teneur en cuivre, en manganèse et en fer des racines ainsi que la teneur en manganèse sur les tiges des plantes AH30. En revanche, la teneur en cuivre et fer des tiges est significativement inférieure à celles des plantes témoins.

Seule la teneur en fer des feuilles des plantes traitées est inférieure aux teneurs des plantes témoins.

5 - Effets des substances humiques biomimétiques sur les plantes

		Cuivre	Manganèse	Zinc	Fer
Racine	Témoin	0,862 ns	13,733 a	1,592 a	270,917 a
	H50	0,756 ns	17,342 a	1,042 b	302,750 a
	AF20	0,766 ns	8,417 b	1,650 a	283,833 a
	AH30	1,046 ns	24,758 c	1,508 a	542,833 b
Tige	Témoin	0,207 a	0,475 a	0,492 ns	3,183 a
	H50	0,206 a	0,642 ab	0,467 ns	3,092 a
	AF20	0,284 a	0,892 b	0,550 ns	3,167 a
	AH30	0,100 b	2,142 c	0,550 ns	1,233 b
Feuille	Témoin	0,534 ns	6,242 ns	1,683 ns	9,850 a
	H50	0,307 ns	4,967 ns	1,400 ns	4,667 b
	AF20	0,401 ns	5,950 ns	1,508 ns	6,150 b
	AH30	0,338 ns	7,925 ns	1,725 ns	5,342 b
Fleur	Témoin	0,244 ns	0,867 ns	1,067 ns	2,175 ns
	H50	0,273 ns	0,625 ns	0,942 ns	2,075 ns
	AF20	0,242 ns	1,058 ns	1,300 ns	2,150 ns
	AH30	0,280 ns	1,008 ns	1,150 ns	1,467 ns

Tableau 60 - Teneur en micro-éléments des organes (ppm)

La consommation en cuivre et en zinc des plantes traitées n'est pas significativement différente de celle des plantes témoins (Tableau 61).

En revanche, pour le traitement AH30 la consommation et les teneurs totales en manganèse et fer sont plus importantes. Ceci est principalement lié à la forte concentration de ces éléments au niveau des racines et probablement en relation avec le pouvoir complexant des acides humiques. En effet, le dosage de ces quantités importantes de fer et de manganèse au niveau des racines n'indique pas si leur localisation est intracellulaire (absorption par la plante) ou extra cellulaire (adsorption à la surface des racines et formation de complexe avec les acides humiques).

		Cuivre	Manganèse	Zinc	Fer
Consommation totale	Témoin	0,313 ns	3,432 a	0,833 ns	43,92 a
	H50	0,319 ns	4,581 ab	0,799 ns	57,37 ab
	AF20	0,315 ns	2,823 a	0,807 ns	49,11 ab
	AH30	0,270 ns	5,776 b	0,801 ns	78,90 b
Teneur totale	Témoin	0,453 ns	4,976 a	1,134 ns	64,57 a
	H50	0,332 ns	4,700 a	0,844 ns	57,93 a
	AF20	0,406 ns	3,665 a	1,115 ns	61,17 a
	AH30	0,376 ns	7,943 b	1,113 ns	111,09 b

Tableau 61 - Consommation totale (mg) et teneurs moyennes (ppm)

En résumé

- ⇒ Les effets positifs des SHB s'observent sur la croissance des plantes qui présentent un gain de matière fraîche et sèche plus important que le témoin sur tous les organes.
- ⇒ Les AF et AH, induisent les mêmes effets sur la croissance et le développement des plantes que les SHB mais de manière moins importante.
- ⇒ Les plantes traitées consomment plus d'eau que les plantes témoins, elles possèdent néanmoins un coefficient de transpiration moins élevé.
- ⇒ La fraction fulvique semble induire une floraison plus précoce et augmenter le nombre de fleurs produites.

5.3.4 Effets sur la germination et la croissance racinaire

L'objectif de cette étude est de tester les effets des SHB sur la germination et la rhizogenèse du maïs et de définir le meilleur mode d'application. Ces travaux ont également permis de compléter les effets observés sur le cycle total du développement de cette plante. Pour cela, trois expérimentations différentes ont été réalisées (DEA M. Méric, 2003) et deux modes d'application ont été utilisés:

- trempage des graines dans une solution concentrée,
- germination sur papier imbibé de solutions humiques diluées.

5.3.4.1 Effets d'une solution concentrée et du temps d'imbibition

L'effet des SHB brutes a été étudié en plongeant directement les graines dans une solution neutralisée de produit humique concentré. Plusieurs temps d'imbibition ont été testés et les graines ont été mises à germer sur papier filtre imbibé d'eau distillée. Cet essai comporte 4 traitements de 20 graines, soit 80 graines.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	2, 4, 5h	20
SH 2h	SHB concentrées neutralisées	2h	20
SH 4h	SHB concentrées neutralisées	4h	20
SH 5h	SHB concentrées neutralisées	5h	20
Total	4 traitements		120 graines

Rappel du plan expérimental n°7

La germination des graines est accélérée suite au trempage dans les SHB. Le pré traitement des graines dans une solution humique concentrée, améliore la germination de manière significative quel que soit le temps d'application. Cette stimulation apparaît dès 72 heures d'application quelle que soit la durée du traitement. La croissance des racines est améliorée de 42% pour les graines trempées 5 heures, de 35% pour les graines trempées 2 heures et de 27% pour les graines trempées 4 heures (figure 86). Ces résultats montrent que les SHB adsorbées à la surface des graines suite au trempage, suffit à améliorer la germination et la croissance des racines.

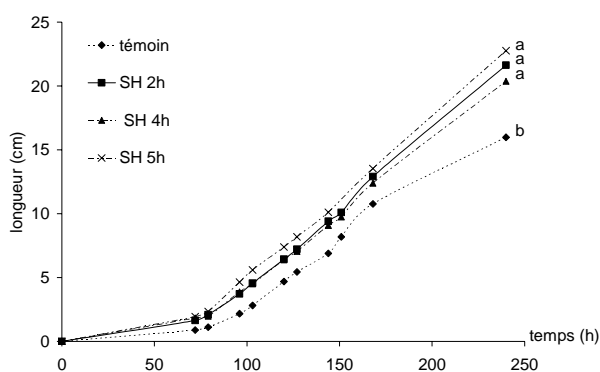


Figure 86 – Cinétique d'élongation racinaire

5.3.4.2 Recherche de la dose efficace

La dose de SHB diluées induisant les meilleurs effets sur la germination a été déterminée en testant des concentrations croissantes de SHB en solutions (50 à 500 mg.L⁻¹). Les graines ont été mises à germer sur papier filtre imbibé d'une solution de SHB à différentes concentrations. L'essai comporte 5 traitements de 20 graines, soit 100 graines.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	20
H50	Solution nutritive + SHB	50	20
H100	Solution nutritive + SHB	100	20
H200	Solution nutritive + SHB	200	20
H500	Solution nutritive + SHB	500	20
Total	5 traitements		100 graines

Rappel du plan expérimental n°6

Comme précédemment, la germination des graines traitées apparaît plus rapide que celle des graines non traitées. Les SHB ne modifient pas le pourcentage de graines germées mais accélèrent leur vitesse de germination.

L'utilisation de solution nutritive additionnée de SHB provoque également un accroissement significatif de l'élongation des racines pour les traitements H100 (+23%) et H200 (+13.8%). La stimulation de ces traitements apparaît après 150h de traitement. Le traitement H50 présente la même évolution que les plantes témoins. A trop forte concentration (500 mg), la germination est inhibée de 20% (figure 87).

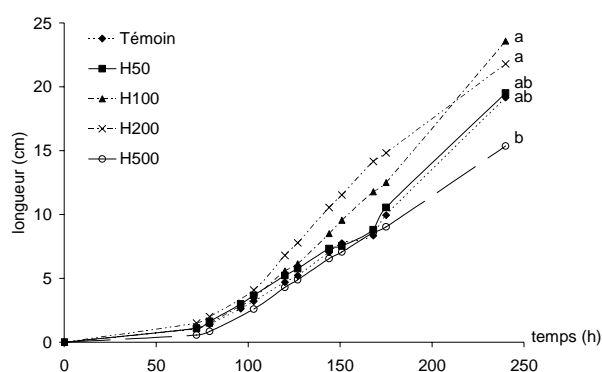


Figure 87 – Cinétique d'élongation racinaire

5.3.4.3 Effets des SHB sur l'élongation racinaire de plantule

La dernière étude permet d'observer les effets de la dose optimale de SHB précédemment définie, sur l'élongation racinaire de plantules germées en condition standard, sur papier imbibé d'eau distillée. Cet essai comporte 2 traitements de 14 plantes, soit 28 plantes.

Code	Traitement	Dose (mg.L ⁻¹)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	14
H100	Solution nutritive + SHB	100	14
Total	2 traitements		28 plantes

Rappel du plan expérimental n°8

L'observation de l'élongation racinaire de plantule germée dans des conditions standard, révèle une croissance plus importante des plantes traitées (+23%). Les cinétiques d'élongation des racines présentent deux vitesses différentes qui tendent à augmenter l'écart entre les deux traitements (figure 88). La durée de l'expérimentation ne permet cependant pas d'observer des écarts significatifs.

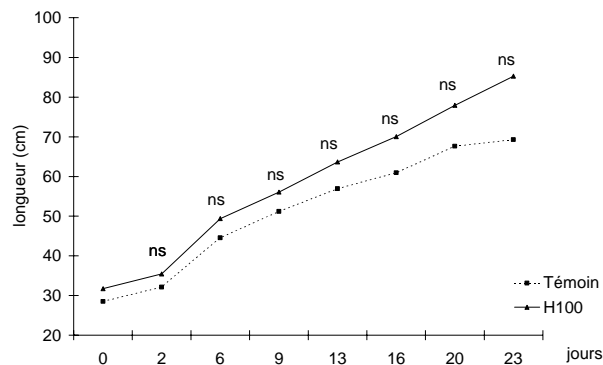


Figure 88 – Cinétique d'élongation racinaire

En résumé

- ⇒ Les substances humiques favorisent la germination en diminuant le temps de germination.
- ⇒ Les SHB stimulent l'élongation racinaire des graines mais aussi des jeunes plantules de maïs quel que soit le mode d'application (solution concentrée ou diluée).

5.3.5 Expérimentation en pots

5.3.5.1 Rappel des conditions expérimentales

L'objectif de cette étude est d'observer si les résultats obtenus en culture hydroponique peuvent se vérifier sur une culture de maïs en pots conduite en collaboration avec une station expérimentale. L'apport de SHB est réalisé sous différentes formes définies par trois traitements. L'expérimentation est conduite pendant 9 semaines et comprend 25 répétitions par traitements.

Code	Traitement	Dose (mg/ plante)	Répétition
T	Solution nutritive standard		25
T1	Solution nutritive + SHB	2	25
T2	Solution nutritive + SHB	4	25
T3	Solution nutritive + SHB	20	25
Total	4 traitements	-	100 plantes

Rappel du plan expérimental n°9

5.3.5.2 Croissance et développement des plantes

L'apport de SHB induit une augmentation de poids frais total, correspondant à un accroissement des racines et des parties aériennes (figure 89). Cet accroissement ne se retrouve pas sur le poids sec total des plantes traitées.

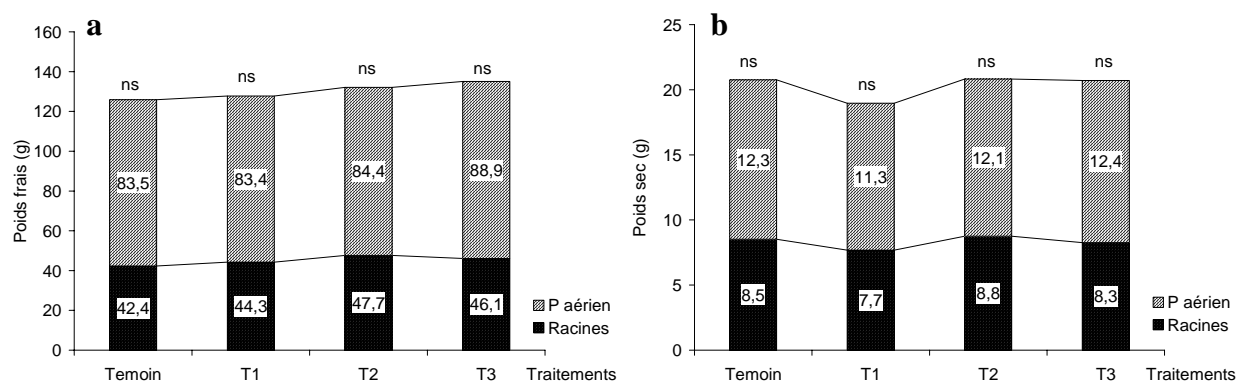


Figure 89 - Répartition du poids frais (a) et du poids sec des plantes (b) en fonction des organes

L'augmentation de la biomasse fraîche est proportionnelle à la dose de SHB employée. Elle est plus importante sur les racines que sur les parties aériennes (figure 90). Les tendances observées sur la matière fraîche des végétaux ne se confirment pas sur la matière sèche des plantes traitées.

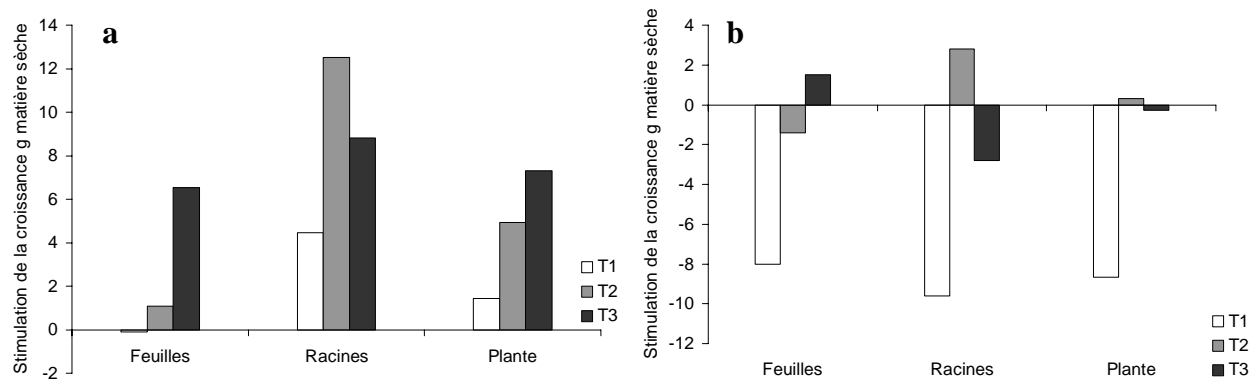


Figure 90 - Stimulation de la croissance des organes et des plantes entières traitées (% du témoin)

a : poids frais b : poids sec

L'observation de la répartition de l'eau et de la matière sèche indique que les plantes traitées ont une teneur en eau plus importante que les plantes témoins (tableau 40).

	Eau (%)			
	Témoin	T1	T2	T3
Racine	78,0	86,4	81,4	81,1
Partie aérienne	85,2	82,5	85,6	85,9
Plante entière	83,2	85,0	84,2	84,5

Tableau 40 : Teneur en eau des plantes (%)

En résumé

⇒ L'expérimentation menée en pots ne permet pas de retrouver les effets positifs et significatifs des SHB induits en culture hors sol.

⇒ Des tendances similaires apparaissent sur l'accroissement de la biomasse fraîche.

5.4 DISCUSSION GENERALE

Cette discussion reprend l'ensemble des résultats obtenus sur les deux plantes étudiées. Elle débat dans un premier temps, les effets de différentes doses et de la dose optimale de SHB sur la croissance et le développement des plantes puis sur leur nutrition hydrique et minérale. Enfin, les effets spécifiques liés aux fractions humiques et fulviques sont discutés dans la dernière partie.

5.4.1 Effets sur la croissance et le développement

- **Effet de la dose et du choix de la plante**

Nos résultats confirment la complexité des effets des substances humiques observés sur les végétaux. Pour des cultures de plantes entières, l'étude de l'effet de doses croissantes de SHB ajoutées à la solution nutritive, révèle une efficacité optimale à 50 mg.L⁻¹ de carbone en solution, pour les deux espèces étudiées. Notons également que le pélargonium semble aussi sensible à la dose de 35 mg.L⁻¹. Les doses favorables sont donc faibles et correspondent à une dilution au 1/200^{ième} de la solution de SHB brute obtenue par le procédé de synthèse. Enfin, de trop fortes concentrations inhibent la croissance, aussi bien pour le maïs (§5.3.1) que pour le pélargonium (Galy, 2002).

Ces valeurs correspondent aux résultats obtenus antérieurement, par l'équipe de recherche du Pr. Morard, 50 mg.L⁻¹ sur le pélargonium (Galy, 2002), 100 mg.L⁻¹ sur le bégonia (DEA M. Meric, 2004 ; Morard et al 2003) et 100 mg.L⁻¹ sur le ray-gras (DEA J. Roche, 2001).

Ces résultats rejoignent également quelques observations réalisées par d'autres auteurs sur différentes espèces (olive, tomate). Les doses optimales déterminées sont du même ordre de grandeur : autour de 100 mg.L⁻¹ de carbone (Fagbenro and Agboola, 1993; Piccolo, 1993).

- **Effet sur la germination et la rhizogénèse**

Les effets des SHB sur la germination et la croissance des racines du maïs sont nets et significatifs. Les traitements accélèrent la germination et augmentent l'élongation racinaire. Ces résultats s'observent pour un trempage des graines dans des solutions des SHB concentrées (≈ 10 g.L⁻¹) et pour des graines germées sur du papier imbibé de solutions humiques diluées (100 mg.L⁻¹). Ces observations confirment les travaux déjà réalisés sur cette plante (Tan and Nopamornbodi, 1979) qui présentent des résultats positifs sur l'élongation des racines et des tiges pour des

concentrations de 640 mg L^{-1} . Cette stimulation a également été observée pour le maïs par Lee en 1976 pour une concentration de 5 mg L^{-1} . Les SHB pourraient avoir une action physique en assouplissant les téguments de la graine et facilitant l'absorption de l'eau. Elles pourraient également avoir un effet chimique en modifiant les réactions impliquées dans le métabolisme de la germination. L'action des SHB sur la germination pourraient initier les effets positifs observés par la suite sur la croissance des plantes entières.

Notons enfin, que la stimulation de la germination a déjà été étudiée sur d'autres plantes comme le Pélargonium (Hartwigsen and Evans, 2000). L'auteur montre une amélioration de la germination de 10% et un accroissement du poids frais des racines et des tiges pour des plantes germées en présence de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de substances humiques.

- **Effet sur la croissance**

La croissance a été étudiée selon l'augmentation des paramètres biométriques suivants : longueur de la tige ou de l'axe principal, longueur maximale des racines, poids frais et poids sec des plantes entières et des organes.

Les résultats obtenus montrent que les SHB modifient l'allongement et la structure du système racinaire du maïs et du pélargonium en augmentant sa ramification. Les plantes traitées produisent des racines plus petites et plus nombreuses influençant la morphologie du massif racinaire. Ces effets sont identiques à ceux obtenus par Canellas (2002) qui observe une amélioration de la croissance des racines du maïs et l'apparition de nombreuses racines secondaires. Les effets observés sur la structure des racines sont parfois controversés. Les SH peuvent améliorer la formation de racines secondaires (O'Donnell, 1972), l'élongation racinaire (Mylonas and McCants, 1980) ou n'avoir aucun effet (Hartwigsen and Evans, 2000).

De manière générale, la concentration optimale de SHB augmente également la production de biomasse fraîche et sèche. La mesure détaillée de ces paramètres indique que les effets sont différents selon les organes du pélargonium. La croissance des parties végétatives du pélargonium, semble limitée au profit des parties reproductrices (§5.2.2) et la croissance des parties aériennes semble limitée au profit des racines. Cette réorientation du métabolisme du pélargonium rappelle les effets classiquement observés chez les plantes stressées.

En revanche, chaque paramètre de la croissance du maïs est stimulé par la présence de SHB (§5.3.6).

Ces observations confirment les données de la bibliographie concernant les effets des SHB sur la croissance des végétaux. L'étude de la fertilisation du géranium par des SH de compost montre

une amélioration de la croissance pour de faible dose de compost (Gauthier et al., 1997; Ribeiro et al., 2000). L'effet positif des SH sur la croissance des pélargoniums s'observe sur les racines et les tiges qui produisent plus de poids frais (Hartwigsen and Evans, 2000).

Les études réalisées sur l'impact des SH sur le maïs, portent généralement sur les plantules. Elles indiquent aussi des résultats positifs sur l'élongation des racines et la production de biomasse (Lee and Bartlett, 1976; Tan and Nopamornbodi, 1979).

De plus, la stimulation de la croissance des plantes en présence de SH, a également déjà été montrée sur le tabac (Mylonas and McCants, 1980), l'olivier (Fernandez-Escobar et al., 1996) ou la tomate (David et al., 1994).

- **Effet sur le développement**

Les SHB provoquent un effet net sur le développement qui se traduit par l'avancement des stades phénologiques des plantes traitées. Le développement des plantes semble stimulé de la même manière pour les deux espèces, par une accélération de la mise à fleurs ayant pour conséquence une production totale de fleurs plus importantes pour le pélargonium et la formation de plusieurs épis dans le cas du maïs. De plus, l'ensemble des paramètres de croissance mesurés sur le maïs traduit la différence du stade phénologique atteint par les plantes traitées et témoins.

L'influence des SH sur le développement des plantes est aussi abordée dans la littérature, cependant aucune étude ne mentionne clairement des effets sur la précocité du développement. Seul Ribeiro (2000) signale la présence de fleurs uniquement chez les pélargoniums traités par différentes concentrations de compost. Cette observation confirme les résultats de nos expérimentations.

- **Explications physiologiques des effets biostimulants**

Il est vraisemblable que les effets observés sur la croissance et le développement de chaque plante soient liés. Ainsi, les effets positifs des SHB sur la production de matière fraîche et sèche ne correspondent pas à des effets directs sur la productivité des plantes mais plutôt à une augmentation de la vitesse du cycle de développement des plantes. L'accélération de la croissance se traduit par une apparition plus précoce des stades phénologiques. La mesure des différents paramètres de croissance confirme cette hypothèse. La hauteur, le nombre de feuilles, le poids sec, l'apparition et la maturité des épis des maïs traités sont caractéristiques d'un stade de développement plus avancé.

L'impact des SHB sur le développement végétatif et reproductif détermine donc la réponse globale des plantes. Les SHB conditionnent probablement de manière directe ou indirecte l'accélération des phases de développement des plantes.

Ainsi, paradoxalement, le premier impact des SHB se situerait probablement sur le stade reproductif, par l'activation de la mise à fleurs. Cette hypothèse confirmerait la tendance récurrente qui apparaît à l'issue des expérimentations, sur l'accélération de la mise à fleurs des deux espèces étudiées. Ce phénomène induirait une précocité générale du développement des plantes, donc du stade végétatif qui serait soit stimulé (maïs) soit réorienté (pélargonium).

De plus, la floraison est souvent induite par des conditions environnementales de stress (hydrique, salin, anoxie), qui accélèrent leur cycle de reproduction. L'apport de SHB dans la solution nutritive pourrait induire, par adsorption des molécules humiques à la surface des racines, la formation d'une gaine qui limite les échanges gazeux et minéraux. Cette adsorption pourrait être perçue par les plantes comme une forme de stress, qui déclencherait rapidement une activité reproductrice et pourrait expliquer les phénomènes de précocité observés chez les plantes. Les SHB modifient le pH des solutions nutritives et influent sur les échanges racinaires.

Le mode d'action des substances humiques reste cependant inconnu et plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer les effets observés sur les végétaux.

Les substances humiques provoqueraient une stimulation des principaux processus métaboliques des végétaux qui se traduiraient par une accélération de la croissance et du développement (Muscolo et al., 1999b). Pour étayer cette théorie, la bibliographie met en évidence des effets biostimulants sur :

- La respiration (Sladky, 1959),
- la photosynthèse (Tejada and Gonzalez, 2004),
- la synthèse protéique (Nardi et al., 2000),
- le métabolisme enzymatique (Albuzio et al., 1989; Merlo et al., 1991)

Outre la pénétration de petites fractions humiques au sein des plantes (Vaughan and Linehan, 1976), l'activité « hormone-like » des substances humiques est souvent évoquée (Bottomley, 1917; Cacco and Dell'agnolla, 1984; Nardi et al., 2002; O'Donnell, 1972; Piccolo et al., 1992).

Cette activité est attribuée à une action directe des extraits humiques qui posséderaient des structures proches de celles des hormones végétales (Muscolo et al., 1998) et la capacité

d'interférer dans le métabolisme auxinique (Muscolo et al., 1999a). Les caractérisations chimiques des fractions humiques permettent certes de confirmer l'existence de structure indolique mais leur présence au sein de petite molécule capable de pénétrer dans la plante et leur activité relative reste à démontrer. L'interférence des substances humiques avec le métabolisme auxinique paraît plus vraisemblable au niveau de la régulation de la synthèse et de la dégradation de l'auxine et des hormones en général.

5.4.2 Effet sur la nutrition hydrique et minérale

- **Effets sur la consommation et l'efficacité de l'eau**

La technique d'aquiculture utilisée lors des expérimentations permet de mesurer avec précision l'eau consommée par chaque plante. De manière générale, les SHB augmentent la consommation d'eau du maïs et du pélargonium, ce qui correspond à une activation de la production de biomasse. En ramenant la quantité d'eau consommée à la production de matière sèche, on détermine le coefficient de transpiration des plantes (tableau 62). Ce coefficient permet d'estimer la quantité d'eau consommée par les végétaux pour produire une unité de matière sèche.

	Efficacité (L.Kg ⁻¹)		
	Témoin	H50	Différence
Pélargonium Exp1	190	176	-7.3%
Maïs Exp 4	199	143	-28%
Maïs Exp 5	208	178	-14%

Tableau 62 - Comparaison des coefficients de transpiration du pélargonium et du maïs

Le coefficient de transpiration des plantes traitées est inférieur de 7% à celui des plantes témoins pour les pélargoniums, confirmant les travaux antérieurs de Galy (2002) et de 14 à 28% pour le maïs. Ce phénomène pourrait une nouvelle fois être expliqué par la formation d'une gaine humique à la périphérie des racines qui limiterait la pénétration de l'eau. Ce résultat est nouveau et très important car jamais signalé dans la littérature. A une époque où l'eau constitue un facteur limitant en agriculture, l'application de SHB entraînerait donc une économie importante de l'eau utilisée par les plantes.

Cependant, l'analyse des données concernant l'utilisation de l'eau doit être réalisée avec prudence. En effet, d'après les nombreux résultats indiquant la précocité du développement des plantes traitées, les écarts observés sur la consommation et l'efficacité de l'eau peuvent également être interprétés différemment. En effet, en fin d'expérimentation, la différence de développement

existant entre les plantes témoins et les plantes traitées peut expliquer les variations de consommation et la diminution des coefficients de transpiration.

La teneur en eau des plantes varie selon l'espèce étudiée. Dans le cas du Pélargonium, elle est systématiquement supérieure pour les plantes traitées et explique les différences observées entre l'accroissement de poids frais et l'accroissement de poids sec.

La teneur en eau du maïs est le plus souvent inférieure à celle des plantes témoins et dépend probablement du stade de développement des plantes. En effet, à la fin de son cycle de développement, la plante se dessèche parallèlement à la maturation de l'épi. Selon le stade de récolte la teneur en eau du maïs sera donc différente.

- **Effets sur la nutrition minérale**

Selon les expérimentations, la consommation d'éléments minéraux est variable. Les résultats de notre étude montrent peu d'effets sur l'assimilation des macroéléments pour le pélargonium (§5.2.2.4) et le maïs (§5.3.2.4). En revanche les SHB augmentent l'absorption des micro-éléments comme le cuivre, le zinc ou le fer. Ces résultats confirment les observations effectuées par d'autres auteurs (Liu et al., 1998; Mackowiak et al., 2001). De plus, l'adsorption des molécules humiques à la surface des racines peut modifier la nutrition minérale (Galy, 2002).

Il est vraisemblable que les conditions de culture hors sol peuvent expliquer cette absence d'effets nets et précis sur les macroéléments. Les solutions nutritives, étant beaucoup plus concentrées que la solution du sol, les plantes se trouvent en surconsommation et l'analyse de leur nutrition minérale est plus difficile. Ribeiro (2000) montre que des concentrations trop élevées en éléments minéraux limitent le développement du pélargonium. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'apport de SH en trop grande quantité influe de manière négative sur la croissance des plantes.

Cette constatation est importante car beaucoup d'auteurs attribuent les effets favorables des SH à une amélioration de la disponibilité des ions et de la nutrition minérale en sol (Albuzio et al., 1986; Maggioni et al., 1987). Ils précisent que les effets des SH sur l'assimilation des éléments minéraux sont variables selon la concentration des SH et le pH du milieu (Nardi et al., 2002).

Plusieurs hypothèses sont évoquées pour expliquer l'amélioration de l'absorption des éléments minéraux (Chen and Aviad, 1990; Vaughan and Malcom, 1985a), impliquant les mécanismes de transport actif de la plante.

Les SH stimulent la synthèse des protéines de transport, aquaporines (Nardi et al., 2000) et la pénétration des fractions de faible poids moléculaire dans l'apoplaste (Vaughan and Ord, 1981) pourrait faciliter l'interaction SH-protéine et réguler l'absorption des ions (Nardi et al., 1991).

L'activation des ATPase-H⁺ membranaires a également été montrée par de nombreux auteurs (Canellas et al., 2002; Maggioni et al., 1987; Pinton et al., 1997). La stimulation des ATPase-H⁺ membranaires crée un gradient électrochimique de protons qui facilite la pénétration des nitrates (Pinton et al., 1999b)

Les natures acides et polyanioniques des SH, présentes à la surface des racines, diminuent le pH de la membrane plasmique et équilibrent l'alcalinisation du milieu qui apparaît suite à l'absorption des nitrates (Nardi et al., 1991). Les SH limitent ainsi l'inhibition des systèmes de transport symport. Ces actions sont fortement liées aux processus d'oxydoréduction présents sur la membrane plasmique (Pinton et al., 1995)

Enfin, la formation de chélates entre les SH et les cations à la surface des racines permet de réaliser la réduction nécessaire à la pénétration dans la plante de certains éléments comme le fer (Pinton et al., 1998; 1999a).

5.4.3 Effets des fractions humiques et fulviques

La comparaison des effets des SH et de leurs fractions séparées (AH et AF) sur la croissance des plantes est peu étudiée en raison de la difficulté d'obtenir une quantité suffisante de chaque produit pour réaliser des cultures de plantes entières. Le procédé de fabrication des SHB permet de passer outre cette contrainte technique et la séparation de fractions humiques et fulviques peut être réalisée sur plusieurs litres de SHB.

Les résultats obtenus montrent que les SHB complètes sont plus efficaces que l'utilisation de fractions séparées aussi bien sur le maïs que sur le pélargonium, la croissance des plantes est systématiquement augmentée par l'ajout de SHB. L'action simultanée des fractions humiques et fulviques est difficile à interpréter. Elle a cependant déjà été signalée sur la croissance d'algues unicellulaires (Lee and Bartlett, 1976).

L'effet des AF et AH sur le maïs est plus faible mais positif sur tous les paramètres de croissance et de développement étudiés (biomasse, consommation d'eau). La fraction fulvique génère de meilleurs résultats que la fraction humique.

Dans le cas du pélargonium, ces deux fractions n'influencent pas de manière positive la croissance des plantes mais agissent différemment sur leur croissance et leur développement. Ces effets spécifiques à chaque fraction se retrouve sur les deux plantes étudiées.

La fraction fulvique apparaît plus active et semble influencer principalement la floraison. En effet, sur le pélargonium comme sur le maïs, elle accélère la floraison et induit la formation d'un plus grand nombre de fleurs. Cette fraction favorise le développement des parties aériennes et reproductrices du pélargonium au détriment des racines. Les acides fulviques ont déjà été cités comme étant la fraction efficace des substances humiques (Nardi et al., 2002; Sladky, 1959). La structure et la taille de ces molécules permettent leur pénétration au sein des plantes (Vaughan and Ord, 1981) et laissent supposer une action directe sur le métabolisme des végétaux (Nardi et al., 2000).

Les acides humiques stimulent le développement des racines du pélargonium et favorisent l'adsorption de micro-éléments aux racines du maïs (Vaughan, 1974). De nombreux auteurs leur attribuent également une influence sur la perméabilité membranaire, facilitant le transfert des éléments minéraux (Pinton et al., 1999b; 1997).

6 CONCLUSION GENERALE

6.1 SYNTHÈSE DES RESULTATS OBTENUS

- **Approche originale**

L'approche utilisée dans ce travail pour décrire les substances humiques biomimétiques (SHB) et déterminer leurs effets agronomiques est originale.

La caractérisation des solutions produites à partir des constituants primaires du bois selon nos conditions expérimentales, a permis de définir plus précisément l'origine et la composition des SHB. La lignine et l'hémicellulose s'avèrent être les principaux précurseurs des molécules humiques. Elles forment respectivement des acides humiques et des acides fulviques.

Les expérimentations réalisées sur les végétaux permettent d'observer les effets des SHB sur un cycle de développement presque complet de deux plantes différentes (le pélargonium et le maïs), de la graine à la fleur. Le choix de ces plantes, différentes par leur intérêt agronomique et leur mode de développement a permis d'essayer de dégager des effets généraux des SHB sur les végétaux.

- **Efficacité du procédé**

Les résultats des caractérisations affirment le caractère homogène et reproductible des SHB. De plus, le transfert technologique réalisé lors de ce travail a permis la production d'une grande quantité de produits humiques bruts (plusieurs centaines de litres) assurant l'utilisation d'un seul et même produit pour l'ensemble des expérimentations végétales. Les expérimentations habituellement conduites avec des produits naturels permettent rarement de disposer de tels volumes. La maîtrise du procédé de fabrication a également permis la séparation de quantités importantes de fractions humiques et fulviques permettant la réalisation de plusieurs expériences sur plante entière.

- **Efficacité du produit**

Les résultats des expérimentations végétales montrent un effet plus marquant des acides fulviques que des acides humiques, même si la synergie des deux fractions semble plus efficace.

La forte proportion de cellulose dans les fibres du bois induit la formation des SHB, riches en acides fulviques, pouvant expliquer leurs effets positifs sur les plantes.

La chromatographie sur gel de séparation indique la présence de fractions fulviques de très faible poids moléculaire, inférieur à 1000 daltons, susceptible de pénétrer au sein des plantes et d'agir sur les métabolismes cellulaires.

Le pouvoir complexant des SHB est vraisemblablement à l'origine des teneurs en micro-éléments des racines. Cependant la localisation de ces éléments n'a été pu être précisée. La forte teinte noire des racines des plantes traitées confirme l'adsorption des SHB au niveau des racines et précise leur localisation extracellulaire. Cette agglomération pourrait être une source de stress à l'origine de l'effet de ramification induit par les SHB et pourrait expliquer l'augmentation de pH des solutions nutritives.

- **Analyse des résultats en fonction du développement des plantes**

La diversité des essais réalisés et le choix des plantes étudiées ont permis une nouvelle approche dans l'analyse des résultats. Celle-ci ne repose pas seulement sur la simple description des résultats bruts qui limitent et biaisent la vision globale des effets des SHB sur les végétaux, mais tient compte simultanément des facteurs de croissance et de développement des plantes. En effet, les plantes connaissent deux stades de développement distincts, assurant des fonctions différentes dans la maturité des végétaux. Le stade végétatif permet la croissance de la plante et assure la production d'énergie par le développement de nouveaux organes (feuilles, racines). Le stade reproductif induit la formation d'organes reproducteurs (fleurs) et de fruits assurant le renouvellement de l'espèce. Ces deux stades diffèrent, selon les plantes, par le moment de leur mise en place et par leur durée.

Dans le cas du pélagonium, plante vivace au feuillage persistant, le stade reproductif apparaît alors que le stade végétatif n'est pas terminé. Les résultats de notre étude traduisent la modification du métabolisme du pélagonium induite par la production de fleurs, ce qui explique la limitation du développement de la partie végétative au profit de la partie reproductrice.

Dans le cas du maïs, plante annuelle au feuillage caduque, le stade reproductif est amorcé à la fin du stade végétatif. La plante a atteint son maximum de biomasse et fournit l'énergie nécessaire au remplissage des grains avant de se dessécher. Les résultats de notre étude sur le maïs, montrent que les SHB accélèrent la phase végétative en permettant à la plante de produire un maximum de biomasse. A la récolte, les plantes traitées sont en phase de remplissage des grains de l'épi, les feuilles demeurent actives, la tige commence à sécher, alors que les plantes témoins n'ont pas atteint la phase de floraison mâle et femelle.

L'observation des cycles complets du développement indique un décalage dans les stades phénologiques des plantes traitées et témoins (figure 91).

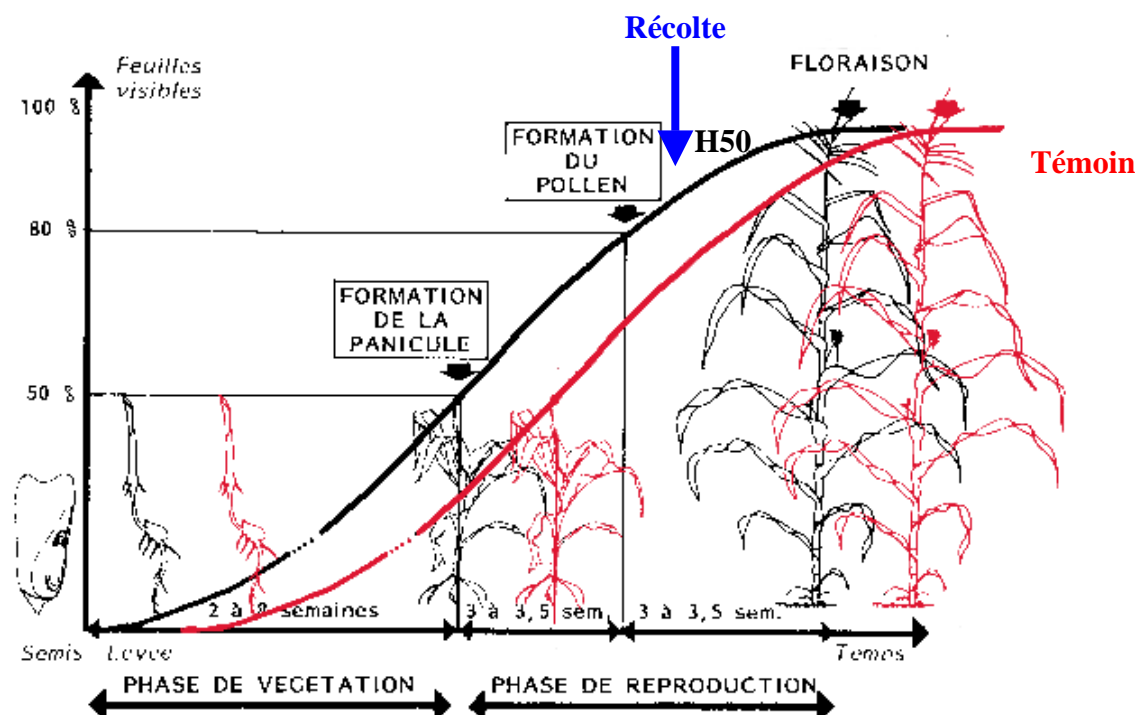


Figure 91 - Cycle de développement du maïs

Les SHB induisent une précocité et une accélération des phases végétatives et reproductives, conduisant inévitablement à l'accroissement positif de tous les paramètres de croissance mesurés. Ainsi, en fin de culture, la récolte simultanée des deux traitements nous conduit à comparer des plantes de développement différent. Ceci justifie les écarts conséquents observés entre les maïs traités et les maïs témoins mais ne permet pas de conclure sur les effets des SHB sur le rendement de biomasse des plantes ou leur consommation hydrique. L'accélération de la croissance des plantes traitées rappelle l'importance de la définition du jour de récolte. Les courbes représentées figure 91 précisent qu'une récolte précoce permet d'observer des différences entre les deux traitements et expliquent l'absence de résultats significatifs dans le cas d'une récolte tardive. Ce résultat est nouveau et n'a jamais été signalé dans la bibliographie.

Indépendamment des facteurs de développement, nos résultats montrent un effet positif des SHB sur la teneur en eau (plus élevée) des deux plantes étudiées et sur l'efficacité d'utilisation de l'eau du maïs (consommation d'eau plus faible pour une même quantité de matière sèche produite). De plus, la teneur en oligo-éléments (cuivre et zinc) est également augmentée pour les deux plantes.

Nos résultats confirment l'hétérogénéité des conclusions des études déjà réalisées sur l'effet des substances humiques sur les plantes. Ces variations de réponses peuvent provenir de l'origine des extraits humiques appliqués, de la nature des plantes étudiées ou des conditions expérimentales utilisées pour observer leurs effets.

L'utilisation de SHB reproductibles et homogènes limite ce facteur de variabilité mais confirme la difficulté d'obtenir des résultats homogènes d'une expérience à l'autre.

De plus, la nature des plantes étudiées montre aussi que même dans des conditions de culture similaires, les plantes répondent différemment aux SHB selon les espèces. Outre la variabilité génétique des espèces, les résultats nous incitent à considérer d'autres paramètres de variabilité tels que les conditions expérimentales pour expliquer les différences obtenues.

- **Hypothèses sur le mécanisme d'action des SHB**

L'application de SHB induit des effets positifs sur divers paramètres de croissance et de développement des végétaux comme l'élongation racinaire ou la floraison. Cependant les mécanismes d'action de ces différents effets restent inconnus. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer les effets positifs des SHB:

- la première concerne un effet de stimulation possible des mécanismes physiologiques du développement et de la croissance des plantes,
- la seconde hypothèse suggère que les SHB pourraient être perçues comme un stress auquel la plante réagirait en accélérant sa floraison et le développement de sa phase végétative.

Enfin, il est probable que les effets induits par les SHB résultent de la mise en jeu simultanée de ces mécanismes. Il est également possible que l'action des substances humiques soit modulée en fonction des conditions environnementales, l'évolution du milieu de culture modifiant les propriétés des molécules humiques.

6.2 PERSPECTIVES

Les expérimentations réalisées dans ce travail permettent d'établir des hypothèses sur les effets des SHB sur plantes entières. Pour préciser les mécanismes d'action des SHB trois types d'expérimentation pourraient poursuivre et compléter les résultats obtenus.

- **Caractérisations chimiques des SHB**

Dans le cadre de nos expérimentations, les effets des SHB sont fortement liés à leurs propriétés en solution. L'étude des paramètres physico-chimiques des SHB en solution permettrait de mieux définir l'évolution de leur structure et de leurs propriétés en fonction des modifications des conditions expérimentales.

Il serait intéressant d'étudier le comportement des SHB à pH acide (pH des solutions nutritives initiales) et d'observer si leurs propriétés sont modifiées lorsque le pH augmente (cas des solutions nutritives en cours de culture). Ces observations seraient à relier avec l'étude du pouvoir complexant des SHB qui augmente avec le pH et l'étude de la nutrition minérale.

De même, le pouvoir complexant des SHB vis-à-vis des cations présents dans la solution nutritive doit être étudié afin de déterminer la force de chaque complexe formé et tenter d'expliquer l'adsorption des différents cations au niveau racinaire.

Enfin, la purification et la caractérisation plus précise des acides humiques et fulviques pourraient préciser la taille et les propriétés des molécules présentes dans les SHB afin de déterminer des relations entre leur structure et leur activité. Cependant, l'étape de purification par dialyse est limitée (un seuil de coupure trop élevé) et d'importantes pertes de matière organique sont enregistrées. La mise au point d'un nouveau procédé de purification est donc nécessaire.

- **Approche biométrique**

L'approche biométrique réalisée dans cette étude est indispensable pour observer de manière générale les effets des SHB sur les plantes entières. Pour faciliter et améliorer ces études un certain nombre de critères et de précautions doivent être pris en compte tels que le choix de la plante, des conditions de culture, des paramètres observés et des mesures réalisées.

L'étude des SHB sur la germination des graines d'autres espèces est à poursuivre afin de déterminer si l'accélération de la germination s'observe aussi chez d'autres végétaux.

L'étude de plantes annuelles réalisant un cycle complet de développement permettrait de définir le temps de récolte de manière précise d'après les stades phénologiques ou les pratiques agricoles. La comparaison de plantes au développement similaire permettrait de conclure sur l'effet des SHB sur les rendements de biomasse ou de grain. De plus, la mise en place systématique d'une étude cinétique des paramètres observés (hauteur, longueur des racines, biomasse, stades phénologiques) permettrait de représenter les cycles de développement de plantes afin de confirmer le décalage observé dans ces cycles et la précocité induite par les SHB.

En relation avec une meilleure caractérisation de ces fractions, l'utilisation des acides humiques et fulviques doit être poursuivie pour préciser leur rôle respectif dans la stimulation des plantes.

Enfin, très peu d'études s'intéressent aux effets des SH sur la croissance des plantes en conditions de stress. La technique de culture hors sol permet de contrôler la nutrition minérale et hydrique des plantes par l'emploi de solution nutritive. Néanmoins, leur forte concentration en éléments minéraux ne reflète pas les conditions naturelles et induit vraisemblablement une accélération du cycle de développement des plantes telles que le maïs. Les conditions de culture trop favorables favorisent la croissance des plantes et peuvent ainsi limiter l'observation des effets des SHB.

La mise en place de conditions de cultures non optimales (solution nutritive diluée) permettrait de mieux d'étudier la résistance des plantes traitées aux changements environnementaux en présence de substances humiques.

- **Approche biochimique**

Suite aux hypothèses établies dans l'approche biométrique, différentes expérimentations pourraient être réalisées pour préciser le mode d'action des SHB. Cette approche fait appel aux techniques de biochimie et de biologie moléculaire. Réalisée sur des cultures cellulaires ou des jeunes plantes, ces méthodes donnent rapidement les résultats qui devront être confirmés sur plantes entières.

Dans un premier temps, la pénétration des fractions fulviques de faible poids moléculaires pourrait être étudiée via l'analyse de la sève des plantes traitées par HPLC-MS ou l'utilisation de techniques de marquage fluorescent. L'objectif serait de préciser si les SHb sont absorbées et migrent à l'intérieur des végétaux.

Les effets des SHB sur le métabolisme cellulaire, pourraient être étudiés au niveau de l'activité enzymatique ou de la synthèse protéique. Le dosage des enzymes du stress oxydatif permettrait d'établir si les plantes perçoivent les SHB comme un stress.

Enfin, l'étude des ratios hormonaux et le dosage plus particulier des auxines et des cytokinines peuvent également préciser les hypothèses émises sur l'action « hormone-like » des SHB.

- **Applications**

Les recherches entreprises sur les substances humiques prévoient de nombreuses applications aussi bien dans le domaine de l'agronomie comme fertilisant organique (Mayhew, 2004) que dans le domaine de la médecine pour leurs propriétés anti-inflammatoires (Cromarty and Van

Rensburg, 2004; Klöcking et al., 2004). De nombreux produits agricoles à base d'extraits humiques sont actuellement disponibles sur les marchés européen (Naturevital® Daymsa ; liqhumus® Humitech) et américain (Uptake® Agrachem). Cependant, l'intérêt croissant pour l'utilisation des substances humiques comme fertilisant organique soulève quelques interrogations sur la qualité des substances humiques commercialisées qui diffère d'un produit à l'autre (Malcolm and MacCarthy, 1986). Pour clarifier et préciser l'utilisation commerciale des substances humiques, une meilleure définition des produits et de leurs effets est nécessaire (Jackson et al., 2002). Pour ce faire, une classification des matériaux humiques a déjà été établie afin de comparer les résultats des différentes études (MacCarthy, 1976).

Dans le cadre de notre étude, l'homogénéité et la reproductibilité du SHB permettent d'affirmer les effets observés sur les végétaux.

Les effets positifs des SHB observés sur les plantes à fleurs en cultures hydroponiques confirme l'intérêt d'utiliser ce produit comme bio stimulant dans les domaines horticoles où ces techniques de cultures sont largement employées.

Les résultats obtenus sur le maïs en condition de culture hors-sol ne sont pas directement extrapolables en agriculture, le mode d'application des SHB en champ doit être mieux défini (application au semis ou pulvérisation foliaire) et l'efficacité agronomique au niveau des rendements grain reste à démontrer. L'utilisation des effets bio stimulants de ce produit pourrait être intéressant sur la germination et le développement des jeunes pousses. L'effet des SHB sur l'économie d'eau pourrait également se révéler d'un grand intérêt compte tenu de l'importance croissante des cultures irriguées dans les pays où l'agriculture est intensive.

7 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR (1994). Qualité des sols.

Alberts, J. J. and Z. Filip (1998). "Metal binding in estuarine humic and fulvic acids : FTIR analysis of humic acid-metal complexes." Environmental Technology **19**: 923-931.

Albuzio, A., G. Ferrari and S. Nardi (1986). "Effect of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings." Can. J. Soil Sci. **66**: 731-736.

Albuzio, A., S. Nardi and A. Gulli (1989). "Plant growth regulator activity of small molecular size humic fractions." The Science of The Total Environment **81-82**: 671-674.

Almendros, G. and J. Sanz (1992). "A structural study of alkyl polymers in soil after perborate degradation of humin." Geoderma **53**(1-2): 79-95.

Andreux, F. and C. Munier-Lamy (1994). "Génèse et propriétés des substances humiques." Pédologie **VI**: 109-134.

Ayuso, M., T. Hernandez, C. Garcia and J. A. Pascual (1996). "Stimulation of Barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials." Bioresource Technology **57**: 251-257.

Bailly, J.-R. (1985). Sur la structure des substances humiques et le rôle des microorganismes dans leur formation. Toulouse, Université Paul Sabatier: 392.

Balesdent, J. (1996). "Un point sur l'évolution des réserves organiques des sols de France." Etude et Gestion des sols **3**(4): 245-260.

Barancikova, G., N. Senesi and G. Brunetti (1997). "Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types." Geoderma **78**(3-4): 251-266.

Bauduin, M., E. Delcarte and R. Impens (1986). Impact des composts urbains sur les teneurs en Zn et en Cu des tissus végétaux. In Deuxième Symposium International sur le rôle des oligoéléments en Agriculture. P. Morard. Toulouse: 441-449.

Blasej, A. and M. Kosik (1985). Degradation reactions of cellulose and lignocellulose. In Cellulose and its derivatives : chemistry, biochemistry and applications. P. G. O. Kennedy J. F., Wedlock D. J. et Williams P. A. eds, John Wiley and sons: 548.

Bottomley, W. B. (1917). "Some effects of organic-promotion substances (auximones) on the growth of Lema minor in mineral cultural solutions." Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci **89**: 481-505.

Brun, G. (1993). Pouvoir complexant des matières humiques. effets sur l'alimentation minérales des végétaux. Toulouse, Institut National Polytechnique: 148.

Buffle, J. (1988). Complexation Reactions in Aquatic Systems: An Analytical Approach. ChichesterUK, Ellis Horwood Ltd.

7 - Références bibliographiques

- Cacco, G. and G. Dell'agnolla (1984). "Plant growth regulator activity of soluble humic substances complexes." Can. J. Soil Sci. **64**: 225-228.
- Canellas, L. P., F. L. Olivares, A. I. Okorokovha-Façanha and A. R. Façanha (2002). "Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize root." Plant Physiol. **130**: 1951-1957.
- Cang Sun, R., J. M. Fang and J. Tomkinson (2000). "Delignification of rye straw using hydrogen peroxyde." Industrial Crops and Products **12**: 71-83.
- Chen, Y. and T. Aviad (1990). Effects of Humic Substance on Plant Growth. In Humic Substances in soil and Crop Sciences: Selected Readings. a. P. R. B. e. R.L. Malcolm. Madison, Wisconsin, Soil Sci. Society of America: 161-186.
- Chen, Y., N. Senesi and M. Schnitzer (1977). "Information provided on humic substances by E4/E6 ratios." Soil Sci. Soc. Am. J. **41**: 352-358.
- Cooper, R. J., C. Liu and Fischer D.S. (1998). "Influence of humic substances on rooting and nutrient content of creeping bentgrass." Crop Science. **38**(6): 1639-1644.
- Cromarty, A. D. and C. E. J. Van Rensburg (2004). Humic acids as anti-inflammatory agents. 12th International Humic Substances Society Conference, Sao Pedro (Bresil).
- David, P. P., P. V. Nelson and D. C. Sanders (1994). "A humic acid improves growth of tomato seedling in solution culture." Journal of Plant Nutrition. **17**(1): 173-184.
- De Kreij, C. (1995). "Effect of humic substances in nutrient film technique on nutrient uptake." Journal of Plant Nutrition **18**(4): 793-802.
- Fagbenro, J. A. and A. A. Agboola (1993). "Effect of different levels of humic acid on the growth and nutrient uptake of teak seedlings." Journal of Plant Nutrition **16**(8): 1465-1483.
- Fernandez-Escobar, R., M. Benlloch, D. Barranco, A. Duenas and J. A. Guterrez Ganán (1996). "*Response of olive trees to foliar application of humic substances extracted from leonardite.*" Scientia Horticulturae. **66**: 191-200.
- Flaig, W. (1964). "Effects of micro-organisms in the transformation of lignin to humic substances." Geochim. Cosmochim. Acta **28**: 1523-1535.
- Flaig, W. (1988). Generation of model chemical precursors. In Humic Substances and their role in the environment. F. F. H. a. C. R. F, Dahlem: 75-92.
- Frankenberger, W. T. and M. Arshad (1995). Phytohormones in soils. New York, Marcel Dekker.
- Galy, C. (2000). Influence of humic substances on growth and flowering of the pelargonium x hortorum. 10th International Humic Substances Society Conference, Toulouse (France).
- Galy, C. (2002). Influences de l'ajout de substances humiques-like dans des solutions fertilisantes sur des cultures de Pélargonium x Hortorum. Toulouse, Institut National Polytechnique: 107.

7 - Références bibliographiques

Garves, K. (1985). Degradation reactions of cellulose in various aqueous bases. In Cellulose and its derivatives : chemistry, biochemistry and applications. P. G. O. Kennedy J. F., Wedlock D. J. et Williams P. A. eds, John Wiley and sons: 548.

Gauthier, F., S. Gagnon and B. Dansereau (1997). "Incorporation de résidus organiques dans un substrats tourbeux pour la production d'impatiens et de géraniums." Canadian journal of plant science **78**: 131-138.

Hartwigsen, J. A. and M. R. Evans (2000). "Humic acids seed and substrate treatments promote seedling root development." Hort Science. **35**(7): 1231-1233.

Jackson, W. R., J. K. Zapico, R. J. Jackson, L. M. DeVaney and E. G. Hall (2002). From humic substances academia to the needs of international commerce. 11th International Humic Substances Society Conference, Boston, MA (USA).

Joseleau, J. P. (1980). Les hémicelluloses. In Les polymères végétaux. M. B. ed, Gauthier-Villars: 269.

Kaiser, K., G. Guggenberger, L. Haumaier and W. Zech (1997). "Dissolved organic matter sorption on subsoils and minerals studied by C13-NMR and drift spectroscopy." European Journal of Soil Science **48**: 301-310.

Klöcking, R., K. S. and H.-P. Klöcking (2004). Investigations on the UV-B protection effect of humic acids and humic acid like polymers. 12th International Humic Substances Society Conference, Sao Pedro (Bresil).

Kononova, M. (1966). Soil organic matter, Oxford.

Lawson, G. J. and D. Stewart (1989). Coal humic acids. In Humic Substances II: In Search of Structure. M. H. B. Hayes, MacCarthy, P., Malcolm, R. L., Swift, R. S., Eds. New York, Wiley-Interscience: 641.

Lebuhn, M. and A. Hartmann (1993). "Method for determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils." Journal of chromatography B **629**: 255-266.

Lee, Y. S. and R. J. Bartlett (1976). "Stimulation of plant growth by humic substances." Soil Sci. Soc. Am. J. **40**.

Liu, C., R. J. Cooper and D. C. Bowm (1998). "Humic acid application affects photosynthesis, root development, and nutrient content of creeping bentgrass." Hort Science. **33**(6): 1023-1025.

Lulakis, M. D. and S. I. Petsas (1995). "Effect of humic substances from vine-canecan mature compost on tomato seedling growth." Bioresource Technology. **54**: 179-182.

Mac Carthy, P. (1976). "A proposal to establish a reference collection of humic materials for interlaboratory comparisons." Geoderma **16**: 179-181.

MacCarthy, P., Clapp C.E., Malcom R.L. and and Bloom P.R. (1990). Humic substances in soil and crop sciences: Selected readings. Madison, Wisconsin, Soil Sci. Society of America.

7 - Références bibliographiques

- Mackowiak, C. L., P. R. Grossi and B. G. Bugbee (2001). "Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat." Soil Sci. Soc. Am. J. **65**(6): 1744-1750.
- Maggioni, A., Z. Varanini, S. Nardi and R. Pinton (1987). "Action of soil humic matter on plant roots: Stimulation of ion uptake and effects on (Mg²⁺ K⁺) ATPase activity." The Science of the Total Environment. **62**: 355-363.
- Malcolm, R. E. and P. MacCarthy (1986). "Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research." Environ. Sci. Technol. **20**(9): 904 - 911.
- Malcolm, R. E. and D. Vaughan (1979a). "Effects of humic acid fractions on invertase activities in plant tissues." Soil Biology and Biochemistry **11**(1): 65-72.
- Malcolm, R. E. and D. Vaughan (1979b). "Humic substances and phosphatase activities in plant tissues." Soil Biology and Biochemistry **11**(3): 253-259.
- Mato, M. C., L. M. Gonzalez-Alonso and J. Mendez (1972a). "Inhibition of enzymatic indoleacetic acid oxidation by soil fulvic acids." Soil Biology and Biochemistry **4**(4): 475-478.
- Mato, M. C., M. G. Olmedo and J. Mendez (1972b). "Inhibition of indoleacetic acid-oxidase by soil humic acids fractionated on sephadex." Soil Biology and Biochemistry **4**(4): 469-473.
- Mayhew, L. (2004). Humic substances in biological agriculture. Acres-USA. **34**.
- Merlo, L., R. Gisi, N. Rascio and C. Passera (1991). "Effects of humic substances on carbohydrate metabolism of maize leaves." Can. J. Soil Sci. **71**: 419-425.
- Morard, P. (1973). Contribution à l'étude de la nutrition potassique du sorgho grain. Toulouse, Université Paul Sabatier: 197p.
- Morard, P. (1995). Les cultures végétales hors-sol. Agen, Publications agricoles.
- Morard, P., B. Eyheraguibel and J. Silvestre (2003). Influence des substances humiques sur la croissance et la floraison du bégonia. La matière organique naturelle, 5ème colloque du groupe français de l'International Humic Substances Society, Clermont-ferrand.
- Muscolo, A., F. Bovalo, F. Gionfriddo and S. Nardi (1999a). "Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism." Soil Biology and Biochemistry **31**(9): 1303-1311.
- Muscolo, A., S. Cutrupi and S. Nardi (1998). "IAA detection in humic substances." Soil Biology and Biochemistry **30**(8-9): 1199-1201.
- Muscolo, A., M. R. Panuccio and S. Nardi (1999b). "Effect of two different humic substances on seed germination of *Pinus Iaricio*." Seed Science and Technology. **27**(2): 799-803.
- Mylonas, V. A. and C. B. McCants (1980). "Effects of humic and fulvic acids on growth of Tobacco." Plant and Soil. **54**: 485-490.

7 - Références bibliographiques

- Nardi, S., G. Arnoldi and G. Dell'Agnola (1988). "Release of the hormone-like activities from *Allolobophora rosea* (Sav.) and *Allolobophora caliginosa* (Sav.) feces." Can. J. Soil Sci. **68**: 563-567.
- Nardi, S., G. Concheri, G. Dell'Agnola and P. Scrimin (1991). "Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions." Soil Biology and Biochemistry **23**(9): 833-836.
- Nardi, S., M. R. Panuccio, M. R. Abenavoli and A. Muscolo (1994). "Auxin-like effect of humic substances extracted from faeces of *Allolobophora Calignosa* and *A. Rosea*." Soil Biol. Biochem. **26**(10): 1341-1346.
- Nardi, S., D. Pizzeghello, C. Gessa, L. Ferrarese, L. Trainotti and G. Casadoro (2000). "A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings." Soil Biology and Biochemistry **32**(3): 415-419.
- Nardi, S., D. Pizzeghello, A. Muscolo and A. Vianello (2002). "Physiological effects of humic substances on higher plants." Soil Biology and Biochemistry **34**(11): 1527-1536.
- Neyroud, J. A. and M. Schnitzer (1975). "The alkaline hydrolysis of humic substances." Geoderma **13**: 171-188.
- Nimz, H. (1974). "Beech lignins : proposal of a constitutional scheme." Angew. Chem. Int. Ed **13**: 313-321.
- O'Donnell, R. W. (1972). "The auxin-like effects of humic preparations from leonardite." Soil Science **116**(2): 106-112.
- Ogner, G. and M. Schnitzer (1970). "Humic substances: fulvic acid-dialkyl phthalate complexes and their role in pollution." Science of The Total Environment **170**: 317- 318.
- Pal, S. (1992). "Nature and properties of soil humic acid as influenced by incorporation of different plant materials." Plant and Soil **16**: 11-15.
- Patt, R. and O. Kordsachia (1991). Paper and pulp. In Ullman's encyclopedia of industrial chemistry, Weinheim, WCH: 542-605.
- Pflug, W. and W. Ziechmann (1981). "Inhibition of malate dehydrogenase by humic acids." Soil Biology and Biochemistry **13**(4): 293-299.
- Piccolo, A. (1993). Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Amsterdam, Elsevier.
- Piccolo, A., G. Celano and G. Pietramellara (1993). "Effects of fractions of coal-derived humic substances on seed germination and growth of seedlings (*Lactuga sativa* and *Lycopersicum esculentum*)." Biol. Fertil. Soils. **16**: 11-15.
- Piccolo, A., S. Nardi and G. Concheri (1992). "Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems." Soil Biology and Biochemistry **24**(4): 373-380.

7 - Références bibliographiques

- Pinton, R., S. Cesco, M. De Nobili, S. Santi and Z. Varanini (1998). "Water and pyrophosphate-extractable humic substances fractions as source of iron for Fe-deficient cucumber plants." Bio Fertil Soil **26**: 23-27.
- Pinton, R., S. Cesco, M. De Nobili, S. Santi and Z. Varanini (1999a). "Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants." Plant and Soil **210**: 145-157.
- Pinton, R., S. Cesco, G. Lacoletig, S. Astolfi and Z. Varanini (1999b). "Modulation of NO_3^- uptake by water-extractable humic substances: Involvement of root plasma membranes H^+ ATPase." Plant and Soil. **215**(2): 155-161.
- Pinton, R., S. Cesco, S. Santi and Z. Varanini (1995). "Effect of soil humic substances on surface redox activity of oat roots." Journal of Plant Nutrition **18**(10): 2111-2120.
- Pinton, R., S. Cesco, S. Santi and Z. Varanini (1997). "Soil humic substances stimulate proton release by intact oat seedlings roots." Journal of Plant Nutrition **20**(7-8): 857-869.
- Pizzeghello, D., G. Nicolini and S. Nardi (2001). "Hormone-like activity of humic substances in Fagus sylvaticae forests." New Physiologist **151**(3): 647-657.
- Prat, L. (1998). Modélisation d'un réacteur thermo-mécano-chimique bi-vis utilisé en fractionnement de la matière végétale. Toulouse, Institut National Polytechnique: 208.
- Rauthan, B. S. and M. Schnitzer (1981). "Effects of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (cucumis sativus) plants." Plant and Soil. **63**: 491-495.
- Revel, J.-C., P. Morard, Bailly J-R., Labbe H., B. C. and K. M. (1999). "Plants' use of leachate derived from municipal solid waste." Journal of environmental quality **28**(4): 1083-1089.
- Ribeiro, H. M., E. Vasconcelos and J. Q. Dos Santos (2000). "Fertilisation of potted geranium with a municipal solid waste compost." Bioresource Technology. **73**: 247-249.
- Richard, J. F. (2002). Caractérisation de substances humiques-like, comparaison avec des substances humiques naturelles. Toulouse, Institut National Polytechnique: 156.
- Rodriguez, J., O. Faix and H. Pereira (1998). "Determination of lignin content of Eucalyptus globulus wood using FTIR spectroscopy." Holzforschung **52**: 46-50.
- Saunier, L. J. (1994). Fractionnement de liqueurs noires de procédés papetiers alcalins à partir de pailles de céréales. Extraction et caractérisation de lignines. Toulouse, Institut National Polytechnique: 195.
- Schnitzer, M. and S. U. Khan (1972). Humic substances in the Environment. Newyork, Marcel Dekker.
- Schnitzer, M. and S. U. Khan (1978). Soil organic matter. New York, Elsevier Scientific Publ.
- Senesi, N. and G. Brunetti (1996). Chemical and Physico-chemical Parameters for Quality Evaluation of Humic Substances Produced during Composting. In The Science of Composting, European Commission

7 - Références bibliographiques

International Symposium. B. L. a. T. P. E. Sequi. Glasgow, Blackie Academic & Professional: 195-212.

Sessi, E., D. Pizzeghello, F. Reniero, M. Tomasi, C. De Siena, G. Nicolini and S. Nardi (2001). "Effect of humic substances extracted from pasture and forest soils on plant metabolism." Fresenius Environmental Bulletin **10**(2): 217-220.

Sladky, Z. (1959). "The effect of extracted humus substances on growth of tomato plants." Biologia Plantarum **1**(2): 142-150.

Stevenson, F. J. (1982). Humus Chemistry. New York, Wiley.

Stevenson, F. J. (1985). Geochemistry of soil humic substances. In Humic substances in soil, sediment and water. D. M. M. K. Aiken, R.L. Wershaw and P. Mac Carthy. New York, Wiley-Interscience: 13-52.

Stevenson, F. J. and M. M. Cole (1999). Cycle of soil. New York, John Wiley and sons Inc.

Stott, D. E. and J. P. Martin (1990). Synthesis and degradation of natural and synthetic humus material. In Humic substances in soil and crop sciences: Selected readings. C. E. C. MacCarthy, R.L. Malcolm, and P.R. Bloom (ed.). Madison, WI, Soil Science Society of Agronomy.

Tan, K. H. and V. Nopamornbodi (1979). "Effect of different levels of humic acids on nutrient content and growth of corn (*Zea Mays* L.)." Plant and Soil. **51**: 283-287.

Tejada, M. and J. L. Gonzalez (2004). "Effects of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on rice yield." European Journal of Agronomy SU - **21**(1): 31-40.

Tissaux, J.-C. (1996). Une revue bibliographique des principaux mécanismes pédogénétiques pour caractériser le rôle du bois raméal fragmentés (BRF) dans le processus d'humification, Université Laval-Groupe de Coordination sur les Bois Raméaux: 34 p.

Van Soest, P. J. and R. H. Wine (1968). "Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate." J. Ass. Official Agr. Chem. J. **51**: 780-785.

Vaughan, D. (1974). "A possible mechanism for humic acid action on cell elongation in root segment of *Pisum sativum* under aseptic conditions." Soil Biol. Biochem. **6**: 241-247.

Vaughan, D. and D. J. Linehan (1976). "The growth of wheat plants in humic acid solutions under axenic conditions." Plant and Soil. **44**: 445-449.

Vaughan, D. and R. E. Malcolm (1979). "Effect of humic acid on invertase synthesis in roots of higher plants." Soil Biology and Biochemistry **11**(3): 247-252.

Vaughan, D. and R. E. Malcom (1985a). Soil organic matter and biological activity. Boston, Dordrecht.

Vaughan, D. and R. E. Malcom (1985b). Influence of humic substances on growth and physiological processes. In Soil organic matter and biological activity. M. R. E. Vaughan D., eds. Boston, Dordrecht: 37-75.

7 - Références bibliographiques

Vaughan, D. and B. G. Ord (1981). "Uptake and incorporation of ^{14}C -labelled soil organic matter by roots of *Pisum sativum* (L.)." J. Exp. Bot. **32**: 679-688.

Vaughan, D. and B. G. Ord (1985). Soil organic matter : a perspective on its nature, extraction, turnover and role in soil fertility. In Soil organic matter and biological activity. E. M. D. Vaughan and R. E. Malcom: 1-36.

Waksman, S. A. (1932). Principles of Soil Microbiology. Baltimore, Williams & Wilkins Co.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Composition élémentaire des substances humiques en % (Stevenson, 1982)	23
Tableau 2 - Caractéristiques des substances humiques (Stevenson and Cole, 1999)	24
Tableau 3 - Caractéristiques chimiques de la sciure de peuplier (en % de m. s.)	42
Tableau 4 - Composition et codes des échantillons transformés.	43
Tableau 5 - Plan expérimental des analyses effectuées.....	45
Tableau 6 - Conditions climatiques sous serre.....	58
Tableau 7 - Concentration en macroéléments des solutions nutritives (meq.L ⁻¹).....	58
Tableau 8 - Concentration en oligo-éléments des solutions nutritives (mg.L ⁻¹).....	59
Tableau 9 - Caractérisation des substances humiques et apport de potassium pour une solution humique à 50 mg de carbone par litre.	59
Tableau 10 - Formulation d'une SN additionnée de SHB	60
Tableau 11 - Réajustement des solutions additionnées de SHB (meq/L)	60
Tableau 12 - Mesures et analyses des essais	65
Tableau 13 - Plan expérimental n°1	67
Tableau 14 - Plan expérimental n°2	68
Tableau 15 - Plan expérimental n°3	68
Tableau 16 - Plan expérimental n°4	69
Tableau 17 - Plan expérimental n°5	69
Tableau 18 - Plan expérimental n°6	70
Tableau 19 - Plan expérimental n°7	70
Tableau 20 - Plan expérimental n°8	70
Tableau 21 - Plan expérimental n°9	71
Tableau 22 - Teneur en carbone organique et pourcentage d'acides humiques et fulviques.....	74
Tableau 23 - Estimation des valeurs théoriques de carbone, d'acides humiques et d'acides fulviques des SH du mélange	75
Tableau 24 - pH et teneur en éléments minéraux des solutions de SHB	75
Tableau 25 - Ratios E ₄ /E ₆ et teneur en acide humiques et fulviques des SHB	81
Tableau 26 - Estimation du poids moléculaire des SHB en fonction du Kav.....	82
Tableau 27 - Bandes d'absorption (en cm ⁻¹), et vibrateurs associés, des solutions de SHB.....	86
Tableau 28 - Poids sec final des résidus.....	93
Tableau 29 - Variation de la quantité de glucides membranaires entre la sciure brute et le résidu de production (en % de matière sèche)	95
Tableau 30 - Conditions expérimentales du lavage des résidus de sciure	97
Tableau 31- Rendement du procédé.....	101
Tableau 32 - Rendement massique du procédé.....	103
Tableau 33 – Teneur en eau des organes et des plantes entières (%).....	113
Tableau 34 - Nombre moyen de feuilles par plante	114
Tableau 35 - Nombre moyen de fleurs par plante.....	115
Tableau 36 - Longueur des racines	115
Tableau 37 – Concentration finale en éléments minéraux des solutions nutritives (mg.L ⁻¹).....	119
Tableau 38 - Concentration finale en oligo-éléments des solutions nutritives (en ppm).....	120
Tableau 39 - Teneur en eau des plantes et des organes (%).....	124
Tableau 40 - Nombre moyen de feuilles produites par plante	125
Tableau 41 - Nombre moyen de fleurs produites par plante	125
Tableau 42 - Longueur des racines	126
Tableau 43 - Teneur en macroéléments des organes (%).....	130
Tableau 44 - Consommation totale (g) et teneurs moyennes (%)	130
Tableau 45 -Teneur en micro-éléments des organes (ppm)	131
Tableau 46 - Consommation totale (mg) et teneurs moyennes (%).....	131

Tableau 47 - Répartition de la matière sèche et de l'eau (%)	135
Tableau 48 - Nombre de feuilles et de fleurs	136
Tableau 49 - Stimulation de la production de matière fraîche et de matière sèche par rapport au témoin.....	142
Tableau 50-Répartition de l'eau et de la matière sèche (%)	143
Tableau 51 - Nombre de feuilles et de fleurs	143
Tableau 52 - Concentration en macro éléments des solutions nutritives en fin de culture (g.L ⁻¹)	146
Tableau 53 - Concentration en micro éléments des solutions nutritives en fin de culture (ppm).	147
Tableau 54 - Teneur en macroéléments des organes (%).....	147
Tableau 55 - Consommation totale (g) et teneurs moyennes (%)	148
Tableau 56 - Teneur en micro-éléments des organes (ppm)	148
Tableau 57 - Consommation totale (g) et teneurs moyennes (%)	149
Tableau 58 - Répartition de la matière sèche et de l'eau (%)	152
Tableau 59 - Nombre de feuilles et de fleurs	153
Tableau 60 - Teneur en micro-éléments des organes (ppm)	156
Tableau 61 - Consommation totale (mg) et teneurs moyennes (ppm)	156
Tableau 62 - Comparaison des coefficients de transpiration du pélagonium et du maïs.....	167

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Distribution de la matière organique des sols.....	13
Figure 2 - Dynamique du carbone dans le sol (d'après Balesdent, 1996).....	14
Figure 3 - Mécanismes de formation des substances humiques du sol (d'après Stevenson, 1982) ..	16
Figure 4 - Structure schématique de lignine de hêtre (Nimz, 1974)	17
Figure 5 - Structure de la cellulose.....	18
Figure 6 - Structure de l'hémicellulose	18
Figure 7 - Fractionnement des substances humiques	22
Figure 8 - Modèle d'un acide humique	25
Figure 9 - Modèle d'un acide fulvique.....	25
Figure 10 - Monomère constitutif des substances humiques (d'après Schnitzer, 1972).....	26
Figure 11 - Modèle de structure des composés humiques (Andreux and Munier-Lamy, 1994).....	26
Figure 12 - Schéma possible de la structure des substances humiques biomimétiques.....	27
Figure 13 - Facteurs influençant la réponse des plantes aux substances humiques	30
Figure 14 - Impacts des SH sur le métabolisme cellulaire des plantes (d'après Vaughan, 1985) ..	35
Figure 15 : Schématisation du procédé de fabrication	40
Figure 16 : Principe de la chromatographie d'exclusion.....	51
Figure 17 - Plan expérimental et récapitulatif des analyses réalisées	54
Figure 18 – <i>Pélarгонium x hortorum</i>	56
Figure 19 – Germination et culture de maïs.....	56
Figure 20 – Dispositif de culture.....	57
Figure 21 – Chronologie d'une culture végétale.....	61
Figure 22 – Stade de récolte des bouquets floraux.....	63
Figure 23 - Variations conductimétriques au cours des complexation calcium-EDTA et calcium-SHB à pH variable.....	77
Figure 24 - Variations conductimétriques au cours de la complexation du calcium par l'EDTA à pH constant.....	77
Figure 25 - Propriétés chimiques des substances humiques (Stevenson, 1982)	80
Figure 26 - Couleur des SHB	80
Figure 27 - Fractionnement des solutions de SHB sur Sephadex G25	83
Figure 28 – Spectres infrarouges des constituants primaires et des solutions de SHB dialysées ...	88
Figure 29 - Observation des SHB en microscopie électronique à balayage	90
Figure 30 - Les différentes étapes de la transformation du bois	92
Figure 31 - Les composés primaires du bois et leur résidus de production	92
Figure 32 - Répartition des composants primaires de la sciure brute, torréfiée et du résidu	94
Figure 33 - Observation de la sciure et du résidu en microscopie électronique à balayage.....	96
Figure 34 - Evolution de la couleur de la sciure	97
Figure 35 - Evolution de la concentration en carbone des SH autoclavées et non autoclavées en fonction du temps de lavage.....	98
Figure 36- Evolution de la concentration en carbone des SH autoclavées et non autoclavées en fonction du nombre de lavage	98
Figure 37 - Evolution du ratio E_4/E_6 des SH autoclavées et non autoclavées en fonction du temps de lavage.....	99
Figure 38 - Evolution de la concentration en potassium (K) des SH autoclavées et non autoclavées en fonction du nombre de lavage	100
Figure 39 - Répartition du poids sec et du carbone des les produits finaux.....	103
Figure 40 – Transformation des constituants primaires du bois	105
Figure 41 - Composition des SHB	106
Figure 42 – Composition des acides humiques et fulviques	106

Figure 43 - Evolution du poids frais des plantes en cours de culture.....	111
Figure 44 - Répartition du poids frais en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin).....	111
Figure 45 - Répartition du poids sec en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin).....	112
Figure 46 - Répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes	114
Figure 47 - Système racinaire de plantes témoins et traitées en fin de culture.....	116
Figure 48 - Effet des SHB sur la ramification du système racinaire	117
Figure 49 - Croissance relative des parties aériennes et racinaires	117
Figure 50 - Evolution du pH (a) et de la conductivité (b) des solutions nutritives	118
Figure 51 - Consommation d'eau (a) et efficience de l'eau (b)	118
Figure 52 - Evolution du poids frais des plantes en cours de culture.....	122
Figure 53 - Répartition du poids frais en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin).....	123
Figure 54 - Répartition du poids sec en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin)	123
Figure 55 - Répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes	124
Figure 56 - Pourcentage de plantes fleuries (a) et cinétique d'apparition du nombre de fleurs (b)	126
Figure 57 - Racines de plantes témoins et traitées en fin de culture	126
Figure 58 - Effet des SHB sur la ramification du système racinaire.....	127
Figure 59 - Croissance relative des parties aériennes et racinaires	127
Figure 60 - Croissance relative des parties végétatives et reproductrices.....	128
Figure 61 - Evolution du pH (a) et de la conductivité (b) des solutions nutritive	128
Figure 62 - Consommation d'eau (a) et efficience de l'eau (b)	129
Figure 63 - Répartition du poids frais en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin).....	134
Figure 64 - Répartition du poids sec en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (% par rapport au témoin)	135
Figure 65 - Répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes	136
Figure 66 - Anatomie du maïs.....	137
Figure 67 - Longueur des racines et de la partie aérienne.....	137
Figure 68 - Effet des SHB sur la ramification du système racinaire.....	138
Figure 69 - Croissance relative des parties aériennes et racinaires	138
Figure 70 - Evolution du pH (a) et de la conductivité (b) des solutions nutritives	139
Figure 71 - Consommation d'eau (a) et efficience de l'eau (b)	140
Figure 72 - Répartition du poids frais (a) et du poids sec (b) en fonction des organes.....	141
Figure 73 - Répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes	142
Figure 74 - Hauteur des plantes et longueur du système racinaire.....	144
Figure 75 - Effet des SHB sur la ramification du système racinaire.....	144
Figure 76 - Structure des racines secondaires fonction du poids frais	145
Figure 77 - Evolution du pH et de la conductivité des solutions.....	145
Figure 78 - Consommation et efficience de l'eau	146
Figure 79 - Répartition du poids frais en fonction des organes (a) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (par rapport au témoin)	151
Figure 80 - Répartition du poids sec en fonction des organes (b) et stimulation de la croissance des organes et des plantes entières (b) (par rapport témoin)	151
Figure 81 - Répartition de l'eau et de la matière sèche des plantes	152
Figure 82 - Hauteur des plantes et longueur racinaire	153
Figure 83 - Effet des SHB sur la ramification du système racinaire	154
Figure 84 - pH et conductivité des solutions.....	154

Figure 85 - Consommation et efficacité de l'eau	155
Figure 86 – Cinétique d'élongation racinaire.....	158
Figure 87 – Cinétique d'élongation racinaire.....	159
Figure 88 – Cinétique d'élongation racinaire.....	160
Figure 89 - Répartition du poids frais (a) et du poids sec des plantes (b) en fonction des organes	161
Figure 90 - Stimulation de la croissance des organes et des plantes entières traitées (% du témoin)	161
Figure 91 - Cycle de développement du maïs	174

ANNEXES

Annexe 1 - Méthodes de caractérisations	193
Annexe 2 – Cycle de développement du pélargonium x hortorum.....	202
Annexe 3 – Cycle de développement du maïs	205
Annexe 4 - Expérimentation 1 : Recherche de la dose efficace sur le Pélargonium	211
Annexe 5 - Expérimentation 2 : Comparaison des effets des SHB et des fractions humiques et fulviques sur le pélargonium.	215
Annexe 6 - Expérimentation 3 : Recherche de la dose efficace sur le maïs	220
Annexe 7 - Expérimentation 4 : Effets de la dose efficace de SHB sur le maïs	225
Annexe 8 - Expérimentation 5 : Effets des fractions humiques et fulviques sur le maïs.....	228

Annexe 1 - Méthodes de caractérisations

- **Dosage du carbone organique**
(Méthode Walkley Black, 1934- AFNOR, X 31-109,1994)

Titration de l'échantillon

Un volume d'échantillon de 0.25 à 5 ml est additionné de 20 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) et de 10 ml de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) 1N. Le mélange réagit pendant 30 minutes sous hotte aspirante, et la réaction est stoppée par 200 ml d'eau distillée. L'ajout de 20 ml de H_2SO_4 , 10 ml d'acide orthophosphorique (H_3PO_4), 20 ml de sel de Mohr (Sel ferreux : $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6 H_2O$) et 2 ml d'indicateur coloré permet le titrage retour de la solution au $K_2Cr_2O_7$. Le titre du mélange réactionnel est déterminé goutte à goutte à l'aide d'une burette graduée jusqu'à obtention d'un virage coloré vert violet. Le volume V_1 de $K_2Cr_2O_7$ ajouté permet d'oxyder l'excès sel de Mohr.

Titration du sel de Mohr (blanc)

Le volume V_2 de $K_2Cr_2O_7$ permettant d'oxyder 20 ml sel de Mohr est déterminé par titrage d'une solution contenant :

- 20 ml de sel de Mohr
- 20 ml d' H_2SO_4 concentré
- 10 ml d' H_3PO_4 concentré
- 2 ml d'indicateur coloré (diphénylamine sulfonate de Baryum à 0.25%)

NB : le titre du sel de Mohr évoluant au cours du temps, il est étalonné avant chaque dosage.

La concentration de carbone de l'échantillon est calculée selon la formule :

$$[C]mg = 3.9 \times ((V_2 + V_1) - 10)$$

- **Dosage des groupements fonctionnels par potentiométrie**
(Schnitzer et Khan, 1972)

Dosage de l'acidité totale

Dosage de l'échantillon :

La préparation de l'échantillon consiste à mélanger 20 à 50 mg de substances humiques dialysées et lyophilisées avec 20 ml d'une solution de Ba(OH)₂ 0,25N. L'ensemble est mis sous agitation et bullage d'azote pendant 24 heures. Après le temps de contact, la solution est filtrée sur papier Whatmann ® noir et les résidus des filtres sont rincés à l'eau distillée décarbonatée. Le filtrat est titré potentiométriquement par une solution d'HCl 0,5N jusqu'à un pH de 8,6. Les groupements acides réagissant avec un excès de baryte, l'hydroxyde de baryum libre en solution est titré par l'acide chlorhydrique. La quantité d'HCl versé pour obtenir un pH 8,6 varie proportionnellement à la quantité de fonctions acides présente dans l'échantillon et doit être obligatoirement inférieur à celle utilisé lors du dosage du blanc.

Réalisation du blanc :

La réalisation du blanc consiste à doser la quantité d'HCl permettant la titration jusqu'à pH 8,6 des groupements hydroxyles d'une solution d'hydroxyde de Baryum saturée. Cette solution est préparée à saturation pour permettre de conserver un titre constant au cours des différents dosages. Le dosage du blanc est réalisé à partir de 20 ml de Ba(OH)₂ 0,25N placé sous agitation et bullage d'azote pendant 24 heures. L'utilisation d'azote évite la carbonatation du milieu et la formation de carbonate de Baryum qui modifierait le titre de la solution d'hydroxyde de Baryum. Après le temps de contact, la solution est filtrée sur papier Whatmann ® noir et les résidus des filtres sont rincés à l'eau distillée décarbonatée. Le filtrat est titré potentiométriquement par une solution d'HCl 0,5N jusqu'à un pH de 8,6. Le dosage du blanc doit rester constant d'un échantillon à l'autre.

La quantité d'acidité totale, exprimée en mmoles par gramme de substances humiques, est calculée d'après la formule :

$$\frac{(\text{ml d'HCL versé pour le blanc} - \text{ml d'HCL versé pour l'essai}) \times \text{Normalité de HCl}}{\text{Masse de la prise d'essai}}$$

Dosage des fonctions carboxyles

Dosage de l'échantillon :

Le dosage de l'acidité carboxylique est réalisé à partir de 20 à 50 mg de substances humiques dialysées et lyophilisées ajoutés à 20 ml d'une solution d'acétate de calcium 1N et 40 ml d'eau distillée décarbonatée. L'ensemble est mis sous agitation et bullage d'azote pendant 24 heures. Après le temps de contact, la solution est filtrée sur papier Whatmann ® noir et les résidus des filtres sont rincés à l'eau distillée décarbonatée. Le filtrat est titré potentiométriquement par une solution de NaOH 0,1N jusqu'à un pH de 9,6. Les fonctions carboxyliques, réagissant avec l'acétate de calcium, libèrent l'acide acétique qui est titré par la soude. La quantité de soude versée pour obtenir un pH 9,6 est proportionnellement équivalente à la quantité de fonctions carboxyliques et doit être obligatoirement inférieur à celle utilisé lors du dosage du blanc.

Réalisation du blanc :

La réalisation du blanc consiste à doser la quantité de NaOH permettant la titration jusqu'à pH 9,6 d'une solution d'acétate de calcium 1N. Le dosage du blanc est réalisé à partir 20 ml d'une solution d'acétate de calcium 1N et 40 ml d'eau distillée décarbonatée placés sous agitation et bullage d'azote pendant 24 heures. Après le temps de contact, la solution est filtrée sur papier Whatmann ® noir et les résidus des filtres sont rincés à l'eau distillée décarbonatée. Le filtrat est titré potentiométriquement par une solution de NaOH 0,1N jusqu'à un pH de 9,6. Le dosage du blanc doit rester constant d'un échantillon à l'autre.

La quantité d'acidité carboxylique, exprimée en mmoles par gramme de substances humiques, est calculée d'après la formule :

(ml de NaOH versé pour le blanc - ml de NaOH versé pour l'essai) x Normalité de NaOH

Masse de la prise d'essai

Détermination des fonctions phénoliques

L'acidité phénolique s'obtient par différence entre l'acidité totale et l'acidité carboxylique. Elle est exprimée en mmoles.g⁻¹ de substances humiques

- **Détermination du pouvoir complexant**
(Méthode Schnitzer and Skinner, 1963)

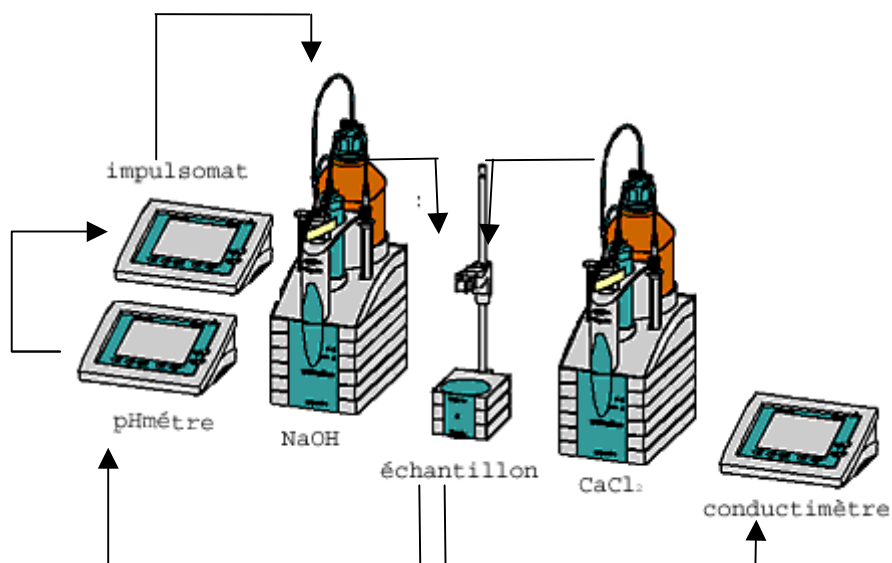


Figure a - Schéma de l'appareillage utilisé pour l'étude complexométrique

La détermination des pouvoirs complexant est effectuée à l'aide du chaîne de titration Metrohm (figure a) comportant un ph-mètre M654, un conductimètre M660, un impulsomat M614 et des burettes automatiques de précision 10^{-3} ml. Le ph-mètre est relié à l'impulsomat lui-même relié à une burette automatique. Pour travailler à pH constant, la modification du pH de l'échantillon provoque l'ajout de la solution présente dans la burette, via l'impulsomat. L'ensemble des mesures est réalisé sous atmosphère d'azote pour éviter la carbonatation des échantillons

Etude de la complexation du calcium par l'EDTA à pH variable

100 ml d'EDTA (0.0005N) sont neutralisés par une solution de NaOH (0.042N). Les variations conductimétriques et potentiométriques sont enregistrées.

Etude de la complexation du calcium par l'EDTA à pH constant

La stabilité du complexe EDTA-Calcium à différentes valeurs de pH est déterminée par l'enregistrement des variations conductimétriques lors de l'apport de quantité croissante de CaCl_2 (0.05N) à 100 ml d'une solution d'EDTA (0.0005N). Le pH de la solution initiale est fixé par l'apport de NaOH (0.1N) puis maintenu constant au cours de la réaction par un apport de NaOH (0.042N). un volume de 100 ml d'eau distillée traitée de façon identique est utilisé comme référence.

Etude de la complexation du calcium par les SHB à pH variable

100 ml d'une solution contenant 15 mg de SHB sont neutralisés par une solution de NaOH (0.042N). Les variations conductimétriques et potentiométriques sont enregistrées.

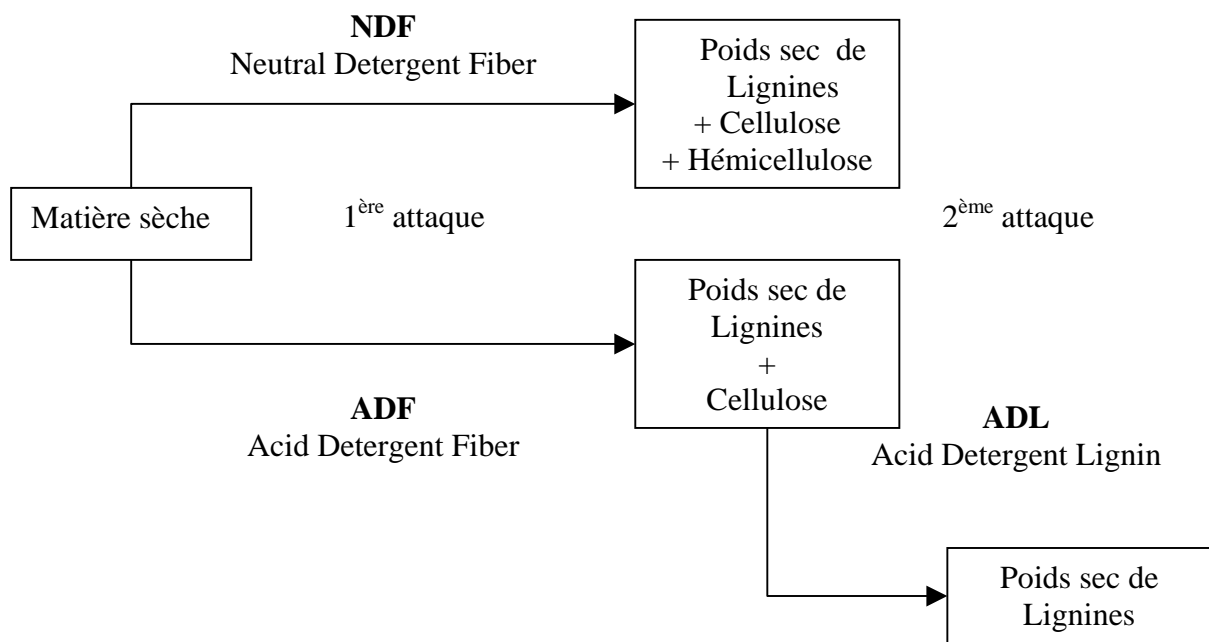
Etude de la complexation du calcium par les SHB à pH constant

La stabilité du complexe SHB-Calcium à différentes valeurs de pH est déterminée par l'enregistrement des variations conductimétriques lors de l'apport de quantité croissante de CaCl_2 (0.05N) à 100 ml d'une solution contenant 15 mg de SHB. Le pH de la solution initiale est fixé par l'apport de NaOH (0.1N) puis maintenu constant au cours de la réaction par un apport de NaOH (0.042N).

- **Détermination des glucides membranaires**
(Méthode Van Soest et Wine, 1968)

La technique consiste en une série de dosage des composants pariétaux (lignines, cellulose et hémicellulose), selon trois étapes de dégradation successives permettant de distinguer trois grandes fractions :

- **NDF** (Neutral Detergent Fiber) : résidu de fibre restant suite à l'attaque de la matière première avec un détergent neutre, représentant la somme des teneurs en hémicellulose, cellulose et lignine
- **ADF** (Acid Detergent Fiber) : résidu de fibre restant suite à l'attaque de la matière première avec un détergent acide, représentant la somme de la cellulose et de la lignine
- **ADL** (Acid Detergent Lignin), résidu obtenu après attaque du résidu (ADF) par une solution de permanganate de potassium (KMnO_4) représentant la teneur en lignine



Le poids sec de l'échantillon est déterminé avant et après chaque étape de dégradation pour estimer les teneurs relatives de chaque constituant calculées selon les formules suivantes :

Teneur en lignine = ADL

Teneurs en hémicellulose = NDF-ADF

Teneurs en cellulose = ADF-ADL

Obtention du NDF

Réactif	- Lauryl sulfate de sodium	150,0 g
	- EDTA	93,05 g
	- Phosphate disodique	22,80 g
	- Disodium tétraborate	34,05 g
	- Ethyl cellulosique	50,0 mL
	- Eau distillée qsp	5 L

Protocole

1 g de matière à doser sont introduits dans un creuset (verre fritté, porosité 1) et placés dans un appareil de type Fibertec (Tecator ®), muni d'un réfrigérant ascendant. 100 mL du réactif NDF sont ajoutés. Après ébullition pendant une heure, l'ensemble est filtré et rincé à l'eau bouillante. Le creuset est séché à l'étuve, pesé, puis incinéré au four à moufle (550°C, 12h) avant d'être de nouveau pesé. La différence entre les pesées représente le poids total des glucides membranaires.

Obtention de l'ADF

Réactif	- Cétyl triméthyl ammonium bromure	100 g
	- Acide sulfurique 1N qsp	1 L

Protocole

Le protocole est identique à celui exposé précédemment, seule la nature du réactif change. La différence entre les pesées permet d'obtenir le poids de lignine et de cellulose.

Obtention de l'ADL

Réactifs	- Solution de permanganate de potassium à 50 g L ⁻¹
	- Solution tampon : Dissoudre 6,0 g de nitrate de fer et 0,15 g de nitrate d'argent dans 100 mL d'eau distillée. Ajouter 500 mL d'acide acétique glacial, 5 g d'acétate de potassium et 400 mL d'alcool butyl tertiaire.
	- Solution mixte : Mélange (2/1 en volume) de solution de permanganate de potassium et de solution tampon
	- Solution déminéralisante : Dissoudre 50 g d'acide oxalique dans 700 mL d'éthanol à 95%. Ajouter 50 mL d'HCl 12N et 250 mL d'eau distillée.

Protocole

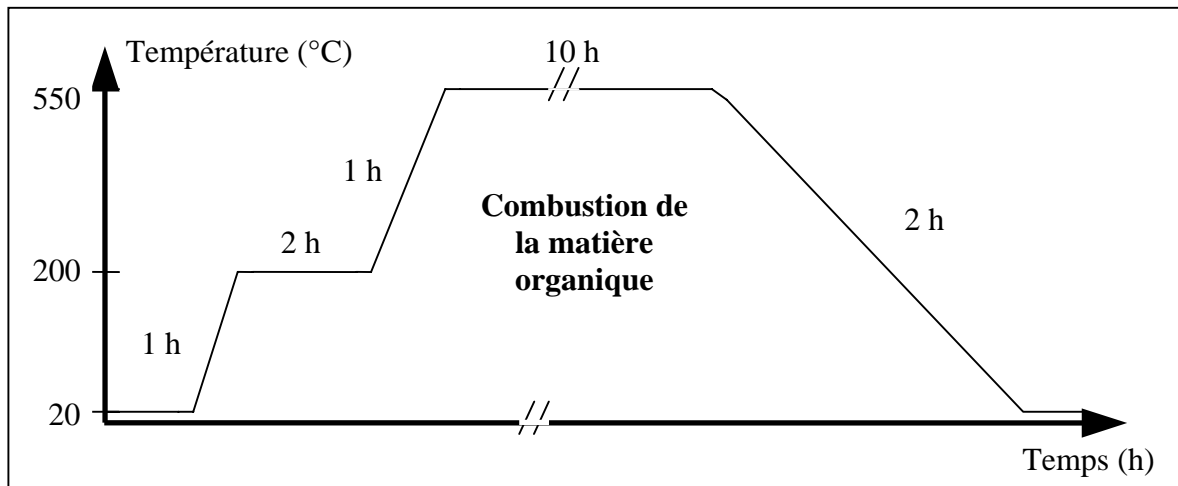
Après avoir obtenu le résidu ADF, les creusets sont replacés dans l'appareil et 25 mL de solution mixte sont ajoutés. La solution reste en contact pendant 90 minutes.

Passé ce délai, les creusets sont filtrés sous vide, mis en contact avec la solution déminéralisante pendant 5 minutes puis de nouveau filtrer. L'opération est répétée jusqu'à ce que la solution déminéralisante garde une coloration claire. La durée des rinçages ne doit pas dépasser 30 min et les fibres obtenues doivent être blanches.

L'échantillon est ensuite rincé deux fois à l'éthanol à 80% en aspirant sous vide entre deux rinçages, puis deux fois à l'acétone.

Le creuset est séché à l'étuve avant d'être pesé, puis incinéré au four à moufle (550°C, 12h) avant d'être de nouveau pesé. La différence entre les pesées représente le poids total de cellulose.

- Analyses minérales

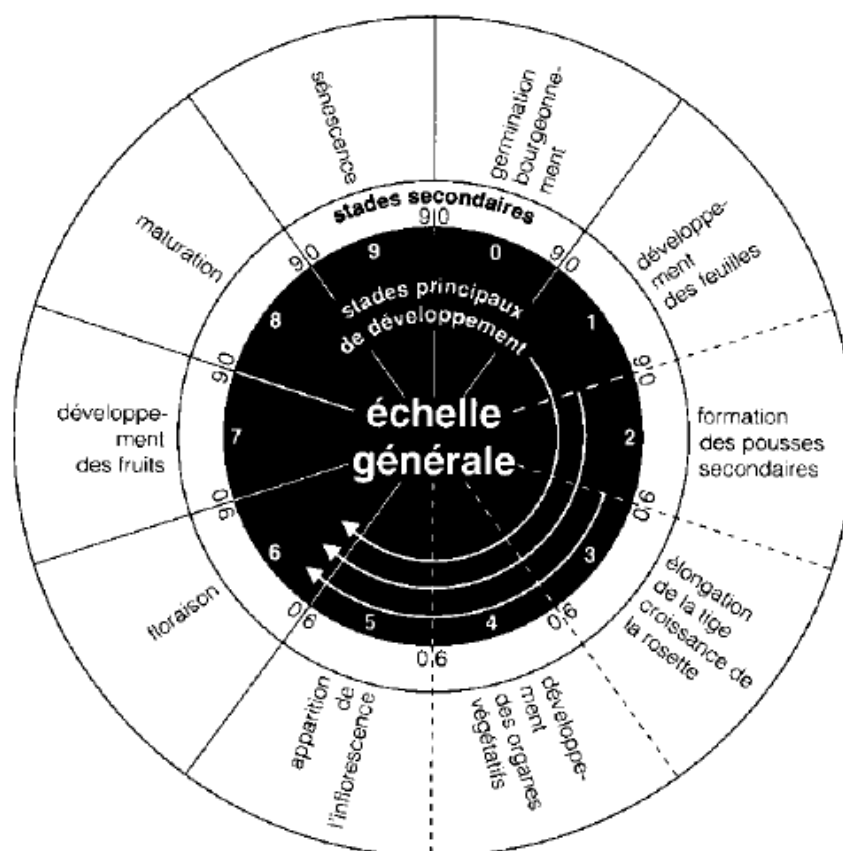


Description du principe de la calcination, "Représentation de l'évolution de la température en fonction du temps"

Annexe 2 – Cycle de développement du pélargonium x hortorum

stade	description
0	germination / levée / développement des bourgeons
1	développement des feuilles (tige principale)
2	formation des pousses secondaires / tallage
3	élongation de la tige / formation de la rosette / développement des pousses (tige principale)
4	développement des parties végétatives de récolte ou des organes de multiplication végétative / développement des organes de reproduction sexuée, gonflement de l'épi ou de la panicule (tige principale)
5	apparition de l'inflorescence (tige principale) / épiaison
6	floraison (tige principale)
7	développement des fruits
8	maturation des fruits ou graines
9	sénescence et mort ou début de la période de dormance

Principaux stade de développement

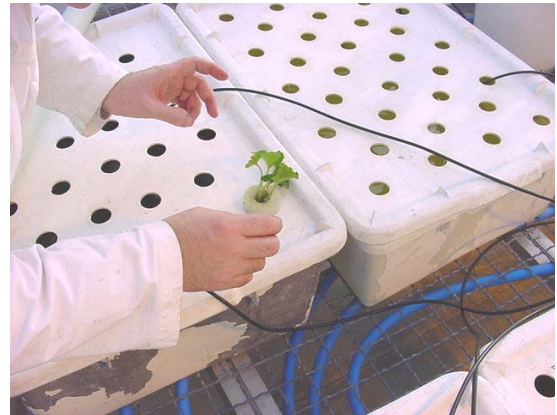


Description des stades phénologiques des mono et dicotylédones

Déroulement de la culture de pélagonium



Conditionnement des boutures



Mise en préculture



Préculture



Fin de préculture



Mise en culture des plantules



Début de culture



Floraison



mi culture



Fin de culture



Fin de culture



Bouquet épanouis



Système racinaire



Récolte des organes



Conditionnement des échantillons

Annexe 3 – Cycle de développement du maïs

Maize Weber and Bleiholder, 1990; Lancashire et al., 1991

Phenological growth stages and BBCH-identification keys of maize

(*Zea mays* L.)

Code	Description
Principal growth stage 0: Germination	
00	Dry seed (caryopsis)
01	Beginning of seed imbibition
03	Seed imbibition complete
05	Radicle emerged from caryopsis
06	Radicle elongated, root hairs and/or side roots visible
07	Coleoptile emerged from caryopsis
09	Emergence: coleoptile penetrates soil surface (cracking stage)
Principal growth stage 1: Leaf development^{1,2}	
10	First leaf through coleoptile
11	First leaf unfolded
12	2 leaves unfolded
13	3 leaves unfolded
14	Stages continuous till ...
19	9 or more leaves unfolded
Principal growth stage 3: Stem elongation	
30	Beginning of stem elongation
31	First node detectable
32	2 nodes detectable
33	3 nodes detectable
34	Stages continuous till ...
39	9 or more nodes detectable ³
Principal growth stage 5: Inflorescence emergence, heading	
51	Beginning of tassel emergence: tassel detectable at top of stem
53	Tip of tassel visible
55	Middle of tassel emergence: middle of tassel begins to separate
59	End of tassel emergence: tassel fully emerged and separated

¹ A leaf may be described as unfolded when its ligule is visible or the tip of next leaf is visible

² Tillering or stem elongation may occur earlier than stage 19; in this case continue with principal growth stage 3

³ In maize, tassel emergence may occur earlier, in this case continue with principal growth stage 5

Maize

Weber and Bleiholder, 1990; Lancashire et al , 1991

Phenological growth stages and BBCH-identification keys of maize

Code	Description
Principal growth stage 6: Flowering, anthesis	
61	Male: stamens in middle of tassel visible Female: tip of ear emerging from leaf sheath
63	Male: beginning of pollen shedding Female: tips of stigmata visible
65	Male: upper and lower parts of tassel in flower Female: stigmata fully emerged
67	Male: flowering completed Female: stigmata drying
69	End of flowering: stigmata completely dry
Principal growth stage 7: Development of fruit	
71	Beginning of grain development: kernels at blister stage, about 16% dry matter
73	Early milk
75	Kernels in middle of cob yellowish-white (variety-dependent), content milky, about 40% dry matter
79	Nearly all kernels have reached final size
Principal growth stage 8: Ripening	
83	Early dough: kernel content soft, about 45% dry matter
85	Dough stage: kernels yellowish to yellow (variety dependent), about 55% dry matter
87	Physiological maturity: black dot/layer visible at base of kernels, about 60% dry matter
89	Fully ripe: kernels hard and shiny, about 65% dry matter
Principal growth stage 9: Senescence	
97	Plant dead and collapsing
99	Harvested product

Maize



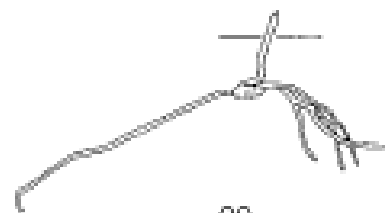
00



05



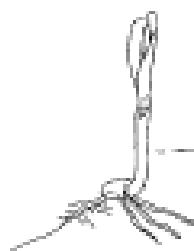
07



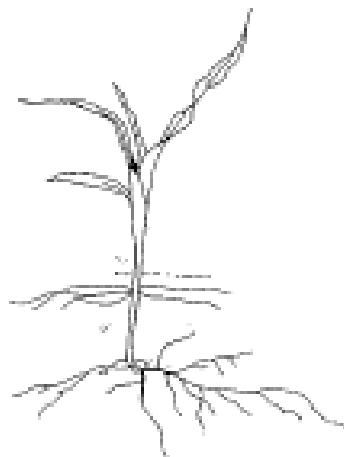
09



10



11



13



15



17/32



34



53

© 1990: BASF AG

Maize



63

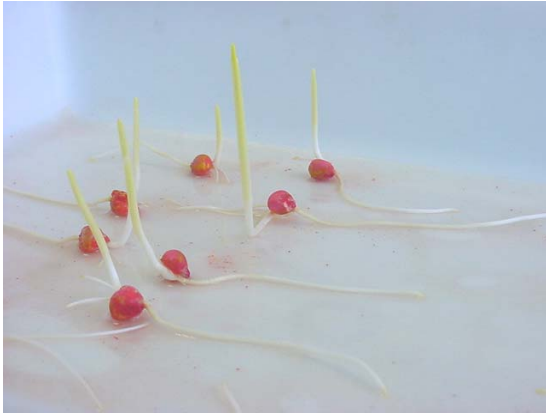
69



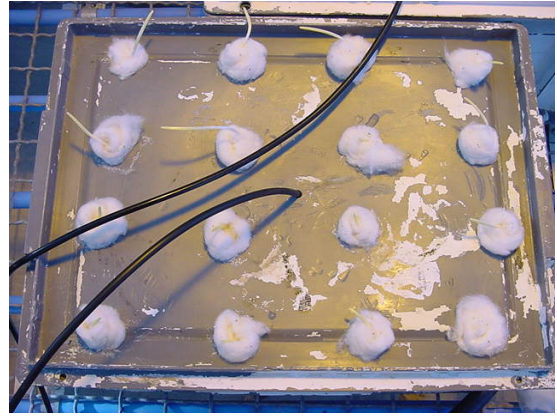
79

89

Déroulement de la culture du maïs



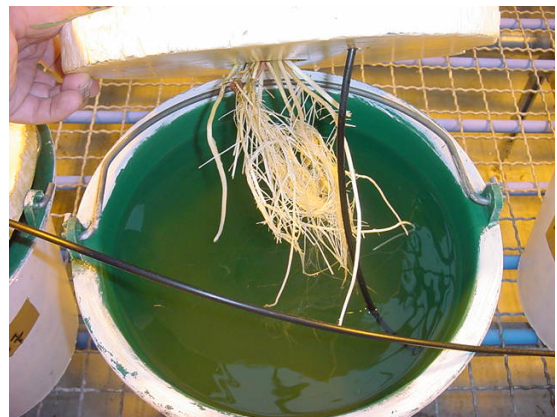
Germination



Préculture



Fin de préculture



Mise en culture



Début de culture



Mi culture



Formation de la panicule



Formation de l'épi



Fin de culture



Epis récolté

Annexe 4 - Expérimentation 1 : Recherche de la dose efficace sur le Pélagonium

Code	Traitement	Dose (mg.L-1)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	4
H25	Solution nutritive + SHB	25	4
H30	Solution nutritive + SHB	30	4
H35	Solution nutritive + SHB	35	4
H40	Solution nutritive + SHB	40	4
H45	Solution nutritive + SHB	45	4
H50	Solution nutritive + SHB	50	4
Total	7 traitements		28 plantes

Formulation des solutions nutritives

Témoin	NO3-	H2PO4--	SO4--	TOTAL
K+	11	2		13
Ca ++	4			4
Mg ++			3	3
TOTAL	15	2	3	20

Solution nutritive Témoin

H25	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHB	TOTAL
K+	6,76	2		4,24	13
Ca ++	4				4
Mg ++			3		3
H+	4,24				
TOTAL	15	2	3		20

Solution nutritive H25

H30	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHB	TOTAL
K+	5,91	2		5,09	13
Ca ++	4				4
Mg ++			3		3
H+	5,09				
TOTAL	15	2	3		20

Solution nutritive H30

H35	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHB	TOTAL
K+	5,09	2		5,91	13
Ca ++	4				4
Mg ++			3		3
H+	5,91				
TOTAL	15	2	3		20

Solution nutritive H35

H40	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHB	TOTAL
K+	4,22	2		6,78	13
Ca ++	4				4
Mg ++			3		3
H+	6,78				
TOTAL	15	2	3		20

Solution nutritive H40

H45	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHB	TOTAL
K+	3,37	2		7,63	13
Ca ++	4				4
Mg ++			3		3
H+	7,63				
TOTAL	15	2	3		20

Solution nutritive H45

H50	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHB	TOTAL
K+	2,52	2		8,48	13
Ca ++	4				4
Mg ++			3		3
H+	8,48				
TOTAL	15	2	3		20

Solution nutritive H50

Paramètre de fin de culture

Poids frais des plantes (g)

	PF Feuille	PF Tiges	PF Racines	PF Fleurs	PF total
Témoin	113	69	43	28	253
Témoin	94	48	28	30	200
Témoin	207	116	47	48	418
Témoin	74	43	25	12	154
H25	73	46	34	18	171
H25	68	36	20	24	148
H25	224	139	56	83	502
H25	108	62	39	23	232
H30	92	57	44	40	233
H30	80	42	27	26	175
H30	111	86	46	72	315
H30	153	82	44	58	337
H35	105	76	41	28	250
H35	121	60	39	30	250
H35	167	112	51	47	377
H35	102	62	37	30	231
H40	69	45	39	35	188
H40	165	92	39	51	347
H40	78	59	47	50	234
H40	130	64	45	41	280
H45	80	73	39	29	221
H45	137	86	52	44	319
H45	186	106	53	37	382
H45	179	104	60	50	393
H50	97	66	44	23	230
H50	108	60	45	36	249
H50	210	117	63	92	482
H50	123	61	42	32	258

Poids sec des plantes (g)

	PS Feuilles	PS Tiges	PS Fleurs	PS Racines	PS Total
Témoin	16,35	8,78	10,47	2,41	38,01
Témoin	9,64	5,21	12,53	1,82	29,19
Témoin	21,60	14,17	24,52	3,05	63,35
Témoin	8,37	5,46	13,47	1,52	28,82
H25	10,21	5,70	14,07	2,09	32,06
H25	7,24	3,43	8,95	1,21	20,84
H25	24,54	15,75	21,26	3,79	65,34
H25	12,84	7,02	12,15	2,24	34,25
H30	11,21	6,25	13,93	2,11	33,50
H30	8,34	4,38	6,62	1,58	20,92
H30	17,42	9,80	20,67	3,02	50,91
H30	16,01	9,25	21,36	2,38	49,00
H35	15,74	9,23	14,40	2,51	41,88
H35	12,77	6,41	11,33	2,61	33,13
H35	19,52	12,59	16,94	3,41	52,46
H35	11,73	7,01	14,85	2,03	35,62
H40	11,27	5,24	11,91	2,30	30,72
H40	16,93	9,48	12,80	2,37	41,58
H40	14,38	7,30	15,44	2,57	39,69
H40	13,87	7,02	13,85	2,85	37,60
H45	13,34	7,71	9,90	2,34	33,29
H45	16,08	8,89	10,93	3,09	38,99
H45	20,05	11,26	14,89	3,09	49,29
H45	19,85	11,61	14,73	3,69	49,88
H50	13,79	7,77	11,63	2,49	35,67
H50	12,40	6,41	10,86	2,70	32,37
H50	19,32	11,16	15,03	3,66	49,17
H50	12,86	6,87	18,24	2,11	40,07

Nombre et longueur des organes – Consommation et efficacité de l'eau

	Nb feuilles	Nb Fleurs	Longueur racine (cm)	Consommation (L)	Efficacité (L.Kg ⁻¹)
Témoin	88	13	32	7,675	201,9
Témoin	61	12	31	5,025	172,2
Témoin	129	33	26	12,225	193,0
Témoin	82	16	41	5,625	195,2
H25	77	15	36	7,125	222,2
H25	47	14	33	4,925	236,4
H25	127	19	27	11,875	181,7
H25	82	16	29	6,075	177,4
H30	85	15	25	6,075	181,4
H30	80	12	32	5,175	247,4
H30	101	20	25	7,625	149,8
H30	117	25	22	9,125	186,2
H35	88	17	32	7,925	189,2
H35	87	16	31	5,975	180,4
H35	127	25	42	9,225	175,9
H35	66	16	27	5,775	162,1
H40	86	16	26	4,875	158,7
H40	83	17	26	11,575	278,4
H40	89	14	38	6,025	151,8
H40	103	21	30	4,625	123,0
H45	68	15	36	6,225	187,0
H45	86	16	25	6,525	167,3
H45	122	18	26	9,375	190,2
H45	112	17	27	8,775	175,9
H50	69	12	45	8,175	229,2
H50	81	14	35	6,425	198,5
H50	134	21	29	11,175	227,3
H50	85	19	43	8,575	214,0

Annexe 5 - Expérimentation 2 : Comparaison des effets des SHB et des fractions humiques et fulviques sur le pélagonium.

Code	Traitement	Dose (mg.L-1)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	7
H50	Solution nutritive + SHB	50	7
AH	Solution nutritive + Acide humique	30	7
AF	Solution nutritive + Acide Fulvique	20	7
Total	4 traitements	-	28 plantes

Formulation des solutions nutritives

Les solutions nutritives témoin et H50 sont identiques à celle de la première expérimentation

Formulation de solution nutritive avec acides fulviques

AH30	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHB	TOTAL
K+	7,50	2	-	3,50	13
Ca ++	4	-	-	-	4
Mg ++	-	-	3	-	3
H+	3,50	-	-	-	-
TOTAL	15	2	3	-	20

Solution nutritive AH30

Cas particulier de formulation de solution nutritive avec acides fulviques

Dans le cas de la préparation d'une solution additionnée d'acide fulvique la formulation est modifiée. En effet, suite à sa séparation la fraction fulvique est enrichie en potassium et en nitrate. L'ajout d'acides fulviques aux solutions nutritives modifie la teneur en nitrate et potassium, la correction de l'équilibre consiste à limiter les apports de KNO_3^- .

AF20	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHL	TOTAL
K+	5,66	2	-	5,34	13
Ca ++	4	-	-	-	4
Mg ++	-	-	3	-	3
SHL	5,12	-	-	-	-
H+		-	-	-	-
TOTAL	15	2	3	-	20

Solution nutritive AF20

Paramètres des plantes en début de culture

Traitement	Poids frais	Nb Feuilles	Longueur racine (cm)
TEMOIN	16,07	1	14,9
TEMOIN	15,64	15	15,2
TEMOIN	20,31	13	17,6
TEMOIN	18,38	10	14,2
TEMOIN	23,43	15	16,3
TEMOIN	21,6	16	17,3
TEMOIN	19,48	15	15
H50	16,36	13	14,2
H50	15,42	13	14,3
H50	21,17	13	15,9
H50	18,64	15	13,2
H50	20,83	13	16,2
H50	19,78	13	13,7
H50	17,53	12	17,4
AF20	16,05	11	16,4
AF20	19,07	14	13,5
AF20	23,79	15	15,2
AF20	17,5	13	16,2
AF20	20,6	16	18,5
AF20	18,93	13	16
AF20	14,87	9	19,5
AH30	16,8	11	17,8
AH30	19,56	11	13,2
AH30	24,8	7	17,2
AH30	20,8	13	16,7
AH30	17,1	11	16,5
AH30	18,18	12	17,5
AH30	14,92	9	16,6

Paramètres de fin de culture

Poids frais des plantes (g)

Traitement	FEUILLE	TIGE	FLEURS	RACINE	PF Total
TEMOIN	273,3	141,3	180,0	111,8	706,5
TEMOIN	326,3	185,8	212,0	158,7	882,8
TEMOIN	377,3	214,3	274,5	145,8	1012,0
TEMOIN	284,3	142,3	164,2	132,3	723,2
TEMOIN	315,3	183,3	200,0	115,3	814,0
TEMOIN	278,8	145,3	186,5	150,3	761,0
TEMOIN	195,5	104,0	158,5	122,0	580,0
H50	250,3	126,8	206,0	112,3	695,5
H50	285,8	164,8	190,0	130,3	771,0
H50	387,3	233,5	209,5	138,7	969,0
H50	291,8	153,8	222,0	124,3	792,0
H50	354,3	195,8	203,5	157,3	911,0
H50	313,8	196,8	199,5	118,8	829,0
H50	203,3	87,8	231,8	111,3	634,3
AF20	126,8	57,8	175,5	79,8	440,0
AF20	349,3	189,3	198,0	126,3	863,0
AF20	271,8	137,8	222,5	124,3	756,5
AF20	216,3	112,8	244,0	108,3	681,5
AF20	330,3	187,3	233,5	140,3	891,5
AF20	249,3	129,3	231,7	42,3	652,7
AF20	238,3	115,3	164,0	75,8	593,5
AH30	284,8	166,8	191,5	101,8	745,0
AH30	253,3	146,3	187,0	167,8	754,5
AH30	198,8	90,3	240,0	390,8	920,0
AH30	313,3	157,8	193,5	138,3	803,0
AH30	180,3	81,3	198,0	101,8	561,5
AH30	305,8	161,3	210,5	118,3	796,0
AH30	283,8	163,8	171,5	162,3	781,5

Poids sec des plantes (g)

Traitement	FEUILLE	TIGE	FLEURS	RACINE	PS Total
TEMOIN	31,19	18,04	30,43	5,85	85,50
TEMOIN	38,84	25,43	19,10	4,18	87,54
TEMOIN	45,79	27,58	43,51	9,16	126,03
TEMOIN	33,23	21,61	29,28	8,21	92,32
TEMOIN	35,06	23,81	33,90	6,13	98,89
TEMOIN	32,31	18,52	26,99	6,61	84,42
TEMOIN	25,73	14,28	22,62	5,17	67,79
H50	26,71	15,44	34,33	5,16	81,63
H50	32,88	19,43	25,56	5,90	83,76
H50	42,82	33,07	29,08	7,37	112,33
H50	32,25	19,29	35,24	5,57	92,34
H50	45,20	24,85	27,81	7,43	105,28
H50	40,93	31,22	29,38	6,08	107,60
H50	23,40	13,20	37,19	5,71	79,49
AF20	14,72	8,21	30,82	3,62	57,36
AF20	56,51	25,83	32,85	6,03	121,21
AF20	32,77	18,46	36,66	5,82	93,70
AF20	23,27	15,97	39,40	5,12	83,75
AF20	34,23	22,56	36,40	7,26	100,44
AF20	28,88	19,70	43,78	5,76	98,11
AF20	25,79	14,72	28,32	5,47	74,30
AH30	31,51	20,95	26,44	5,62	84,51
AH30	31,45	19,15	30,91	6,51	88,01
AH30	21,98	11,89	38,36	8,36	80,58
AH30	42,84	22,66	32,79	7,62	105,90
AH30	21,85	13,05	34,18	5,07	74,14
AH30	34,97	20,60	29,84	6,54	91,94
AH30	34,88	20,13	23,54	7,44	85,98

Nombre et longueur des organes – Consommation et efficacité de l'eau

Traitement	Nb Feuilles	Nb Fleurs	Longueur racine (cm)	Consommation (L)	Efficacité (L.Kg ⁻¹)
TEMOIN	161	28	63	15,455	180,75
TEMOIN	220	38	52	12,205	139,42
TEMOIN	210	40	52	20,855	165,47
TEMOIN	146	27	57	16,19	175,36
TEMOIN	197	36	46	17,215	174,08
TEMOIN	185	28	52	16,335	193,49
TEMOIN	154	28	56	13,485	198,91
H50	152	37	50	14,49	177,50
H50	167	31	44	15,92	190,00
H50	204	33	44	21,46	191,00
H50	168	41	58	15,67	169,64
H50	199	32	39	19,48	184,98
H50	204	38	36	19,06	177,09
H50	159	44	56	14,21	178,69
AF20	104	31	57	9,505	165,70
AF20	200	35	45	17,355	143,18
AF20	171	37	42	15,065	160,77
AF20	154	40	49	14,875	177,61
AF20	200	43	62	18,485	184,03
AF20	164	41	49	17,355	176,89
AF20	115	25	40	13,545	182,30
AH30	180	28	45	16,185	191,51
AH30	179	37	40	16,035	182,19
AH30	120	32	56	20,715	257,06
AH30	188	30	62	17,705	167,18
AH30	135	35	50	13,115	176,89
AH30	174	34	42	17,425	189,52
AH30	162	30	47	16,695	194,17

Annexe 6 - Expérimentation 3 : Recherche de la dose efficace sur le maïs

Code	Traitement	Dose (mg.L-1)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	4
H50	Solution nutritive + SHB	50	4
H100	Solution nutritive + SHB	100	4
H150	Solution nutritive + SHB	150	4
T	Solution nutritive standard	0	4
H200	Solution nutritive + SHB	200	4
Total	6 traitements		24 plantes

Formulation des solutions nutritives

Les solutions nutritives témoin et H50 sont identiques à celle de la première expérimentation

H100	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHB	TOTAL
K+	0,00	2	-	11,12	13,12
Ca ++	4	-	-	-	4
Mg ++	-	-	3	-	3
H+	11	-	-	-	-
TOTAL	15	2	3	-	20

Solution nutritive H100

H150	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHB	TOTAL
K+	0,00	2	-	16,68	18,68
Ca ++	4	-	-	-	4
Mg ++	-	-	3	-	3
H+	16,68	-	-	-	-
TOTAL	20,68	2	3	-	25,68

Solution nutritive H150

H200	NO3-	H2PO4--	SO4--	SHB	TOTAL
K+	0,00	2	-	22,24	24,24
Ca ++	4	-	-	-	4
Mg ++	-	-	3	-	3
H+	20,24	-	-	-	-
TOTAL	24,24	2	3	-	24,24

Solution nutritive H200

T200	NO3-	H2PO4--	SO4--	TOTAL
K+	16	2	-	18
Ca ++	4	-	-	4
Mg ++	-	-	3	3
TOTAL	20	2	3	25

Solution nutritive T200

Paramètres des plantes en début de culture

Traitement	Longueur racine	nb Feuilles	Hauteur	Poids frais	pH	Ec
Témoin	70	5	31	8	5,04	2,29
Témoin	70	5	43	16	5,04	2,29
Témoin	75	5	42	12,5	5,04	2,29
Témoin	85	5	40	12,5	5,04	2,29
T-200	75	5	30	7,5	4,96	4,46
T-200	82	5	40	12,5	4,96	4,46
T-200	90	5	40	14,5	4,96	4,46
T-200	80	5	40	12	4,96	4,46
H-50	70	5	31	8	4,73	2,34
H-50	65	5	30	12,5	4,73	2,34
H-50	85	5	34	15	4,73	2,34
H-50	80	5	35	10,5	4,73	2,34
H-100	76	5	41	15	4,92	2,38
H-100	55	5	30	6,5	4,92	2,38
H-100	85	5	37	1,5	4,92	2,38
H-100	82	5	30	12,5	4,92	2,38
H-150	80	5	39	13,5	5	2,9
H-150	73	5	37	13,5	5	2,9
H-150	57	5	32	8,5	5	2,9
H-150	85	5	37	11,5	5	2,9
H-200	70	5	40	11,5	4,94	3,45
H-200	84	5	34	15	4,94	3,45
H-200	45	5	30	7,5	4,94	3,45
H-200	85	5	38	13	4,94	3,45

Poids frais des plantes (g)

Traitement	Racine	Feuille	Tige	Epis	PF total
Témoin	80,5	114	224	87	512
Témoin	96	117	248	105	571
Témoin	62	116	267,5	139	587
Témoin	148	122,5	253,5	89	614
T-200	156,5	108	264	143	671,5
T-200	187,5	120	404	124	837,5
T-200	207	104	246	57,5	614
T-200	103	91	250	22	468,5
H-50	144	145	392	40,5	736
H-50	115	133	322	115	646,5
H-50	129,5	120	293	174	724
H-50	132,5	123	402	57	726,5
H-100	123,5	138,5	317	221,5	807,5
H-100	131	117	249,5	49	531
H-100	157	100	222,5	126	605
H-100	147,5	105	243,5	52	549,5
H-150	146,5	93,5	271,5	62	574
H-150	151	99	308,5	88	646,5
H-150	232	105	252,5	145	736
H-150	131	144,5	338	155	763
H-200	164	83	226	168	648
H-200	267	120	337,5	172,5	907,5
H-200	151	105	261,5	90,5	611
H-200	144,5	115	297,5	45	576

Poids sec des plantes (g)

Traitement	Racine	Feuille	Tige	Epis	PF total
Témoin	12,7	21,6	38,2	10,5	82,9
Témoin	14,6	22,5	42,9	13,4	93,4
Témoin	6,6	20,5	44,1	17,6	88,8
Témoin	24,4	25,3	46,5	12,2	108,5
T-200	14,9	20,9	42,5	16,2	94,5
T-200	17,8	26,5	62,5	14,5	121,3
T-200	12,1	24,4	47,4	8,9	92,7
T-200	13,8	22,7	54,9	4,2	95,6
H-50	17,7	26,6	51,8	4,9	101,1
H-50	16,5	28,6	66,1	18,1	129,2
H-50	15,9	26,0	54,0	22,8	118,6
H-50	18,6	27,8	70,2	7,8	124,4
H-100	12,8	24,0	50,2	25,7	112,7
H-100	8,6	20,0	40,7	5,9	75,2
H-100	15,9	16,9	30,9	5,8	69,5
H-100	14,0	18,1	32,8	5,6	70,5
H-150	11,1	16,5	39,4	7,2	74,1
H-150	19,6	21,3	59,2	11,4	111,5
H-150	17,2	19,2	33,3	14,3	84,0
H-150	16,7	25,6	51,6	18,6	112,5
H-200	14,3	16,7	39,8	19,8	90,6
H-200	21,8	23,7	47,0	17,8	110,3
H-200	20,2	18,6	34,6	9,4	82,8
H-200	13,6	23,5	46,1	5,4	88,6

Nombre et longueur des organes – Consommation et efficacité de l'eau

Traitement	Hauteur	Longueur Racine	nb Feuilles	Consommation (L)	Efficacité L/Kg ms
Témoin	237	80	13	12,435	150,04
Témoin	110	66	13	8,34	207,68
Témoin	230	70	13	15,055	169,50
Témoin	156	80	13	15,2	140,14
T-200	207	70	13	13,86	146,71
T-200	220	68	13	17,67	145,69
T-200	180	65	13	14,45	155,86
T-200	120	54	13	17,55	183,53
H-50	241	77	13	17,82	176,33
H-50	167	80	13	20,425	158,05
H-50	160	80	13	18,65	157,27
H-50	175	100	13	17,065	137,21
H-100	230	80	13	16,37	145,21
H-100	135	95	13	10,35	137,68
H-100	218	80	13	10,75	154,72
H-100	220	64	13	13,265	188,22
H-150	195	92	13	9,655	130,25
H-150	190	53	13	16,5	147,97
H-150	219	85	13	14,935	177,77
H-150	225	80	13	16,77	149,09
H-200	212	80	13	12,65	139,57
H-200	230	80	13	14,8	134,14
H-200	225	90	13	11,663	140,88
H-200	185	73	13	14,375	162,16

Annexe 7 - Expérimentation 4 : Effets de la dose efficace de SHB sur le maïs

Code	Traitement	Dose (mg.L-1)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	8
H50	Solution nutritive + SHB	50	8
Total	2 traitements	-	16 plantes

Formulation des solutions nutritives

Les solutions nutritives témoin et H50 sont identiques à celle de la première expérimentation

Paramètres des plantes en début de culture

	Longueur racine	Nb Feuilles	Hauteur	Poids Frais
Témoin	50	5	43	9,5
Témoin	50	5	41	8,5
Témoin	62	5	52	7,5
Témoin	65	5	40	10,5
Témoin	65	5	50	12,5
Témoin	58	5	50	13,5
Témoin	65	5	50	13
Témoin	60	5	47	8,5
H50	68	5	41	10,5
H50	50	5	39	7
H50	55	5	41	8
H50	60	5	50	14,5
H50	61	5	45	9,5
H50	65	5	45	10,5
H50	60	5	51	14
H50	60	5	43	10

Paramètres de fin de culture

Poids frais des plantes (g)

	PF Racine	PF Feuilles	PF Tige	PF Epis	Poids frais
Témoin	99	99	312,5	0	533
Témoin	86,5	119	293,5	0	520
Témoin	119	83	307	0	531
Témoin	84	76,5	278	0	450
Témoin	74	93,5	307	0	515,5
Témoin	144	109	306	0	573,5
Témoin	42	98	246	0	391
Témoin	104	105	327	0	555
H50	130	158	501	0	789
H50	123	177	495	0	795
H50	181	153	485,5	65	916
H50	123	186,5	629	78	1033
H50	112	134,5	392,5	34	702,5
H50	150,5	133	436	0	746
H50	150	110	365	128	780
H50	150	182	496	52	880

Poids sec des plantes (g)

	PS Racine	PS Feuilles	PS Tige	PS Epis	Poids Sec
Témoin	66,5	30,6	18,8	0,0	110,4
Témoin	53,9	26,2	13,8	0,0	88,5
Témoin	66,1	29,9	20,2	0,0	110,8
Témoin	45,5	20,7	13,1	0,0	73,9
Témoin	52,3	23,7	14,6	0,0	85,3
Témoin	60,1	26,6	23,1	0,0	104,4
Témoin	26,8	16,4	5,3	0,0	43,0
Témoin	64,9	27,7	17,9	0,0	105,0
H50	113,5	38,7	13,5	0,0	160,2
H50	123,3	46,9	20,5	0,0	185,3
H50	131,3	51,8	36,8	12,7	232,6
H50	159,1	46,5	18,7	12,5	236,9
H50	96,5	34,6	19,7	6,3	157,1
H50	98,3	34,6	22,4	0,0	149,9
H50	59,6	22,1	20,4	15,1	117,2
H50	91,0	33,8	20,9	7,7	153,4

Nombre et longueur des organes – Consommation et efficacité de l'eau

	Hauteur	Longueur racine	Nb Feuilles
Témoin	90	50	14
Témoin	110	80	14
Témoin	120	75	14
Témoin	90	65	11
Témoin	100	60	13
Témoin	120	60	15
Témoin	90	55	13
Témoin	100	60	13
H50	140	70	15
H50	183	76	16
H50	190	75	14
H50	200	75	16
H50	160	80	14
H50	175	75	16
H50	220	120	14
H50	140	50	16

Annexe 8 - Expérimentation 5 : Effets des fractions humiques et fulviques sur le maïs.

Code	Traitement	Dose (mg.L-1)	Répétition
T	Solution nutritive standard	0	5
H50	Solution nutritive + SHB	50	5
AH	Solution nutritive + Acide Humique	30	5
AF	Solution nutritive + Acide Fulvique	20	5
Total	4 traitements	-	20 plantes

Formulation des solutions nutritives

Les solutions nutritives témoins et H50, AH30 et AF20 sont identiques à celle de l'expérimentation n°2.

Paramètres de fin de culture

Poids frais des plantes (g)

	PF Racine	PF Feuilles	PF Tige	PF Epis	Poids frais
Témoin	99	90	191	0	390
Témoin	164	149	300	125	754
Témoin	140	121	234	42	554
Témoin	175	118	309	121	745
Témoin	160	112	288	128	702
H50	202	141	382	182	922
H50	230	132	291	157	828
H50	197	152	376	187	935
H50	195	161	377	148	884
H50	153	144	325	104	743
AF20	123	129	288	91	645
AF20	138	111	254	107	630
AF20	207	112	262	177	791
AF20	207	145	332	177	888
AF20	146	121	280	142	734
AH30	170	118	251	111	672
AH30	194	143	324	129	810
AH30	84	104	223	156	698
AH30	177	134	299	148	781
AH30	169	105	238	71	609

Poids sec des plantes (g)

	PS Racine	PS Feuilles	PS Tige	PS Epis	Poids Sec
Témoin	9,8	13,2	19,6	0,0	36,9
Témoin	18,1	21,7	35,5	11,9	87,2
Témoin	13,4	16,7	23,8	3,9	57,7
Témoin	15,8	18,2	33,2	11,5	78,7
Témoin	14,6	16,7	33,0	11,1	75,3
H50	24,0	23,9	52,0	24,5	124,5
H50	22,8	19,9	31,4	16,1	90,2
H50	19,6	23,7	48,2	21,9	113,4
H50	17,5	23,7	46,1	14,6	101,8
H50	14,9	20,8	37,1	9,3	82,1
AF20	11,9	18,9	33,3	8,4	72,5
AF20	14,0	17,1	24,5	9,7	65,3
AF20	20,4	17,3	29,2	16,0	82,9
AF20	26,0	24,3	45,7	22,2	118,3
AF20	14,9	18,7	32,7	12,6	78,9
AH30	15,4	18,3	29,9	10,2	73,8
AH30	16,9	21,2	36,0	11,2	85,2
AH30	15,5	15,7	26,5	13,8	71,6
AH30	16,8	20,9	35,1	16,4	89,3
AH30	11,5	15,2	24,0	6,4	57,1

Nombre et longueur des organes – Consommation et efficacité de l'eau

	Hauteur	Longueur racine	Nb feuilles	Consommation (L)	Efficacité (L.Kg-1)
Témoin	160	90	13	9,7	261,8
Témoin	255	93	13	16,0	183,5
Témoin	200	95	13	11,1	191,4
Témoin	250	98	13	16,9	214,0
Témoin	240	96	13	14,6	193,3
H50	266	110	13	21,5	172,7
H50	236	115	13	16,5	183,0
H50	257	115	13	19,1	168,5
H50	244	113	13	17,0	166,5
H50	240	116	13	16,4	199,1
AF20	225	108	13	13,0	178,7
AF20	233	100	13	12,2	186,8
AF20	230	106	13	14,2	171,0
AF20	257	107	13	19,1	161,5
AF20	247	98	13	15,1	191,3
AH30	223	103	13	14,6	197,2
AH30	255	113	13	15,4	180,1
AH30	210	107	13	14,1	196,3
AH30	236	99	13	16,1	180,3
AH30	215	96	13	13,3	232,0

Présentes dans tous les écosystèmes, les substances humiques sont les constituants majeurs de la matière organique. Dans les sols, ces molécules possèdent des effets positifs sur la croissance et le développement des plantes. Cependant, la composition et les propriétés des substances humiques varient selon l'origine et leurs conditions de formation.

La transformation physico-chimique d'une matière première végétale homogène permet de préparer des produits de composition stable et reproductible, les substances humiques biomimétiques (SHB), comparables aux substances humiques naturelles.

Les objectifs de ce travail visent, d'une part, à déterminer la composition et l'origine des substances humiques biomimétiques à travers leurs caractérisations chimiques; et d'autre part, à évaluer l'efficacité de ces produits sur la croissance et le développement des plantes (pélargonium, maïs) cultivées en culture hors-sol.

L'analyse chimique des produits obtenus montre que les substances humiques biomimétiques possèdent les mêmes propriétés que les substances humiques naturelles. Elles sont composées de 60% d'acides humiques dérivés principalement de la lignine et de 40% d'acides fulviques provenant de la cellulose et de l'hémicellulose.

L'application de substances humiques biomimétiques induit des effets positifs sur les végétaux pour une dose optimale de 50 mg.L⁻¹ de carbone. La germination et la rhizogenèse du maïs sont stimulées en présence d'extraits humiques. Les effets des substances humiques biomimétiques se traduisent également par la stimulation de la mise à fleur du pélargonium et l'accélération des phases végétatives du maïs. Ces produits semblent agir sur la vitesse des mécanismes de croissance. L'ajout du produit permet aux plants de maïs de réaliser une économie d'eau en réduisant leur consommation. De plus, les acides fulviques semblent plus efficaces que les acides humiques.

Ce travail précise l'intérêt des substances humiques biomimétiques et permet d'envisager leur application dans les domaines horticole et agricole.

Mot-clés : acides humiques, acides fulviques, cultures hydroponiques, pélargonium, maïs

Present in all the ecosystems, humic substances are the major components of organic matter. In soils, these molecules have some positive effects on growth and plant development. However, the composition and the properties of humic substances vary according to the origin and their conditions of formation.

The physico-chemical transformation of homogeneous plant raw material allows to prepare stable humic products with a reproducible composition, the biomimetic humic substances (BSH), which are comparable to natural compounds.

This work deals with, on one hand, the determination of composition and origins of the biomimetic humic substances through their chemical characterizations; and on the other hand, the evaluation of their efficiency on growth and plant development (pelargonium, maize) cultivated in hydroponic culture.

Chemical analysis of the products shows that the biomimetic humic substances present the same properties as the natural humic substances. They are composed of 60% of humic acids, derived from lignin and 40% of fulvic acids, coming from cellulose and hemicellulose. Biomimetic humic substances induces positive effects on the plants tested, for an optimal concentration of 50 mg.L⁻¹ of carbon. The germination and rhizogenese of maize are stimulated in the presence of humic extracts. The effects of biomimetic humic substances also implies the stimulation of pelargonium flowering and the acceleration of vegetative phases of maize. These products seem to act on the speed of the plant growth mechanisms. The biomimetic humic substances supply induces a water economy by reducing water consumption of maize crop, and fulvic acids seem to be more effective than humic acids.

This work specifies the special interests of biomimetic humic substances, particularly concerning their possible application in horticultural and agricultural fields.

Keywords : Humic acids, fulvic acids, hydroponic culture, Pélargonium, maize