

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mes chers parents,*

*Mais aucune dédicace ne serait témoin de mon profond amour, mon immense gratitude et mon plus grand respect, car je ne pourrais jamais oublier la tendresse et l'amour dévouées par lesquelles ils m'ont toujours entouré depuis mon enfance. Puisse Dieu, le tout puissant, vous garder et vous procurer santé et bonheur.*

*A toute ma famille, frères et sœur,  
pour leur soutien moral.*

*A tous mes amis,*

*et à tous ceux que j'aime et à toutes les personnes qui m'ont prodiguées des encouragements et se sont données la peine de me soutenir durant cette formation.*

*A toute ma promotion et tout le corps professoral des sciences et technologies des aliments et à toute l'équipe de l'unité 15 du Centre de Recherche Agricole-Wallonie.*

*A toutes les personnes qui me sont chères.*

*Et à vous chers lecteurs.*

# Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance pour remercier cordialement mon promoteur **Mr Vincent BAETEN**, pour la confiance qu'il m'a témoignée en me proposant ce sujet.

Mes vifs remerciements vont également à **Mme Ouissam ABBAS** pour avoir encadré mon travail avec sa pertinence et sa patience qui m'ont guidées jusqu'au terme de ce travail. Ce travail est le fruit de votre encadrement fructueux, de vos précieux conseils et de votre patience malgré vos multiples obligations. Et je tiens aussi à vous dire que vous m'avez beaucoup apporté en termes d'expérience et de connaissances, merci pour tout.

Je remercie **Mr Quentin ARNOULD**, **Eric FONTAINE**, **Benoît SCAUT**, **Nicaise KAYOKA** et **Stephane BRICHARD** pour l'aide qu'ils m'ont apportée. Vos conseils avisés, vos qualités humaines et professionnelles, ont contribué au bon déroulement et à la réussite de ce travail.

Ma reconnaissance s'adresse à toute l'équipe de l'U15 Qualité des Produits, pour l'accueil chaleureux.

Ma gratitude va également à l'égard des honorables membres du jury pour leur généreuse disponibilité et pour l'intérêt qu'ils accordent au présent travail.

Egalement au corps professoral de la formation des sciences et technologies des aliments de l'Université Catholique de Louvain la neuve et Gembloux Agro-Bio Tech, toute l'expression de ma reconnaissance pour les efforts qu'ils ont déployés pour donner à cette formation son niveau escompté.

Je ne manquerai pas d'adresser mes vifs remerciements à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail en apportant des renseignements ou en acceptant de répondre à nos questions.

# Résumé

Au cours des dernières années, la spectroscopie de fluorescence a été de plus en plus utilisée comme approche alternative pour l'étude des substances humiques du sol. Le but de ce travail était dans un premier temps de différencier les échantillons selon l'origine géographique ou le système (modalité) de gestion, et en un second temps, établir un modèle pour la prédiction des paramètres physico-chimiques et de l'activité biologique des sols.

La caractérisation des sols a été effectuée au moyen de la spectroscopie de fluorescence par ses différents modes.

L'analyse des spectres a montré que les échantillons de la région d'Ardenne se caractérisent par des acides humiques ayant une structure légèrement plus condensés avec une humification élevée comparés aux sols provenant de Famenne et de Herve. L'application de l'ACP a permis d'ailleurs de différencier la région Ardenne des régions Famenne et Herve. Cependant, il n'était pas possible de différencier les échantillons en fonction de leurs modalités de gestion.

Le développement de modèles de régression pour la prédiction des paramètres physico-chimiques et de l'activité biologique caractéristiques des sols a montré, en général, qu'avec la validation croisée, nous obtenons un ratio de déviation standard compris entre 1,5 et 2, ce qui correspond à une erreur de prédiction égale à la moitié de l'erreur original.

**Mots clés :** acides humiques, spectroscopie de fluorescence, indice d'humification, ACP, PLS, RPD

# Abstract

In recent years, fluorescence spectroscopy has been increasingly used as an alternative approach for studying soil humic substances. The aim of this work was, to differentiate samples according to their geographical origin or their management system, but also to establish a model for predicting physicochemical parameters and soil biological activity.

Soil characterization was performed using the fluorescence spectroscopy using different modes.

The study of the spectra showed that the Ardenne samples are characterized by slightly more condensed humic acids with high humification, comparing to soils from Famenne and Herve. The application of the PCA has also differentiated Ardenne from Famenne and Herve. Nevertheless, it was not possible to discriminate samples according to their management system.

The development of regression models for predicting physicochemical parameters and the biological activity of soil characteristics showed that we get a standard deviation ratio between 1.5 and 2, which corresponds to a prediction error equal to half of the original error.

**Keywords:** humic acids, fluorescence spectroscopy, humification index, PCA, PLS, RPD

# Sommaire

Dédicace .....	I
Remerciements .....	II
Résumé .....	III
Abstract .....	IV
Liste des tableaux .....	VI
Liste des figures.....	VI
Liste des abréviations .....	VIII
I. Introduction générale.....	1
1. Contexte général et cadre du travail .....	1
2. Objectifs .....	2
II. Matériels et méthodes.....	3
1. Sites d'échantillonnage.....	3
2. Protocole utilisé.....	4
3. Analyses spectrofluorimétriques .....	8
4. Traitements de données .....	8
4.1. Prétraitement des données .....	9
4.2. Analyse en composantes principales (ACP).....	10
4.3. Régression basée sur les moindres carrés partiels (PLS) .....	11
III. Résultats et discussions .....	12
1. Spectres de fluorescence.....	12
2. Discrimination des acides humiques par ACP .....	17
2.1. Discrimination des régions et des types de gestion .....	19
2.2. Discrimination des modalités de gestion.....	22
3. Caractérisation des sols par régression PLS.....	23
3.1. Estimation des paramètres physico-chimiques.....	23
3.2. Estimation de l'activité biologique.....	26
3.3. Conclusion.....	29
IV. Conclusion générale .....	30
Références bibliographiques .....	32
Annexes.....	33

## Liste des tableaux

Tableau 1: Modalités de gestion de l'écosystème prairial (BIOECOSYS, 2015) .....	3
Tableau 2: Plan d'échantillonnage dans les différentes régions selon les modalités de gestion.....	4
Tableau 3: Valeurs du coefficient de corrélation R pour la prédiction des paramètres physico-chimiques .....	25
Tableau 4: Valeurs du coefficient de corrélation R pour la prédiction des paramètres de l'activité biologique (PropNH <sub>4</sub> et AmmoPot) .....	28
Tableau 5: Résumé des résultats obtenus par la régression PLS .....	29

## Liste des figures

Figure 1: Protocole d'extraction des acides humiques (Mouloubou et al. 2016).....	7
Figure 2: Présentation graphique de l'ACP (Baeten, 2015).....	10
Figure 3: Extraits d'acides fulviques (jaune pâle), d'acides humiques (brun foncé) et extraits au pyrophosphate de sodium (brun clair).....	12
Figure 4a: Spectres de fluorescence d'émission de l'ensemble des échantillons ( $\lambda_{ex} = 430$ nm).....	13
Figure 4b: Spectres de fluorescence d'émission, normalisés, moyens par région ( $\lambda_{ex} = 430$ nm) .....	14
Figure 5: Comparaison des moyennes de surfaces des spectres d'émission de chaque région.....	14
Figure 6a: Spectres de fluorescence en mode EES de l'ensemble des échantillons ( $\Delta\lambda = 18$ nm).....	15
Figure 6b: Spectres normalisés moyens de fluorescence EES par région ( $\Delta\lambda = 18$ nm) .....	16
Figure 7: Exemple d'une matrice de fluorescence d'excitation-émission 3D d'un AH de la région d'Ardenne.....	17
Figure 8 : Spectres de fluorescence d'émission identifiés selon leurs régions ( $\lambda_{ex} = 430$ nm) .....	18
Figure 9 : Spectres de fluorescence d'émission identifiés selon leurs types de gestion ( $\lambda_{ex} = 430$ nm) .....	18
Figure 10: Distribution des échantillons dans l'espace d'une ACP appliquée aux spectres de fluorescence d'émission normalisés.....	19
Figure 11: Loading en 2D des deux premières composantes de l'ACP sur la base des spectres de fluorescence d'émission normalisés .....	20
Figure 12: Distribution des échantillons dans l'espace d'une ACP appliquée aux spectres de fluorescence EES normalisés .....	21
Figure 13: Loading en 2D des deux premières composantes de l'ACP sur la base des spectres de fluorescence EES normalisés .....	22
Figure 14: Distribution des échantillons dans l'espace d'une ACP appliquée aux spectres de fluorescence EES.....	23

Figure 15: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de fluorescence d'émission par année pour la prédiction des différentes propriétés physico-chimiques.....	24
Figure 16: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de fluorescence EES par année pour la prédiction des différentes propriétés physico-chimiques.....	24
Figure 17: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de l'ensemble des échantillons par mode de fluorescence pour la prédiction des différentes propriétés physico-chimiques .....	25
Figure 18: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de fluorescence d'émission par année pour la prédiction des différents paramètres de l'activité biologique .....	26
Figure 19: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de fluorescence EES par année pour la prédiction des différents paramètres de l'activité biologique.....	27
Figure 20: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de l'ensemble des échantillons par mode de fluorescence pour la prédiction des différents paramètres de l'activité biologique.....	28

## Liste des abréviations

ACP	: Analyse en Composantes Principales
AF	: Acides fulviques
AH	: Acides humiques
AmmoPot	: Ammonification potentielle
CN	: Rapport carbone sur azote
CO <sub>2</sub> Em	: Dioxyde de carbone émis
Corg	: Carbone organique
Der 1	: Première dérivée
Der 2	: Deuxième dérivée
EES	: Excitation Emission Synchrone
ESR	: Electron Spin Resonance spectroscopy - spectroscopie de résonance de spin électronique
HCl	: Acide chlorhydrique
N <sub>2</sub>	: Azote
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	: Pyrophosphate de sodium
NaOH	: Hydroxyde de sodium
Norm	: Normalisation
PC	: Principal Component - Composante Principale
PLS	: Partial Least Square - Moindres Carrés Partiels
PropNH <sub>4</sub>	: Proportion N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
R	: Coefficient de corrélation
RespiPot	: Respiration potentielle
RPD	: Ratio of performance to deviation
$\lambda_{ex}$	: Longueur d'onde d'excitation



# **I. Introduction générale**

## **1. Contexte général et cadre du travail**

De nos jours, l'enjeu de l'agriculture est d'assurer non seulement une sécurité alimentaire, mais aussi des systèmes agricoles durables, protégeant nos ressources naturelles, robustes face aux changements climatiques, consommant moins d'énergie et émettant moins de gaz à effet de serre, en s'appuyant sur les écosystèmes et en les préservant.

Par ailleurs, dans le cadre des agro-écosystèmes (écosystèmes modifiés par l'homme à des fins de production), la connaissance de l'effet des différents modes de gestion sur les services éco systémiques est essentielle pour prendre des décisions adéquates et de permettre leur évaluation financière dans le cadre de la mise en place de nouvelles politiques publiques.

Dans ce contexte et face aux nouveaux besoins de recherche, l'ambition du projet BIOECOSYS (projet Moerman) porte sur l'élaboration d'une méthodologie et d'un outil permettant l'évaluation qualitative et quantitative des services éco systémiques rendus par l'agro-écosystème prairie en fonction de son mode de gestion et de son contexte territorial. Cette démarche constitue un élément clé de la mise en place d'une agriculture écologiquement intensive qui vise à mieux profiter des fonctionnalités de l'agro-écosystème pour produire plus, tout en préservant voir renforçant ses services environnementaux.

Ce projet est réalisé à travers deux thèses de doctorat dont nous citons celle de Morgan CAMPION qui porte sur l'étude de l'impact des modes de gestion agricole sur les services rendus par l'écosystème prairial. Plus particulièrement, elle vise à évaluer l'influence des pratiques agricoles sur la diversité, tant spécifique que fonctionnelle, de la flore et de la pédo-faune microbienne prairial, elles-mêmes influençant les services éco systémiques rendus par ces agro-écosystèmes.

Pour ce faire, un plan expérimental a été mis en place. Il comprend le prélèvement d'échantillons de sol, la réalisation de mesures physico-chimiques et microbiologiques en plus des analyses par les méthodes spectroscopiques.

Ce travail consiste à contribuer aux résultats du projet via l'exploitation de la matière organique du sol, en utilisant une méthode analytique basée sur la spectroscopie de fluorescence.

## **2. Objectifs**

Ce travail comprend deux objectifs : le premier consiste à reconnaître l'origine géographique et ses caractéristiques (type et modalité de gestion) d'un échantillon donné en utilisant son empreinte spectrale, et le deuxième objectif est de pouvoir évaluer les paramètres physico-chimiques et de l'activité biologique des sols sans devoir réaliser les analyses de référence qui peuvent être lourdes à mettre en œuvre, longues ou coûteuses.

Pour répondre à ces deux objectifs, des méthodes de traitements de données ont été appliquées sur les spectres de fluorescence obtenus par analyse spectrofluorimétrique des extraits d'acides humiques (AH). Les résultats trouvés sont présentés au niveau de la deuxième partie du présent document, mais avant, nous présentons la méthodologie adoptée dans ce travail.

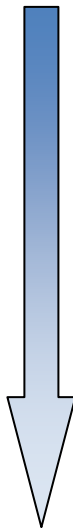

## II. Matériels et méthodes

### 1. Sites d'échantillonnage

Les échantillons ont été prélevés de trois régions pédoclimatiques distinctes : Ardenne, Fagne-Famenne et le Pays de Herve. Ces régions ont été sélectionnées pour leurs conditions édaphiques relativement homogènes et pour leur surface agricole utilisée, représentée majoritairement par les prairies permanentes et temporaires.

La sélection des sites a été réalisée en tenant compte à la fois du type de prairie, mais également du mode et des modalités (systèmes) de gestion allant du plus intensif au plus extensif. La description détaillée des différentes modalités de gestion étudiées est présentée dans l'annexe 1.

**Tableau 1: Modalités de gestion de l'écosystème prairial (BIOECOSYS, 2015)<sup>1</sup>**

Type de Gestion	Type de prairie	Modalités de gestion	ID	Intensité de gestion
1) Fauche	a. Temporaire (2 ou 3 ans)	3 ou 4 coupes/an + engrais minéraux et organiques	1a1	 Intensif Extensif
		3 ou 4 coupes/an + engrais de ferme (BIO)	1a2	
	b. Permanente	1 <sup>ère</sup> fauche +/- 20 mai (laitier)	1b1	
		3 ou 4 coupes/an + engrais de ferme (BIO)	1b5	
		1 <sup>ère</sup> fauche au 15 juin (allaitant)	1b2	
		1 <sup>ère</sup> fauche au 15 juin (MAE2 ou BIO)	1b3	
		MAE8 fauche tardive	1b4	
2) Pâturage		Continu intensif (allaitant)	2b1	 Intensif Extensif
		Tournant simple (allaitant)	2b2	
		MAE8 pâturage	2b3	

<sup>1</sup> BIOECOSYS, Approche méthodologique pour l'évaluation des services écosystémiques fournis par les agroécosystèmes : application aux modes de gestion conventionnels et biologiques des systèmes prairiaux, 2015, Rapport intermédiaire, Centre wallon de Recherches agronomiques

Les prélèvements ont été conduits sur deux saisons, 2014 et 2015. Elles étaient réalisées dans chacun des sites sélectionnés au sein d'une zone définie de 1 ha afin de limiter les variations intra-site liées à la nature du sol. La parcelle a été choisie dans une partie de la prairie où la composition du sol est la plus homogène en se basant sur la carte numérique des sols (logiciel RequaCarto).

Au sein des trois régions, les différentes modalités de gestion ont été étudiées suivant le plan d'échantillonnage suivant :

**Tableau 2: Plan d'échantillonnage dans les différentes régions selon les modalités de gestion**

	1a1	1a2	1b1	1b5	1b2	1b3	1b4	2b1	2b2	2b3
<b>Herve</b>			3				4			
<b>Ardenne</b>	3	3	3	3	3	3	4	3	3	4
<b>Famenne</b>			3			3	4			

## 2. Protocole utilisé

Afin d'extraire les substances humiques, un essai a été réalisé en utilisant deux méthodes décrites dans deux publications scientifiques. L'objectif était de déterminer celle à adopter pour l'ensemble des échantillons de ce projet.

La première étude menée par Prentice et Webb (2010), examinait les effets de différentes procédures d'extraction sur la signature de l'isotope carbone des fractions humiques de la matière organique du sol. L'isolation des acides humiques et des humines du sol a été effectuée en utilisant trois méthodes différentes : 1) une extraction par une solution de NaOH 0,5 M jusqu'à épuisement, 2) une extraction par une solution de NaOH 0,1 M + Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1M jusqu'à épuisement, et 3) une extraction par une solution de NaOH 0,1 M + Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1 M pour juste une journée.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes limités à tester l'extraction par une solution de NaOH 0,1 M + Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1 M. La durée totale de l'extraction est de 4 jours.

Le protocole est représenté dans l'annexe 2.

La deuxième étude menée par Mouloubou et al. (2016), avait pour but d'étudier la distribution de la matière organique du sol après l'entrée du compost dans la première couche d'un sol calcaire, et de suivre son évolution temporelle au cours d'une année d'expérimentation. Une procédure de fractionnement appropriée de la matière organique, consistant à des extractions séquentielles par l'eau ultra pure, l'acide chlorhydrique, l'hydroxyde de sodium et le pyrophosphate de potassium, a été appliquée. Pour des raisons de disponibilité, ce dernier a été remplacé par le pyrophosphate de sodium, dans notre cas.

La méthode de Mouloubou et al. (2016) consiste à agiter, à l'aide d'un agitateur orbital à 125 rpm, 10 g du sol avec 20 ml d'eau ultra-pure pendant 4h sous  $N_2$ . Après centrifugation et filtration, le premier résidu est séché pendant la nuit à  $40^\circ C$  et puis on lui ajoute HCl avec un ratio 1/5. Le mélange est agité pendant 1h sous  $N_2$ . Le second résidu obtenu est rincé par l'eau ultra-pure avant de lui ajouter NaOH et le tout est agité pendant 4h sous  $N_2$ . Le dernier résidu est agité avec du  $Na_4P_2O_7$ . Après chaque extraction, le mélange est centrifugé pendant 10 min à 4000 rpm puis filtré à l'aide d'un système de filtration avec une pompe à vide. Le deuxième, le troisième et le dernier surnageant sont conservés à  $4^\circ C$  jusqu'à analyse.

Le protocole est présenté dans la figure 1.

Les extraits d'AH obtenus par les deux méthodes ont été analysés par spectroscopie de fluorescence. Les spectres ont montré de légères différences au niveau intensité ainsi qu'au niveau du pic maximum (533 nm pour le protocole 1 et 528 nm pour le protocole 2). Mais contrainte de temps, la deuxième méthode a été choisie comme protocole d'extraction (durée totale d'extraction : 3 jours).

- **Réactifs chimiques :**

**Acide chlorhydrique (HCl) :** un liquide d'HCl concentré (37%) et d'une densité de 1,18 provenant de CARLROTH, a été utilisé pour préparer la solution de 0,1 M.

L'HCl sert à éliminer les carbonates de calcium.

**Hydroxyde de sodium (NaOH) :** la solution a été préparée à partir de pastilles d'hydroxyde de sodium provenant de MERCK d'une masse moléculaire de 40 g/mol et d'une pureté de 99%.

NaOH est capable de détruire des liaisons organo-minérales.

**Pyrophosphate de sodium ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7, 10 \text{ H}_2\text{O}$ )** : la forme solide, de CARLROTH, utilisée pour préparer la solution a une masse moléculaire de 446,07 g/mol, une densité de 1,82 et une pureté supérieure ou égale à 99%.

C'est un agent chélateur couramment utilisé pour extraire les substances organiques associées à des cations métalliques dans le sol. Il affecte la liaison des complexes avec les sites métalliques sur les argiles et peut solubiliser les complexes à forte teneur métallique.

Afin d'estimer le rendement massique d'extraction des AH, une lyophilisation d'un tiers des échantillons (sélectionné de façon aléatoire) a été réalisée.

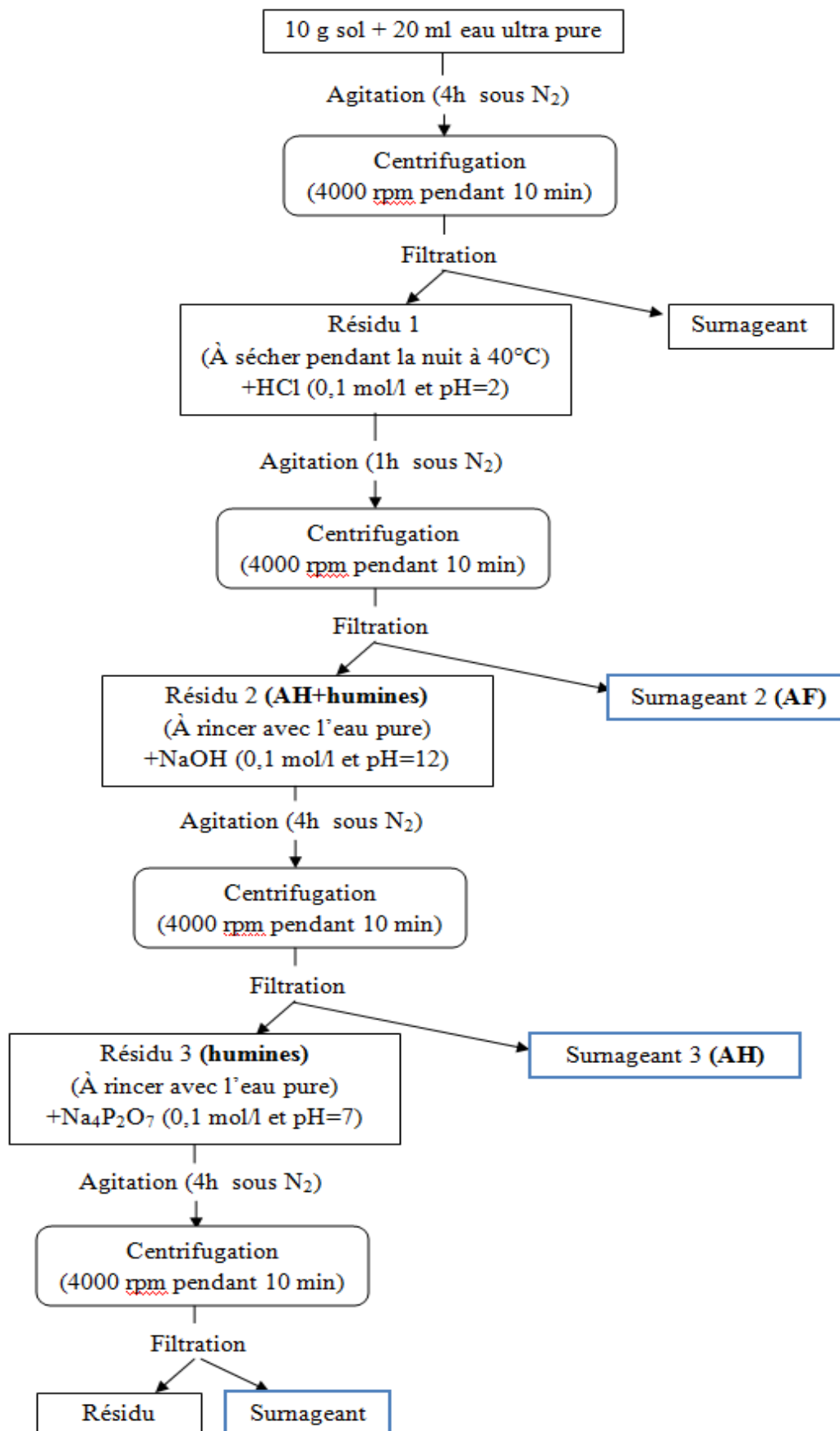


Figure 1: Protocole d'extraction des acides humiques (Mouloubou et al. 2016)

### **3. Analyses spectrofluorimétriques**

Les mesures en spectroscopie de fluorescence sont effectuées avec un spectrofluorimètre FluoroMax-4 (HORIBA, Pays-bas) équipé d'une lampe au xénon de 150 W. Des analyses en double sont réalisées sur des solutions d'acides humiques AH dans des cuves en quartz de 1 cm à température ambiante. L'acquisition des données a été faite au moyen du logiciel FluorEssence (v3.5).

Les solutions d'AH sont diluées 7 fois avec NaOH afin d'éviter le problème de saturation des bandes et rester dans le domaine de linéarité de la technique. Le maximum d'intensité de la fluorescence ne doit pas dépasser 1 million CPS (spécifications de l'appareil).

La caractérisation de la matière organique par spectroscopie de fluorescence a été réalisée en utilisant les trois différents modes. En se basant sur les travaux réalisés par González Pérez et al. (2004) et Mouloubou et al. (2016), des essais ont été entrepris afin de choisir les paramètres pour la fluorescence.

Les spectres de fluorescence de nos échantillons en mode d'excitation-émission synchrone EES ont été mesurés en effectuant un scan des longueurs d'onde d'excitation et d'émission simultanément sur la plage allant de 200 à 700 nm par pas (incrément) de 5nm, tout en gardant constant un intervalle de longueur d'onde (offset) de 18 nm. L'ouverture des monochromateurs (slit) pour l'excitation et l'émission était fixée à 4 nm.

Les spectres d'émission ont été obtenus dans la gamme de longueurs d'onde allant de 450 à 700 nm à une excitation fixe de 430 nm, avec une incrémentation de 5 nm et un slit de 4 nm pour l'excitation ainsi que l'émission. Le degré d'humification des acides humiques, qui représente le rendement de la transformation en humus stable des matières organiques, a été estimé selon la surface totale en dessous de la bande spectrale (González Pérez et al. 2004).

Les matrices d'excitation-émission 3D ont été obtenues en balayant simultanément les spectres d'excitation de 350 à 650 nm et les spectres d'émission 400 - 700 nm, avec une incrémentation de 5 nm et un slit de 5 nm pour les deux types de spectres.

### **4. Traitements de données**

Afin d'extraire l'information significative des données spectrales, des traitements chimiométriques ont été appliqués en utilisant le logiciel Unscrambler X (v10.3):

- L'Analyse en Composantes Principales (ACP) : C'est une méthode basée sur les ressemblances et dissemblances entre les échantillons, elle est donc utile pour différencier les sols en fonction des régions ou des modalités de gestion.



- La régression basée sur les moindres carrés partiels (Partial Least Square - PLS) : elle permet d'estimer les valeurs de composition chimique/activité biologique des sols en mettant en relation les spectres collectés aux valeurs de référence.

Ces traitements ont été appliqués sur les spectres de fluorescence d'émission et EES moyens (moyenne des deux mesures pour chaque échantillon) selon trois matrices de données. La première contient les échantillons prélevés en 2014, la deuxième regroupe ceux prélevés en 2015 et la dernière présente l'ensemble des échantillons.

Au niveau de la régression basée sur les moindres carrés partiels (PLS), des modèles ont été élaborés sur les trois matrices cités en utilisant la validation croisée, afin de prédire des paramètres physico-chimiques (Corg et CN) et ceux de l'activité biologique (CO<sub>2</sub>Em, RespiPot, PropNH<sub>4</sub> et AmmoPot). Le choix de ces paramètres est basé sur le fait que les analyses spectrofluorimétriques ont été faites sur la fraction organique du sol. La détermination de ces paramètres par des méthodes de référence a été réalisée par d'autres laboratoires dans le cadre des activités du projet BIOECOSYS.

Afin de vérifier la robustesse des modèles établis sur des sets indépendants d'échantillons, une méthode duplex (développée sous Matlab) a été appliquée pour sélectionner les bases de calibration et de prédiction. La procédure consiste à construire un modèle de calibration à partir de deux tiers des échantillons et le valider avec le tiers qui reste.

#### **4.1.Prétraitement des données**

Avant d'analyser les données, un prétraitement est généralement réalisé afin d'éliminer (ou atténuer) les biais dues à des perturbations non-chimiques de l'information spectrale. Parmi les nombreuses méthodes de prétraitement, nous nous sommes limités à l'utilisation de la normalisation et de la dérivée.

##### **➤ Normalisation des spectres**

La normalisation est appliquée pour corriger les effets des multiples interférences relatifs à la taille et à la dispersion des particules. Elle standardise chaque spectre individuellement en utilisant uniquement les données de ce spectre, et donc elle accorde à tous les spectres enregistrés la même importance informative.

Il existe différentes méthodes de normalisation, parmi lesquelles la normalisation surface qui a trouvé place dans notre étude. Cette transformation normalise le spectre en calculant l'aire sous la courbe dans le but de réduire les variations d'intensité générale, l'aire sous la courbe devient donc identique pour tous les échantillons.

### ➤ Dérivée

Les dérivées sont appliquées pour corriger les effets de base dans les spectres dans le but d'éliminer les effets non chimiques et à créer des modèles d'étalonnage/calibration robustes. Les dérivées peuvent également aider à résoudre des bandes superposées/chevauchées qui peuvent fournir une meilleure compréhension des données, mettant l'accent sur les petites variations spectrales qui ne sont pas évidentes dans les données brutes.

La dérivée première du spectre est simplement une mesure de la pente de la courbe spectrale en chaque point. La pente n'est pas affectée par les variations de la ligne de base, et donc c'est une méthode très efficace pour enlever les déplacements linéaires classiques.

La dérivée seconde est une méthode très performante pour enlever les variations au niveau de la pente d'un spectre en mesurant les modifications de celle-ci en chaque point.

## 4.2. Analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode descriptive. Elle a pour but de synthétiser l'information contenue dans un tableau de  $p$  variables quantitatives (longueurs d'ondes) mesurées sur  $n$  individus (spectres des échantillons) à travers des représentations graphiques à deux dimensions (figure 2). Les axes de ces graphiques correspondent à de nouvelles variables appelées composantes principales, obtenues à partir de combinaisons linéaires des  $p$  variables initiales.

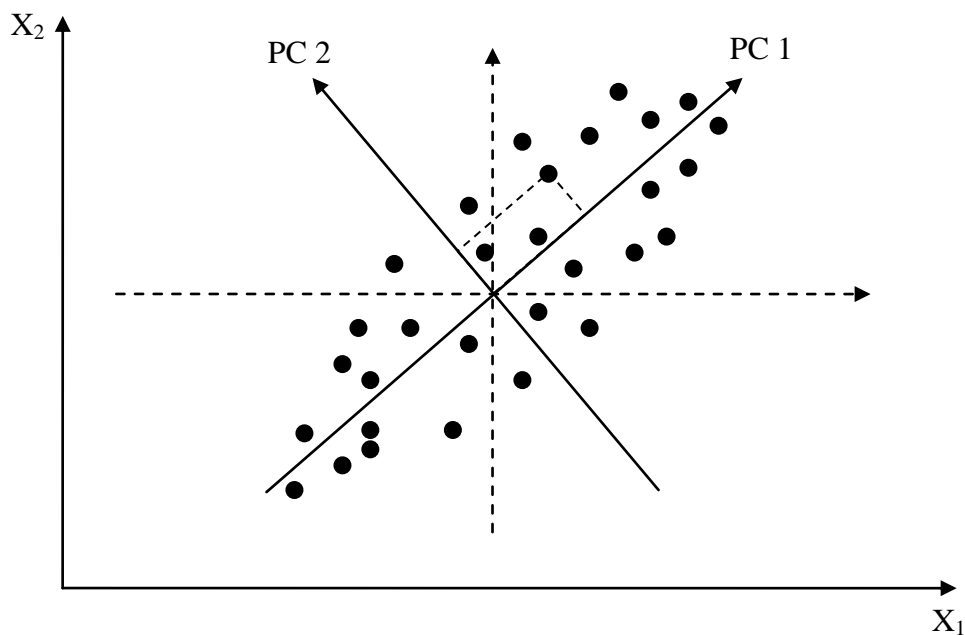


Figure 2: Présentation graphique de l'ACP (Baeten, 2015)

Les composantes principales ne présentent plus de corrélation entre elles et sont ordonnées en termes de pourcentage de variance expliquée par chaque composante. Ainsi, la première composante extrait la plus grande source de variance et la seconde fournit la plus grande information possible complémentaire de la première. Le processus continue et reste le même ; l'information expliquée diminue jusqu'à obtention du bruit aléatoire (Abbas 2007).

L'interprétation des composantes principales extraites comprend généralement deux étapes. La première consiste à examiner l'inertie de chaque composante principale dans le nuage de points. Cette inertie est estimée par les valeurs propres.

La deuxième étape consiste à examiner les éléments contribuant à construire et définir les composantes principales extraites. Ces éléments sont notamment décrits par les graphiques, les valeurs propres « scores » pour les individus et les composantes principales « loadings » pour les variables.

Le graphique des scores montre la corrélation existante entre les objets. Il montre s'il existe des différences entre les objets et des groupes. Tandis que le graphique des loadings indique quelles variables contribuent à chacune des composantes principales (Baeten 2015).

### **4.3. Régression basée sur les moindres carrés partiels (PLS)**

La régression basée sur les moindres carrés partiels est une méthode prédictive utile lorsqu'il y a plusieurs facteurs colinéaires.

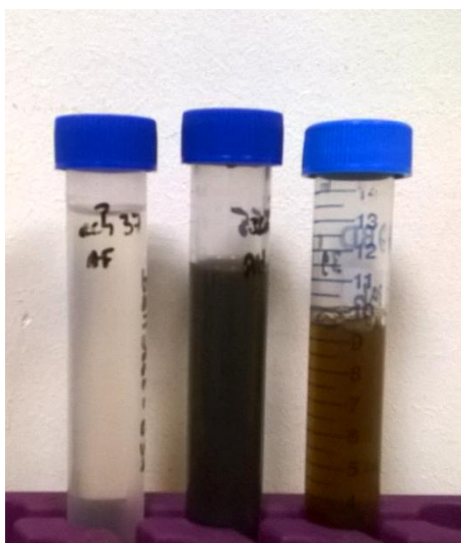
C'est une méthode introduite par Wold en 1966, qui consiste à établir une régression entre la variable à prédire dite variable à expliquer dépendante (propriété physico-chimique), avec des données spectrales dites variables latentes ou explicatives et indépendantes (mesures spectroscopiques) (Abbas 2007). Elle construit ses facteurs en tenant compte de la corrélation entre les variables prédictives X et les variables prédites Y.

Des modèles ont été développés mais pour pouvoir présenter leurs performances de façon simple et claire nous avons calculé ce qu'on appelle RPD (ratio of performance to deviation) qui est un ratio de la déviation standard des valeurs de référence et l'erreur produite à partir des spectres. Les valeurs RPD sont ensuite classées pour informer sur les performances des modèles :

- **Les valeurs inférieures à 1,5** indiquent une mauvaise prédiction,
- **Les valeurs entre 1,5 et 2** montrent que l'erreur de prédiction est la moitié de l'erreur originale,
- **Les valeurs entre 2 et 2,5** indiquent une prédiction quantitative approximative,
- **Les valeurs incluses entre 2 et 2,5 ou supérieures à 2,5** montrent une excellente précision de prédiction.

### III. Résultats et discussions

L'extraction séquentielle par les différents réactifs nous a permis de récupérer trois différents surnageants de couleurs bien distinctes caractéristiques de la fraction de substances humiques mise en évidence en solution. Les différentes fractions des substances humiques que nous avons extraites des sols sont présentées dans la figure 3. Les analyses sont réalisées sur les solutions d'acides humiques AH (de couleur brune) qui représentent en moyenne 5% de la masse du sol utilisée pour l'extraction. Les extraits d'AH ont été dilués 7 fois avec NaOH.



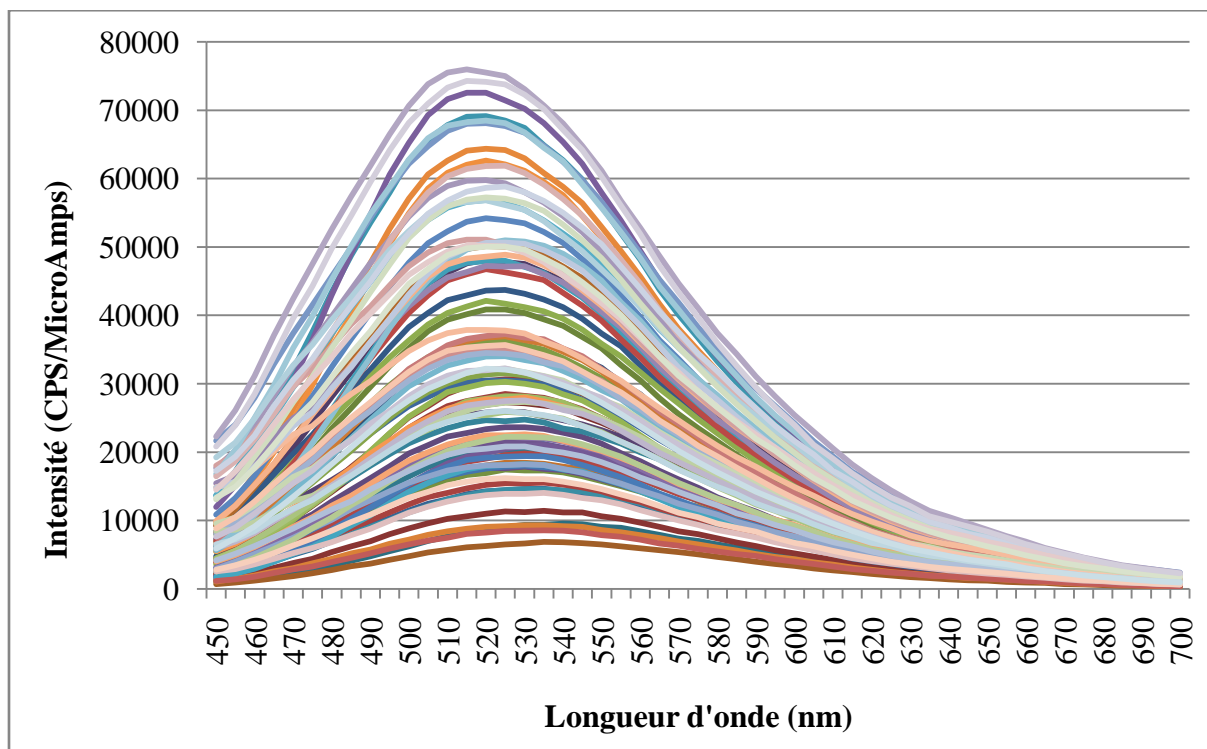
**Figure 3: Extraits d'acides fulviques (jaune pâle), d'acides humiques (brun foncé) et extraits au pyrophosphate de sodium (brun clair)**

Dans ce chapitre, nous présentons en première partie les spectres obtenus avec les trois modes de fluorescence avec le degré d'humification estimé pour chaque région au niveau de la fluorescence d'émission. En deuxième partie, sont présentés les résultats de l'ACP dont le but est de différencier les sols en fonction des régions ou des modalités de gestion/type de prairie, et en dernière partie, nous trouvons les résultats de la prédiction des paramètres physico-chimiques et de l'activité biologique du sol par PLS.

#### 1. Spectres de fluorescence

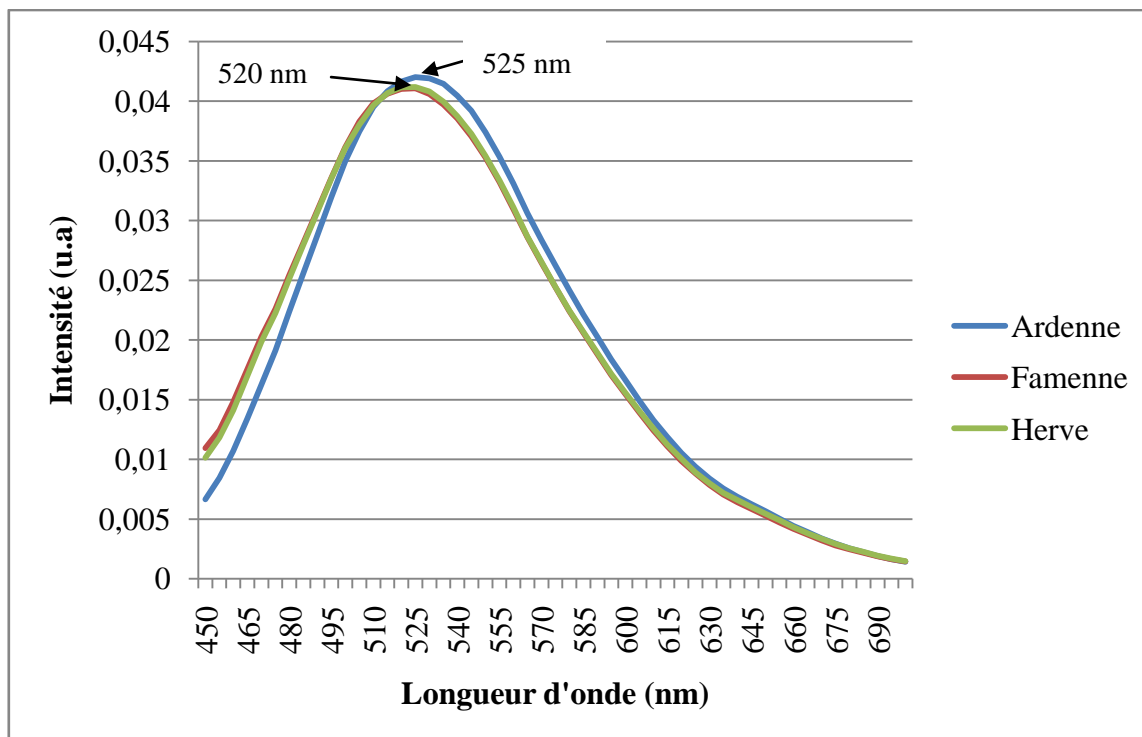
Les figures 4 et 6 montrent les spectres d'émission et en mode excitation-émission synchrone obtenus par analyse en spectroscopie de fluorescence de l'ensemble des acides humiques extraits des échantillons des sols.

Tous les spectres d'émission de fluorescence, pour une excitation à 430 nm, étaient similaires pour les différentes régions et ont montré une large bande unique s'étendant de 450 à 600 nm avec un maximum d'intensité qui correspond à une longueur d'onde variant de 515 à 525 nm (figure 4a). Ces valeurs de longueurs d'onde concordent bien avec les données rapportées dans la littérature (Bayer et al. 2002; González Pérez et al. 2004). Ces derniers ont obtenus des spectres d'émission s'étalant de 470 nm à 600 nm et de 480 nm à 600 nm respectivement, pour une longueur d'onde d'excitation égale à 436 nm.



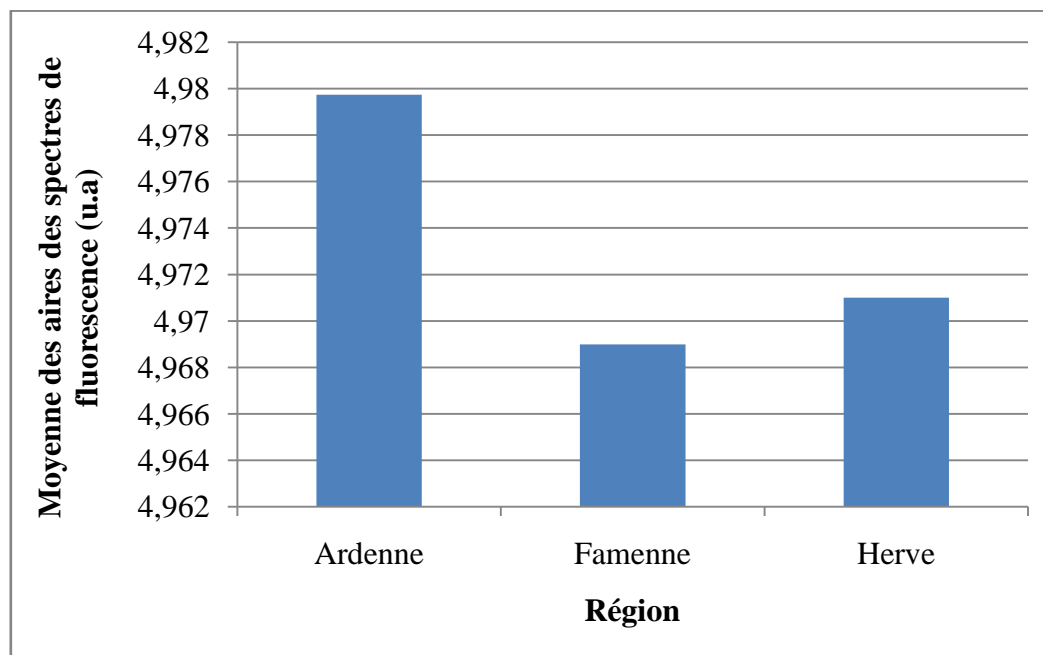
**Figure 4a: Spectres de fluorescence d'émission de l'ensemble des échantillons ( $\lambda_{\text{ex}} = 430$  nm)**

Dans la figure 5b qui montre les spectres d'émission moyens de chaque région, nous remarquons que la région d'Ardenne présente un léger shift par rapport aux deux autres régions ainsi qu'une intensité plus élevée. Selon la littérature tant que les molécules fluorescentes deviennent plus condensées, leur spectre d'émission aura tendance à se déplacer vers des longueurs d'onde plus élevées (Milori et al. 2002), nous pouvons donc dire que les échantillons de la région d'Ardenne se caractérisent par des acides humiques ayant une structure légèrement plus condensés avec une humification élevée comme le montre la figure 5 (en accord avec Bayer et al. (2002)).



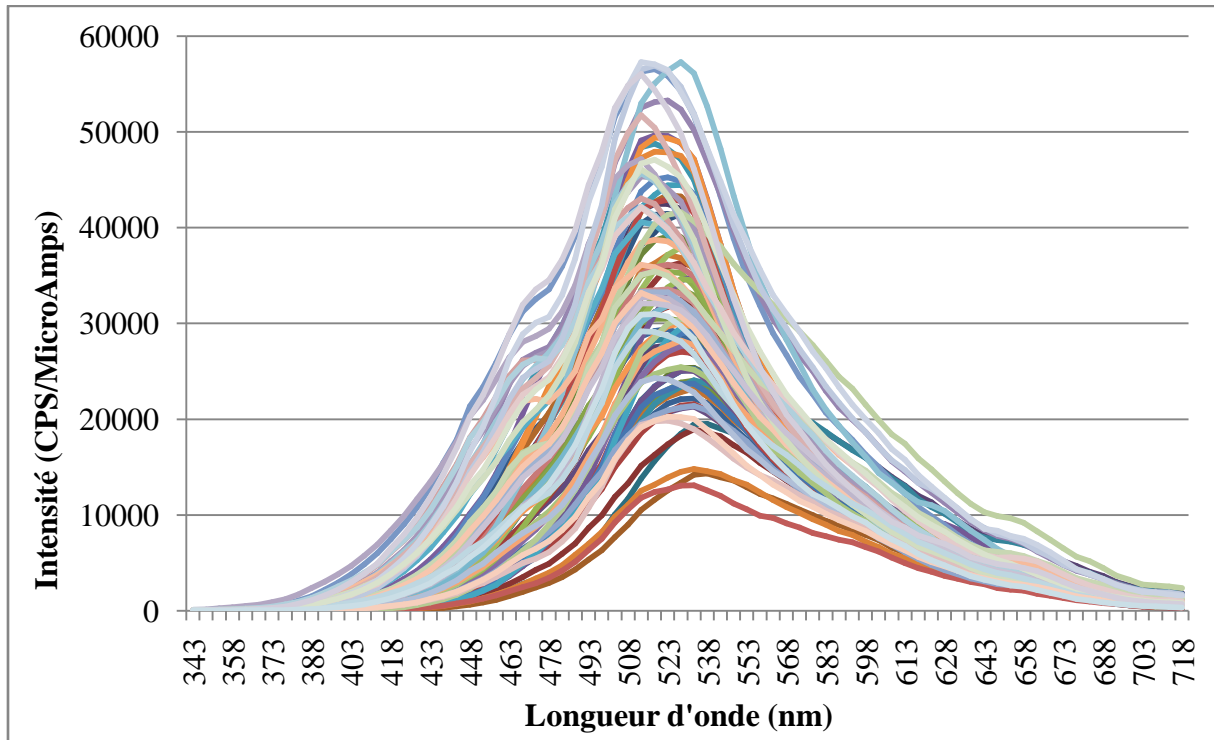
**Figure 5b: Spectres de fluorescence d'émission, normalisés, moyens par région ( $\lambda_{ex} = 430$  nm)**

En effet, l'observation de la figure ci-dessous montre que la moyenne des aires sous le spectre est différente selon l'origine des sols avec une valeur nettement plus élevée accordée aux échantillons d'Ardenne indiquant un indice d'humification plus élevé pour ces derniers.



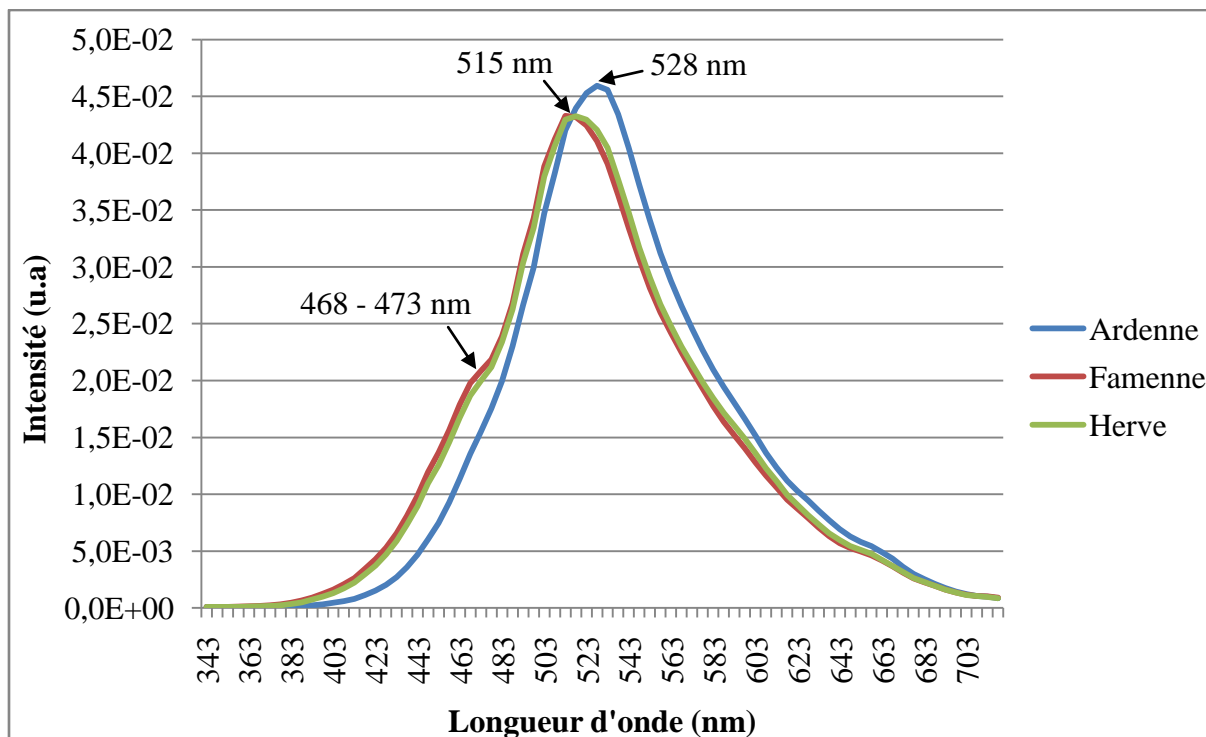
**Figure 5: Comparaison des moyennes de surfaces des spectres d'émission de chaque région**

Les spectres de fluorescence en mode synchrone ont une bande majeure à 513 - 533 nm avec un faible épaulement à 468 - 473 nm (figure 6a). Cette bande est caractéristique de composés de haut degré d'humification qui sont relativement enrichis en groupes carboxyliques et phénoliques (Shirshova et al. 2009).



**Figure 6a: Spectres de fluorescence en mode EES de l'ensemble des échantillons ( $\Delta\lambda=18$  nm)**

Dans la figure 6b, un shift accompagné d'une différence d'intensité entre le spectre de la région d'Ardenne et celui de Famenne et d'Herve peut être remarqué, ainsi que l'absence de l'épaulement au niveau d'Ardenne par rapport aux deux autres régions. Selon Milori et al. (2002), ce changement dans l'intensité de fluorescence maximale des plus courtes aux plus longues longueurs d'onde est associé à une augmentation du nombre de noyaux aromatiques à haut degré de substitution et / ou avec un système insaturé conjugué doté d'un degré élevé de résonance. Ces derniers ont utilisé la quantification des radicaux libres de type semiquinone par spectroscopie de résonance de spin électronique (ESR) comme indicateur pour évaluer le degré d'humification de la matière organique du sol. Une bonne corrélation entre l'humification avancée et la spectroscopie ESR a été observée. Cette corrélation montre que les structures aromatiques complexes et condensées sont censées stabiliser les radicaux libres de type semiquinone dans l'humus.



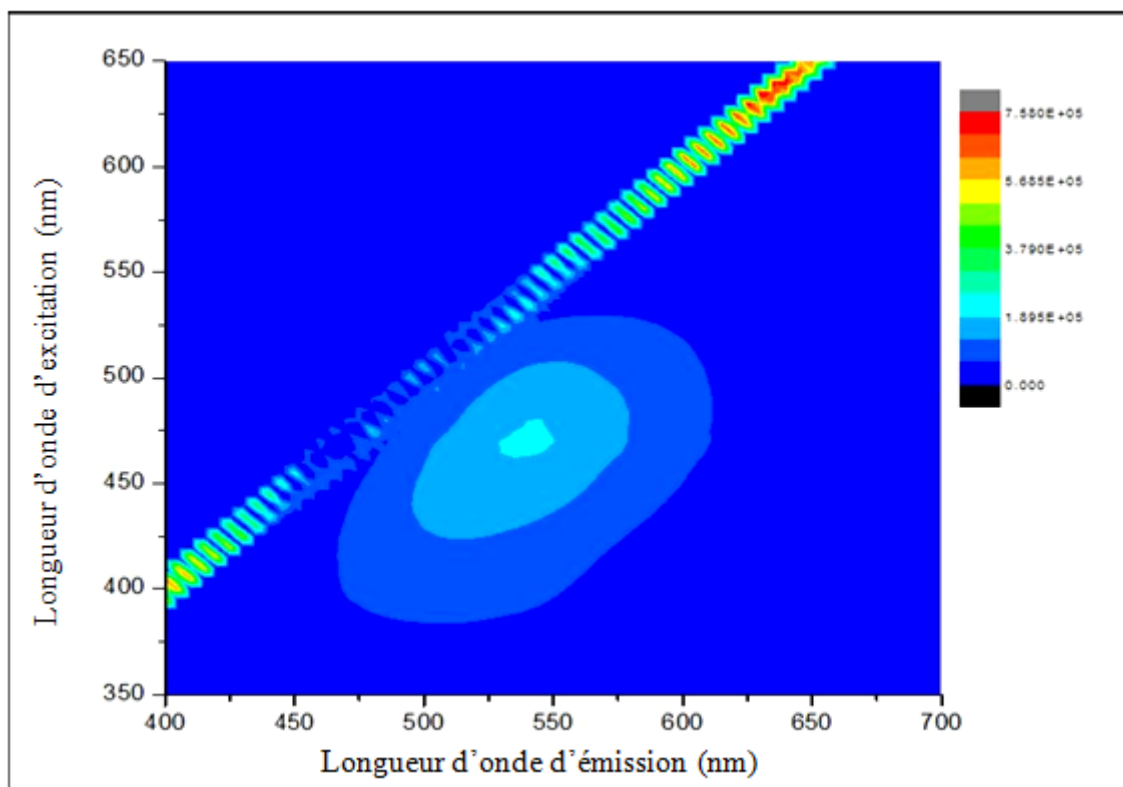
**Figure 7b: Spectres normalisés moyens de fluorescence EES par région ( $\Delta\lambda=18$  nm)**

Afin d'avoir une vue globale sur la fluorescence des AH des sols étudiés, nous avons réalisé une cartographie en 3D. Les spectres tridimensionnels valident le choix de la longueur d'onde d'excitation pour les spectres d'émission, vu qu'en balayant simultanément les spectres d'excitation et les spectres d'émission sur une grande plage de longueurs d'onde allant de 350 nm à 650 nm pour l'excitation et de 400 nm à 700 nm pour l'émission, on obtient un pic ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) correspondant à la position 400 - 550 nm / 470 - 600 nm avec un maximum à 470 / 550 nm (figure 7) . Selon la littérature (Matthews et al. 1996; Lakowicz 2006; Yang et al. 2016), cette surface concorde avec l'un des pics caractéristiques de la riboflavine (450 / 525 nm) obtenus par une fluorescence 3D dans une plage d'excitation/émission de 200 - 550 nm / 450 - 650 nm.

Nous pouvons dire alors que nos AH sont composés de molécules dont la structure est similaire à celle de la riboflavine.

Nous trouvons ci-dessous un exemple d'une carte de fluorescence d'un échantillon de la région d'Ardenne.

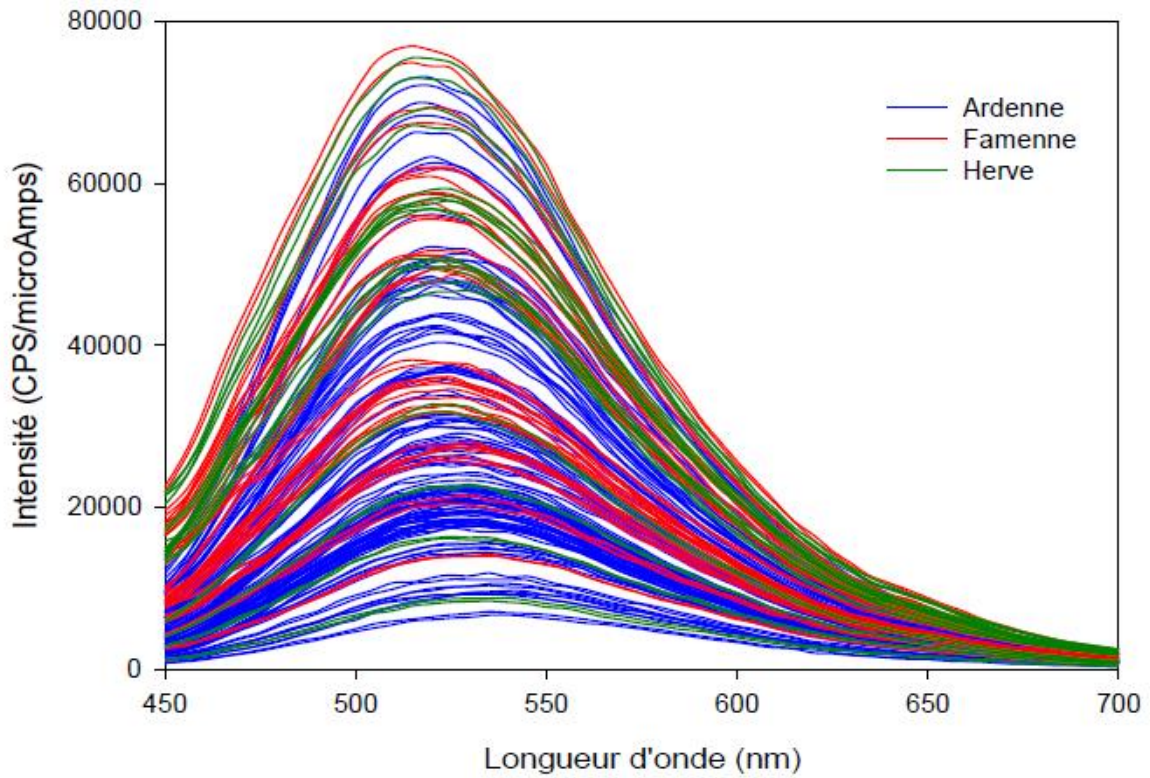




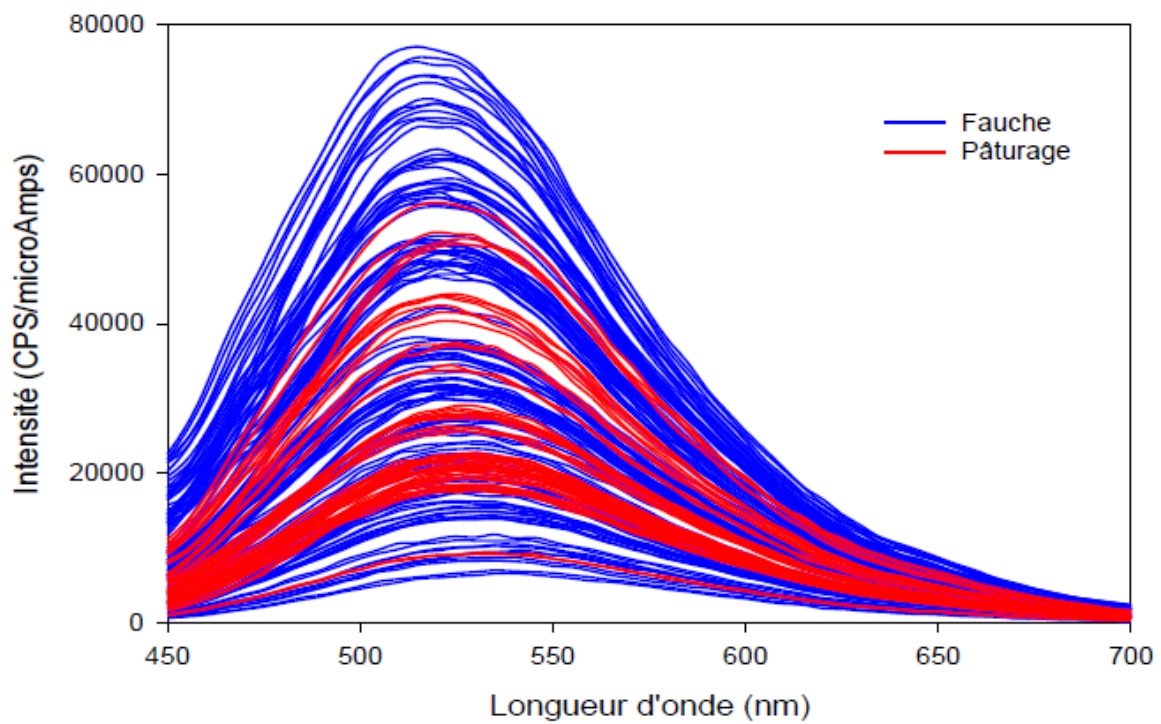
**Figure 7: Exemple d'une matrice de fluorescence d'excitation-émission 3D d'un AH de la région d'Ardenne**

## **2. Discrimination des acides humiques par ACP**

En observant les spectres de fluorescence (émission et EES) des extraits d'AH, où des catégories en fonction des régions sont mises en avant sur la figure 8 et en fonction des types de gestion sur la figure 9, nous remarquons la difficulté de différencier les échantillons d'où la nécessité de l'ACP.



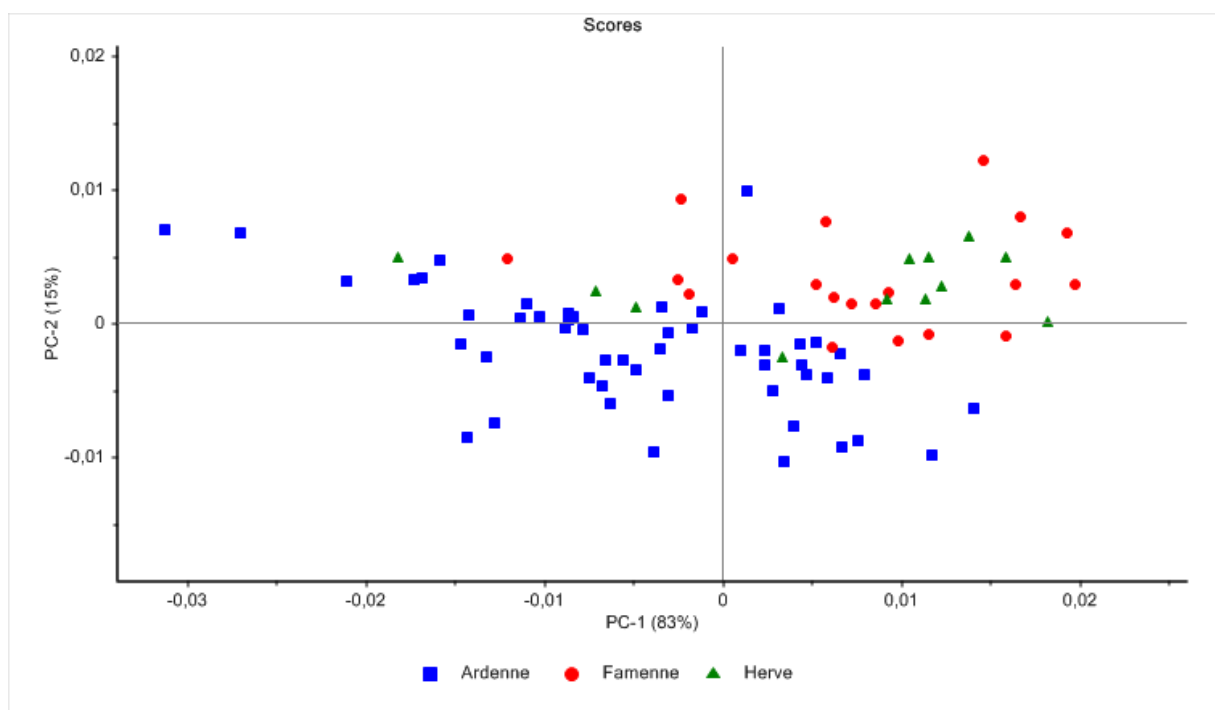
**Figure 8 : Spectres de fluorescence d'émission identifiés selon leurs régions ( $\lambda_{ex} = 430$  nm)**



**Figure 9 : Spectres de fluorescence d'émission identifiés selon leurs types de gestion ( $\lambda_{ex} = 430$  nm)**

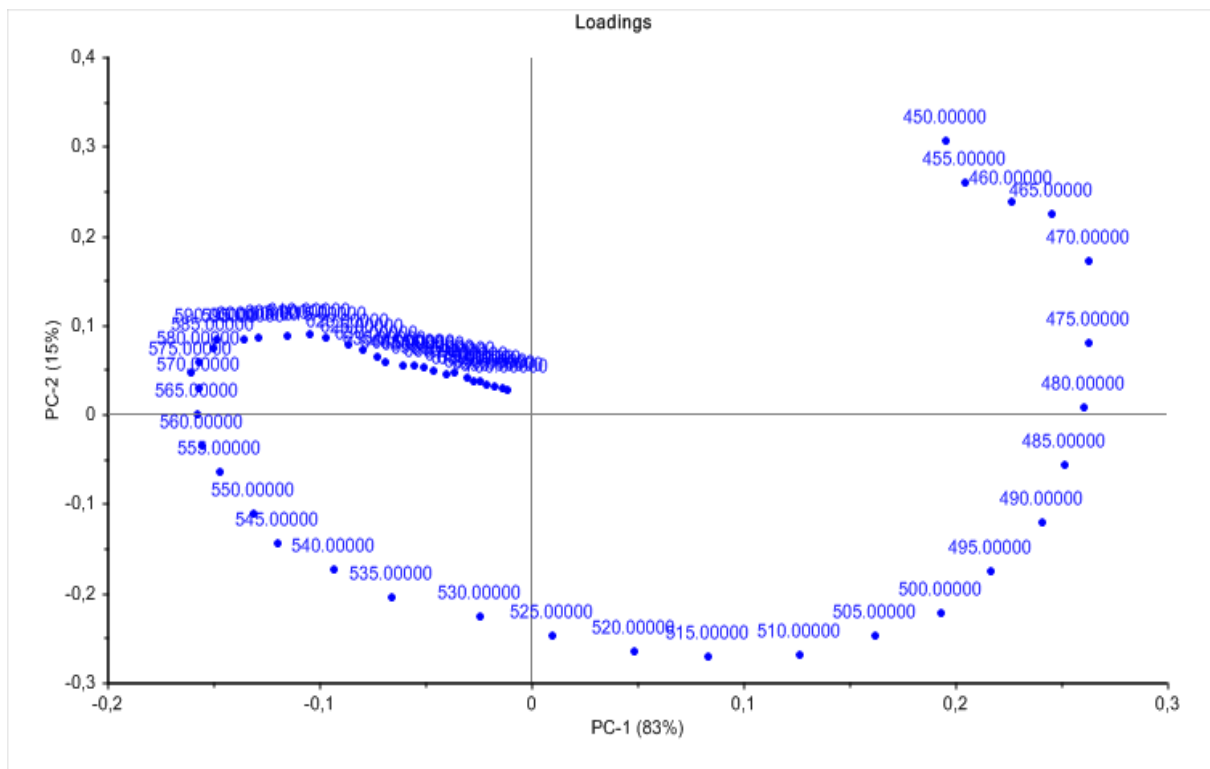
## 2.1. Discrimination des régions et des types de gestion

L'application de l'ACP sur les spectres (normalisés) de fluorescence d'émission de l'ensemble des échantillons (2014 et 2015) a abouti à une répartition selon les deux premières composantes (PC1 et PC2) qui représentent 98% de la variance, selon lesquelles une différenciation des échantillons de la région d'Ardenne par rapport à ceux de la région de Famenne et de Herve a été constatée. Les échantillons de la région d'Ardenne se trouvent principalement sur la partie négative de la PC2, tandis que ceux de la région Famenne et Herve se chevauchent principalement sur la partie positive de PC1 et PC2 (figure 10).



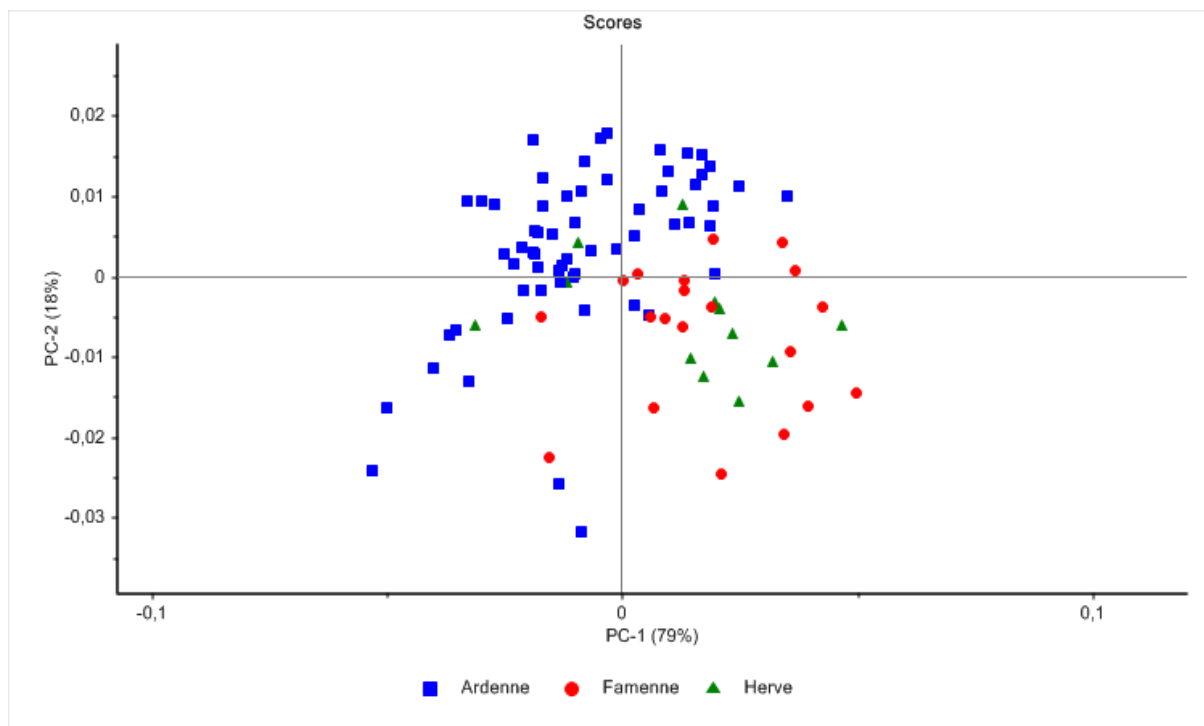
**Figure 10: Distribution des échantillons dans l'espace d'une ACP appliquée aux spectres de fluorescence d'émission normalisés**

D'après le loading en 2D associé aux deux premières composantes (figure 11) permettant de révéler les longueurs d'onde significatives responsables de la répartition observée sur le graphe de l'ACP ci-dessus, nous constatons que les AH d'Ardenne sont plus composés de structures qui absorbent entre 485 et 555 nm, alors que ceux de Famenne et de Herve contiennent plus des composés qui absorbent entre 450 et 480 nm. Ceci correspond aux résultats trouvés précédemment, qui montrent que les échantillons de la région d'Ardenne se caractérisent par des acides humiques ayant une structure légèrement plus condensés en noyaux aromatiques avec une humification élevée.



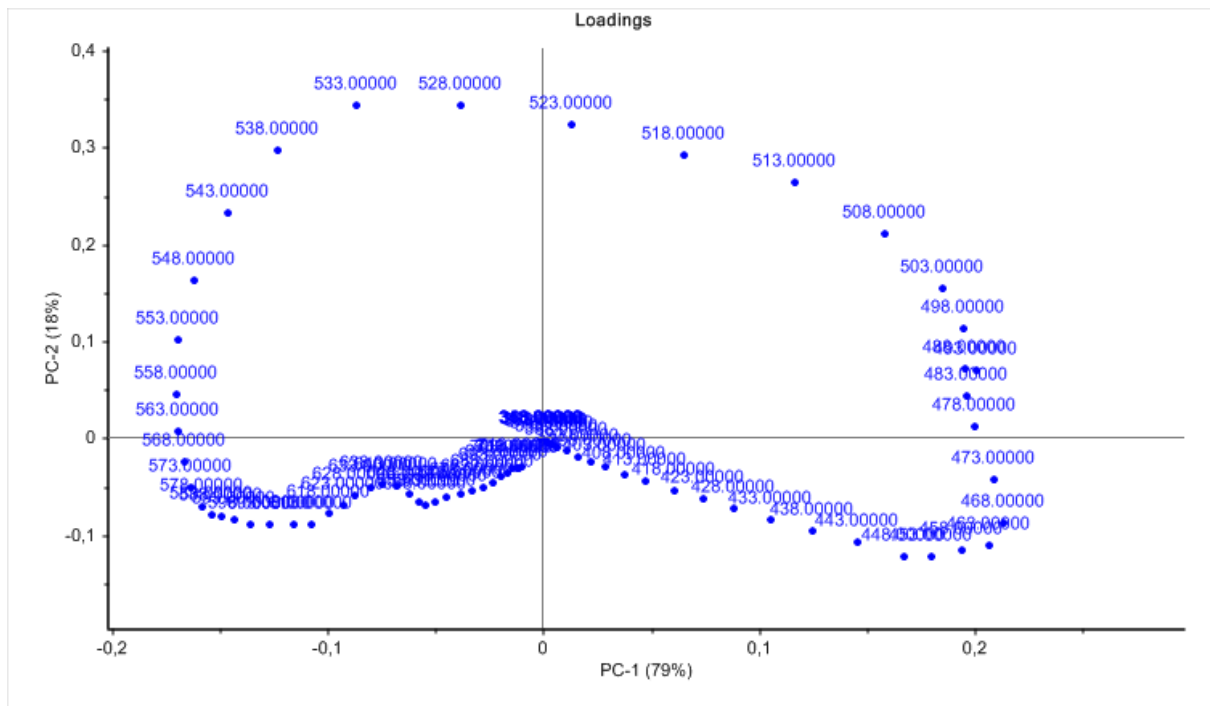
**Figure 11: Loading en 2D des deux premières composantes de l'ACP sur la base des spectres de fluorescence d'émission normalisés**

L'ACP a été ensuite appliquée aux spectres normalisés de fluorescence EES. Les résultats obtenus avec les deux premières composantes expliquant 97 % de la variance totale, donnent toujours une différenciation des échantillons de la région d'Ardenne par rapport à ceux de la région de Famenne et de Herve. Les échantillons de la région d'Ardenne se trouvent principalement sur la partie positive de la PC2, tandis que ceux de la région Famenne et Herve se chevauchent principalement sur la partie positive de PC1 et négative de PC2 (figure 12).



**Figure 12: Distribution des échantillons dans l'espace d'une ACP appliquée aux spectres de fluorescence EES normalisés**

D'après le loading en 2D associé aux deux premières composantes (figure 13), nous constatons que les AH de Famenne et de Herve sont caractérisés par des composés qui absorbent entre 443 et 473 nm, alors que les AH de la région d'Ardenne sont plus composés de structures absorbant à des longueurs d'onde plus longues. Ceci correspond au faible épaulement (468 - 473 nm) observé au niveau des spectres moyens de fluorescence EES des échantillons de Famenne et de Herve, et absent au niveau d'Ardenne (figure 6b).

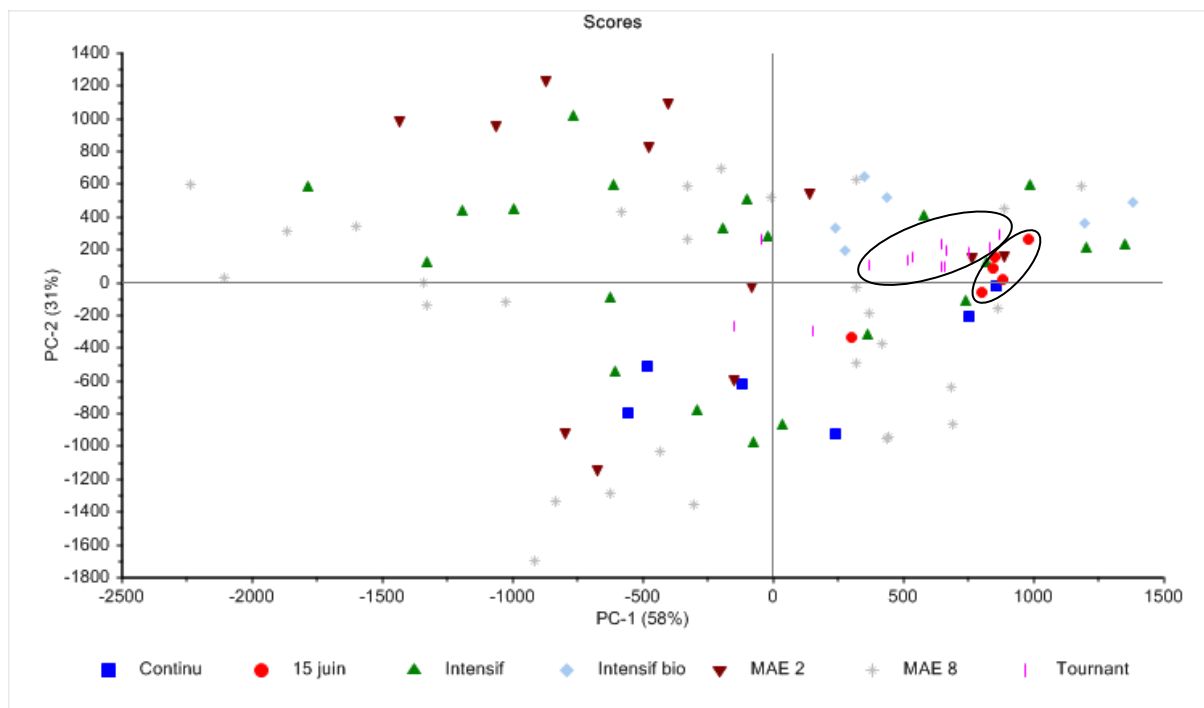


**Figure 13: Loading en 2D des deux premières composantes de l'ACP sur la base des spectres de fluorescence EES normalisés**

Par ailleurs, l'application d'une ACP sur les spectres n'a pas permis, par contre, de différencier les sols selon les types de gestion (données non présentées).

## 2.2. Discrimination des modalités de gestion

L'application de l'ACP sur les spectres de fluorescence (émission et EES), peu importe le prétraitement utilisé, n'a pas permis de différencier entre les différentes modalités de gestion. Cependant, nous observons que, les échantillons appartenant à la modalité de gestion « tournant » ainsi que ceux de la « fauche 15 juin », forment leurs propres groupes, sans qu'ils soient écartés des autres (figure 14).



**Figure 14: Distribution des échantillons dans l'espace d'une ACP appliquée aux spectres de fluorescence EES**

Sur la base de ce constat, il semble que les AH ne semblent pas être affectés de façon permettant leur différenciation sur la base de leurs structures fluorescentes. L'analyse de cette fraction des sols par d'autres techniques pourrait permettre de mieux voir l'influence des différents systèmes de gestion sur cette partie du sol.

### 3. Caractérisation des sols par régression PLS

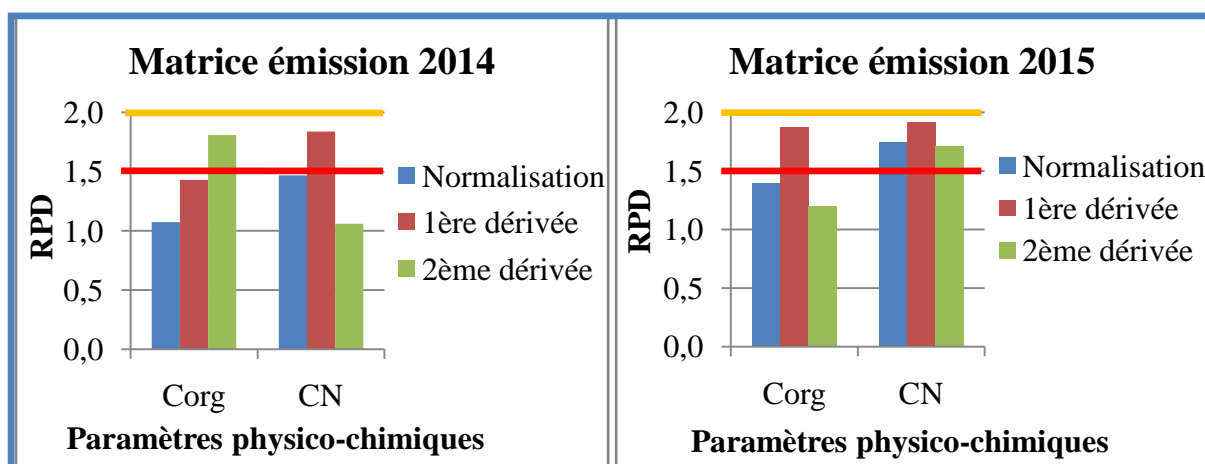
Les spectres de fluorescence d'émission et de synchrone des AH extraits ont été corrélés aux propriétés physico-chimiques et biologiques mesurées par des méthodes de référence.

Les résultats sont présentés en forme d'histogrammes permettant de comparer les performances des différents prétraitements appliqués pour obtenir une meilleure prédiction des paramètres étudiés, et ceci selon l'année de prélèvement des échantillons et selon le mode de fluorescence.

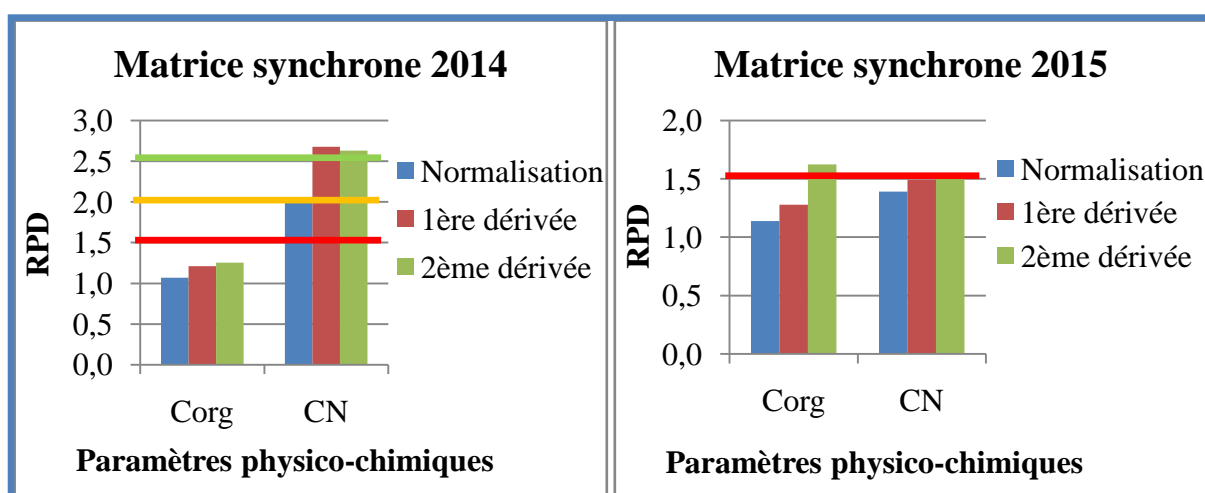
#### 3.1. Estimation des paramètres physico-chimiques

Pour les paramètres physico-chimiques, nous nous sommes intéressés au carbone organique (Corg) et au rapport carbone-azote (CN). Les résultats obtenus sont présentés sur les figures suivantes.

Au niveau des spectres d'émission (figure 15), nous remarquons que les dérivés permettent globalement d'avoir une bonne prédiction par rapport à la normalisation, et ceci pour les deux paramètres dans les deux matrices (2014 et 2015). Quant aux spectres EES (figure 16), une très bonne prédiction de CN est remarquée au niveau de la matrice de 2014 par application des dérivées (la prédiction est beaucoup moins performante en 2015), alors que nous obtenons une mauvaise prédiction pour Corg peu importe le prétraitement et peu importe la matrice. Au niveau des résultats de la régression appliquée sur la matrice globale (figure 17), les valeurs du RPD montrent que les dérivés permettent d'avoir une prédiction de CN telle que l'erreur de celle-ci est la moitié de l'erreur originale, mais une mauvaise prédiction de Corg.

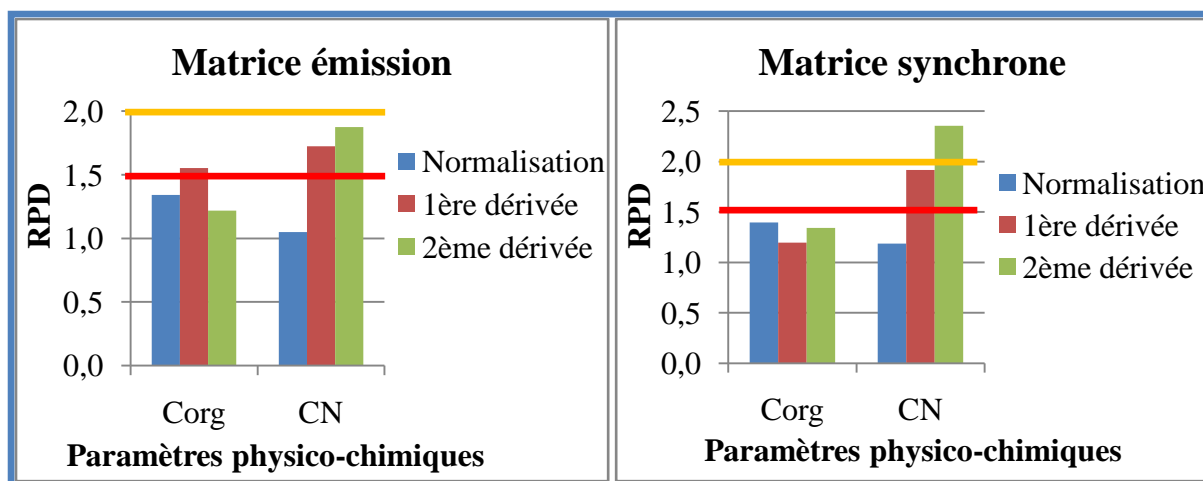


**Figure 15: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de fluorescence d'émission par année pour la prédiction des différentes propriétés physico-chimiques**



**Figure 16: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de fluorescence EES par année pour la prédiction des différentes propriétés physico-chimiques**





**Figure 17: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de l'ensemble des échantillons par mode de fluorescence pour la prédiction des différentes propriétés physico-chimiques**

Afin de savoir s'il est possible de prédire la valeur de Corg et CN d'un échantillon à partir de son empreinte spectrale de fluorescence. Un ensemble de 56 échantillons a été sélectionné (par la méthode duplex) pour élaborer le modèle de calibration. La validation a été ensuite effectuée sur 27 échantillons dont les valeurs du coefficient de corrélation R associées sont reportées dans le tableau 3. Ces échantillons n'ayant pas participé au modèle de calibration constituent un véritable test du modèle établis.

Nous remarquons que, bien que les valeurs de R soient statistiquement très basses ( $<0,7$ ), le coefficient de corrélation de CN est plus élevé que celui de Corg, sur base des spectres d'émission normalisés. Les autres prétraitements n'ont pas abouti à de meilleurs résultats.

Nous constatons la même chose pour une prédiction de ces paramètres sur base des spectres de fluorescence EES après la dérivée.

**Tableau 3: Valeurs du coefficient de corrélation R pour la prédiction des paramètres physico-chimiques**

	Emission	Synchrone
	Normalisation surface	2 <sup>ème</sup> dérivée
<b>R<sub>Corg</sub></b>	0,27	0,07
<b>R<sub>CN</sub></b>	0,44	0,38

Il est donc à conclure de l'ensemble de ces modèles que malheureusement, et contrairement à nos attentes, il n'était pas possible de déterminer le pourcentage de carbone organique. Cependant, la prédiction du rapport carbone sur azote s'est avérée possible sur la base des

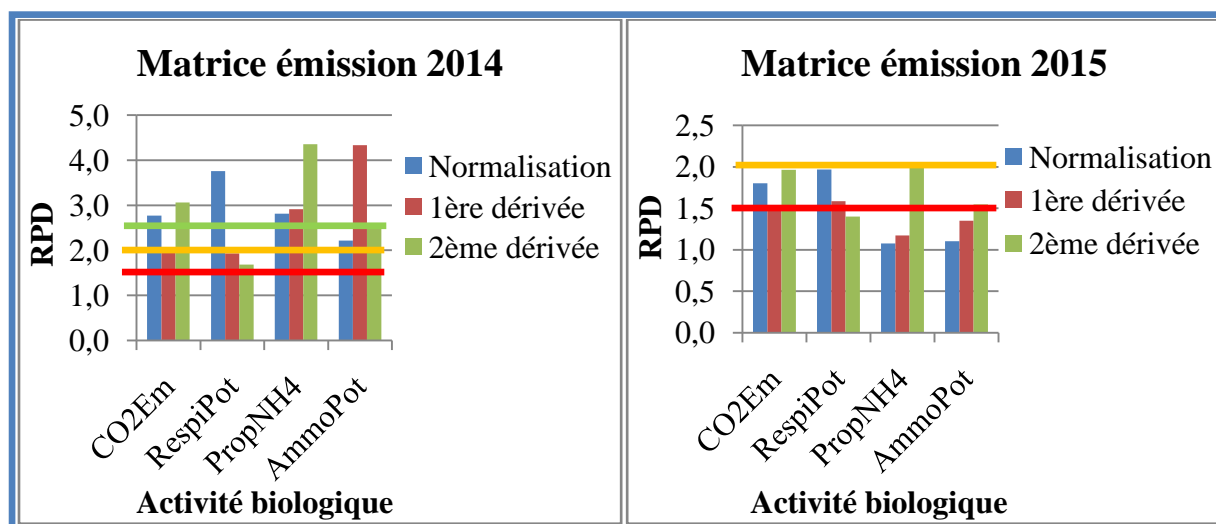
spectres de fluorescence dérivés, quelque soit le mode de mesure. Les valeurs de RPD entre 1,5 et 2 montrent que l'erreur de prédiction est la moitié de l'erreur originale. Un élargissement de la base de données pourrait améliorer les performances de ce modèle.

### 3.2. Estimation de l'activité biologique

Pour l'activité biologique, les paramètres suivant ont été étudié : CO<sub>2</sub>Em, respiration potentielle (RespiPot), proportion N-NH<sub>4</sub> (PropNH<sub>4</sub>), et l'ammonification potentielle (AmmoPot). Les résultats obtenus sont présentés sur les figures suivantes.

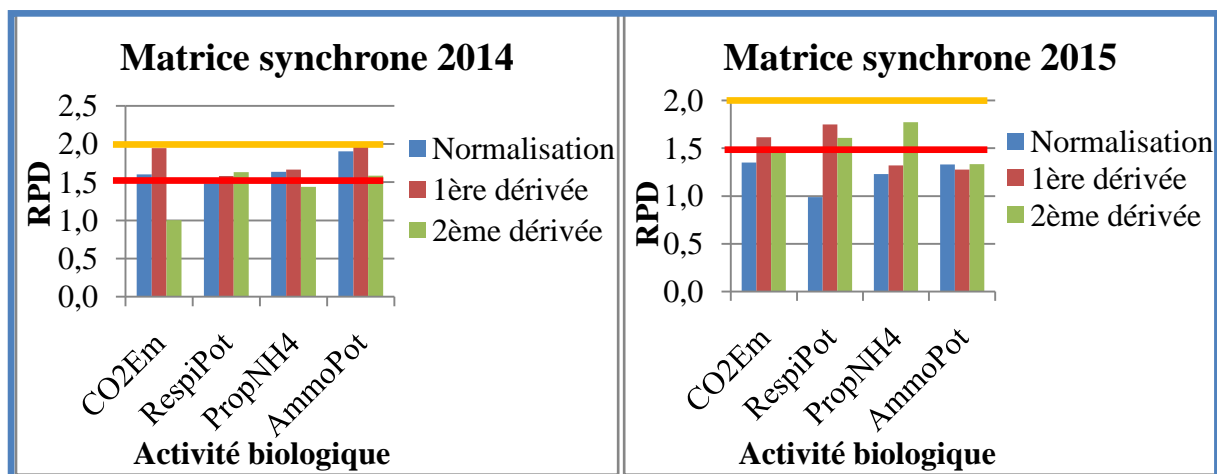
Il est évident de constater que l'application d'une 2<sup>ème</sup> dérivée aux spectres de fluorescence d'émission 2014 conduit à une excellente précision de prédiction (RPD entre 2,5 et 3 ou supérieures à 3). Son application aux spectres de 2015 permet une prédiction quantitative approximative (RPD entre 2 et 2,5). Ces performances concernent la prédiction de CO<sub>2</sub>Em, PropNH<sub>4</sub> et AmmoPot. Par ailleurs, la normalisation semble performante plus particulièrement pour la prédiction du paramètre RespiPot (figure 18).

Nous constatons aussi que les échantillons de 2014 permettent d'avoir une très bonne prédiction (RPD > 2,5) par rapport à ceux de 2015. Cette différence remarquable entre 2014 et 2015 peut s'expliquer par le fait qu'en 2015, selon les responsables du projet, l'échantillonnage n'a pas été fait exactement aux mêmes endroits qu'en 2014 ce qui a créé une source de variation.



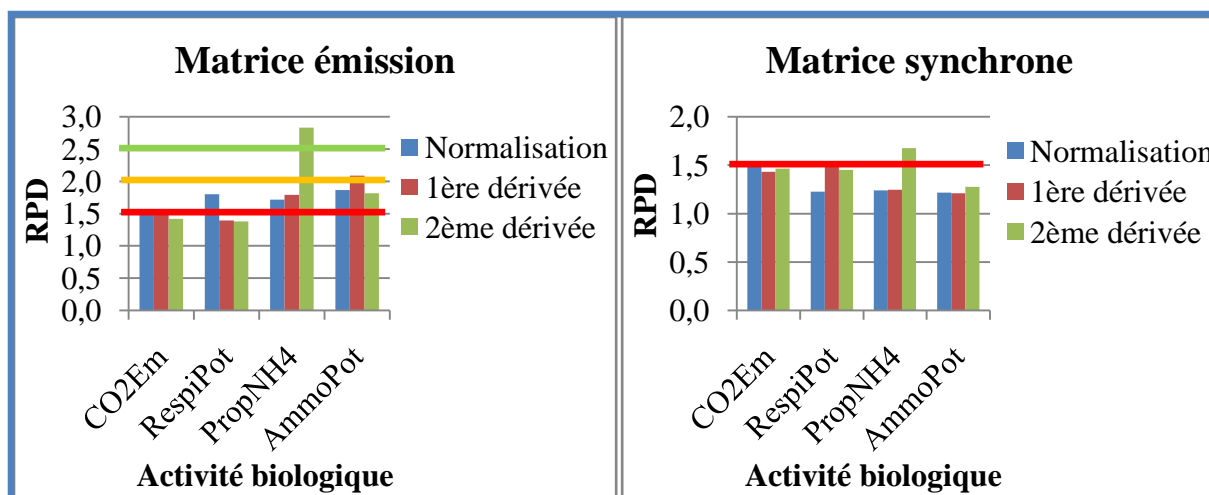
**Figure 18: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de fluorescence d'émission par année pour la prédiction des différents paramètres de l'activité biologique**

Quant aux spectres de fluorescence EES (figure 19), les dérivées permettent d'avoir des modèles où l'erreur de prédiction est la moitié de l'erreur originale pour la plupart des paramètres. La normalisation des spectres permet d'obtenir ce niveau de performance de modèles calibration mais uniquement pour les échantillons de l'année 2014.



**Figure 19: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de fluorescence EES par année pour la prédiction des différents paramètres de l'activité biologique**

Au niveau des résultats de la régression appliquée sur la matrice globale (figure 20), nous remarquons qu'il est possible de prédire les paramètres de l'activité biologique PropNH<sub>4</sub> et AmmoPot sur la base des spectres d'émission (RPD > 1,5) par rapport à la matrice synchrone (RPD < 1,5). Nous observons aussi des valeurs élevées par l'utilisation des dérivées pour la prédiction de ces deux paramètres. Les modèles pour la prédiction du CO2Em et RespiPot présentent les mêmes performances quelque soit l'année.



**Figure 20: Comparaison des performances des modèles établis sur base des spectres de l'ensemble des échantillons par mode de fluorescence pour la prédiction des différents paramètres de l'activité biologique**

Afin de savoir s'il est possible de prédire les valeurs des paramètres de l'activité biologique d'un échantillon à partir de son empreinte spectrale de fluorescence, la même démarche que décrit plus haut pour ce qui concerne les paramètres physico-chimiques a été adoptée. Les valeurs du coefficient de corrélation associées (pour PropNH<sub>4</sub> et AmmoPot) sont reportées dans le tableau 4.

Nous remarquons qu'il est impossible de prédire CO<sub>2</sub>Em et RespiPot (valeurs de  $R \approx 0$ , données non représentées). Cependant, selon le prétraitement appliqué, les valeurs de R varient de 0,17 à 0,29 dans le cas de l'émission, et de 0,53 à 0,59 cas de l'EES pour le PropNH<sub>4</sub>, et de 0,21 à 0,38 dans le cas de l'émission, et de 0,40 à 0,51 cas de l'EES pour l'AmmoPot.

**Tableau 4: Valeurs du coefficient de corrélation R pour la prédiction des paramètres de l'activité biologique (PropNH<sub>4</sub> et AmmoPot)**

	Emission			Synchrone		
	Normalisation	1 <sup>ère</sup>	2 <sup>ème</sup>	Normalisation	1 <sup>ère</sup>	2 <sup>ème</sup>
	surface	dérivée	dérivée	surface	dérivée	dérivée
<b>R<sub>PropNH4</sub></b>	0,17	0,27	0,29	0,59	0,53	0,54
<b>R<sub>AmmoPot</sub></b>	0,21	0,38	0,33	0,51	0,40	0,50

### 3.3. Conclusion

Pour résumer les résultats trouvés par la régression PLS (validation croisée), le tableau suivant présente le prétraitement permettant d'obtenir la meilleure valeur de RPD pour les différents paramètres et pour les différentes matrices. Nous remarquons que les dérivées sont fréquentes et que la majorité des valeurs obtenues sont comprises entre 1,5 et 2 indiquant une erreur du modèle égale à la moitié de l'erreur originale.

**Tableau 5: Résumé des résultats obtenus par la régression PLS**

			Physico-chimique		Activité biologique			
			Corg	CN	CO <sub>2</sub> Em	RespiPot	PropNH <sub>4</sub>	AmmoPot
<b>Emission</b>	Matrice 2014	Prétraitement	Der 2	Der 1	Der 2	Norm	Der 2	Der 1
		RPD	1,8	1,8	3,1	3,8	4,4	4,3
	Matrice 2015	Prétraitement	Der 1	Der 1	Der 2	Norm	Der 2	Der 2
		RPD	1,9	1,9	2	2	2	1,5
	Matrice globale	Prétraitement	Der 1	Der 2	Der 1	Norm	Der 2	Der 1
		RPD	1,6	1,9	1,5	1,8	2,8	2,1
<b>Synchrone</b>	Matrice 2014	Prétraitement	Der 2	Der 1	Der 1	Der 2	Der 1	Der 1
		RPD	1,3	2,7	1,9	1,6	1,7	2
	Matrice 2015	Prétraitement	Der 2	Der 2	Der 1	Der 1	Der 2	Der 2
		RPD	1,6	1,5	1,6	1,7	1,8	1,3
	Matrice globale	Prétraitement	Norm	Der 2	Norm	Der 1	Der 2	Der 2
		RPD	1,4	2,4	1,5	1,5	1,7	1,3

## IV. Conclusion générale

Pour une méthode plus facile, moins cher et plus sensible, de nombreux chercheurs ont démontré le potentiel de la spectroscopie de fluorescence pour l'évaluation d'humification et la taille moléculaire des substances humiques. Bayer et al. (2002), Milori et al. (2002) et González Pérez et al. (2004) ont rapporté que l'intensité de fluorescence d'émission des AH avec une excitation dans la région de 430 nm peut être directement liée à la condensation, et ils ont conclu que l'intensité de fluorescence peut être un bon paramètre pour révéler le degré d'humification. Dans cette étude, les résultats du calcul du degré d'humification à partir des spectres d'émission ont d'ailleurs montrés une différence remarquable entre les trois régions étudiées, notamment entre la région Ardenne et les deux autres, et en appliquant l'ACP sur les spectres de fluorescence, la distinction entre ces deux groupes a été bien vérifiée. Cependant, l'application de l'ACP pour discriminer les AH des sols en fonction des modalités de gestion n'a pas permis d'atteindre cet objectif. Ceci est probablement dû à la grande diversité des modalités de gestion pour un faible nombre d'échantillons, mais aussi au fait que les structures fluorescentes des acides humiques extraits ne semblent pas être affectées par ces différents systèmes. Cette hypothèse est à vérifier par l'application d'autres techniques de caractérisation pour conclure sur la pertinence de l'analyse des acides humiques pour discriminer les systèmes de gestion des sols.

Le développement de modèles de régression pour la prédiction des paramètres physico-chimiques (carbone organique et rapport C/N) et de l'activité biologique ( $\text{CO}_2$ , respiration potentielle, proportion  $\text{N-NH}_4$  et ammonification potentielle) caractéristiques des sols a montré, en général, qu'avec la validation croisée, nous obtenons un ratio de déviation standard compris entre 1,5 et 2, ce qui correspond à une erreur de prédiction égale à la moitié de l'erreur originale. Un modèle de régression pour la caractérisation d'un groupe d'AH indépendant sélectionné via la méthode duplex, nous a permis, bien que les valeurs du coefficient de corrélation soient faibles, de prédire CN,  $\text{PropNH}_4$  et  $\text{AmmonoPot}$ .

En tenant compte des résultats obtenus, nous trouvons qu'il est nécessaire de travailler avec un plus grand nombre d'échantillons afin de réduire l'effet de la variabilité. Nous suggérons donc de continuer l'étude en ajoutant des échantillons de l'année 2016.

Finalement, il est à conclure que le potentiel de la spectroscopie de fluorescence pour l'analyse des acides humiques des sols a pu être démontré, dans cette étude, à travers la

possibilité de différencier les origines géographiques des sols. En outre, la méthode a pu renseigner sur la composition de la fraction humique en termes de degré d'humification et du taux de condensation des structures aromatiques.

## Références bibliographiques

- Abbas, Ouissam. 2007. « Vieillissement simulé ou naturel de la matière organique. Apport du traitement chimiométrique des données spectroscopiques. Conséquences environnementales et aide à l'exploration pétrolière. » Thèse de doctorat, Université Paul Cezanne Aix-Marseille III.
- Baeten, Vincent. 2015. « Contrôle technologique de qualité ». Cours, Université catholique de Louvain La Neuve.
- Bayer, Martin-Neto, Mielniczuk, C.Saab, M.P.Milori, et S.Bagnato. 2002. « Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies ». *Geoderma* 105: 81-92.
- González Pérez, Martha, Ladislau Martin-Neto, Sérgio C Saab, Etelvino H Novotny, Débora M.B.P Milori, Vanderlei S Bagnato, Luiz A Colnago, Wanderley J Melo, et Heike Knicker. 2004. « Characterization of Humic Acids from a Brazilian Oxisol under Different Tillage Systems by EPR, <sup>13</sup>C NMR, FTIR and Fluorescence Spectroscopy ». *Geoderma* 118 (3-4): 181-90. doi:10.1016/S0016-7061(03)00192-7.
- Lakowicz, Joseph R. 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer.
- Matthews, B.J.H., A.C. Jones, N.K. Theodorou, et A.W. Tudhope. 1996. « Excitation-Emission-Matrix Fluorescence Spectroscopy Applied to Humic Acid Bands in Coral Reefs ». *Marine Chemistry* 55 (3-4): 317-32. doi:10.1016/S0304-4203(96)00039-4.
- Milori, Débora M. B. P., Ladislau Martin-Neto, Cimélio Bayer, João Mielniczuk, et Vanderlei S. Bagnato. 2002. « HUMIFICATION DEGREE OF SOIL HUMIC ACIDS DETERMINED BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY ». *Soil Science* 167 (11): 739-49. doi:10.1097/00010694-200211000-00004.
- Mouloubou, Olsen Rainness, Pascale Prudent, Stéphane Mounier, Jean-Luc Boudenne, Madi Guirema Abaker, et Frédéric Théraulaz. 2016. « An Adapted Sequential Chemical Fractionation Coupled with UV and Fluorescence Spectroscopy for Calcareous Soil Organic Matter Study after Compost Amendment ». *Microchemical Journal* 124 (janvier): 139-48. doi:10.1016/j.microc.2015.08.007.
- Prentice, Andrea J., et Elizabeth A. Webb. 2010. « A comparison of extraction techniques on the stable carbon-isotope composition of soil humic substances ». *Geoderma* 155: 1-9.
- Shirshova, L.T., A.L. Kholodov, B.N. Zolotareva, L.A. Fominykh, et A.M. Yermolayev. 2009. « Fluorescence Spectroscopy Studies of Humic Substance Fractions Isolated from Permanently Frozen Sediments of Yakutian Coastal Lowlands ». *Geoderma* 149 (1-2): 116-23. doi:10.1016/j.geoderma.2008.11.026.
- Yang, Hui, Xue Xiao, Xuesong Zhao, Lan Hu, Caofang Lv, et Zhangkun Yin. 2016. « Study on fluorescence spectra of thiamine, riboflavin and pyridoxine ». In *Seventh International Symposium on Precision Mechanical Measurements*, 99030H - 99030H. International Society for Optics and Photonics. <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=2485231>.



# Annexes

---

## **Annexe 1 : Description détaillée des modes de gestion étudiés (BIOECOSYS, 2015)<sup>2</sup>**

**Prairie temporaire** : installée au moins durant 3 ans dans la rotation

### **1a1 - Intensif conventionnel**

- 3 à 4 coupes sont réalisées sur la saison, 1ère coupe aux alentours de la mi-mai
- Apports d'intrants minéraux et organiques
- Système allaitant

### **1a2 - Intensif biologique**

- 3 à 4 coupes sont réalisées sur la saison, 1ère coupe aux alentours de la mi-mai
- Apports d'intrants organiques uniquement (engrais de ferme)
- Système allaitant et laitier

**Prairie permanente** : installée depuis plus de 5 ans

### **1b1 - Intensif conventionnel**

- 3 à 4 coupes sont réalisées sur la saison, 1ère coupe aux alentours de la mi-mai
- Apports d'intrants minéraux et organiques
- Système laitier et allaitant

### **1b5 - Intensif biologique**

- 3 à 4 coupes sont réalisées sur la saison, 1ère coupe aux alentours de la mi-mai
- Apports d'intrants organiques uniquement
- Système laitier

### **1b2 - 1ère fauche au 15 juin**

- 2-3 coupes sont réalisées sur la saison, 1er coupe aux alentours de la mi-juin
- Apports d'intrants minéraux et organiques

---

<sup>2</sup> BIOECOSYS, Approche méthodologique pour l'évaluation des services écosystémiques fournis par les agroécosystèmes : application aux modes de gestion conventionnels et biologiques des systèmes prairiaux, 2015, Rapport intermédiaire, Centre wallon de Recherches agronomiques

- Système allaitant

### **1b3 - Prairie naturelle (MAE2 – MB2)**

- 2-3 coupes sont réalisées sur la saison
- Aucune intervention (pâturage, fauche, fertilisation,...) sur la parcelle entre le 1er janvier et le 15 juin. Toutefois, une intervention unique de nivellement superficiel (étaupinage ou réparation de dégâts de sangliers) est tolérée entre le 1er janvier et le 15 avril
- Le bétail présent sur la parcelle après le 15 juin ne peut recevoir ni concentré, ni fourrage
- Apports de fertilisants et amendements limités à un épandage annuel d'engrais de ferme entre le 15 juin et le 31 juillet
- Pas d'utilisation de produits phytosanitaires, à l'exception du traitement localisé contre les orties, chardons et rumex
- Pas de semis ou de sur-semis
- Entre le 15 juin et le 30 septembre, la gestion de la parcelle peut être réalisée soit par pâturage, soit par fauche avec récolte, soit en combinant les deux. En cas de fauche, maintien d'au moins 5 % de zones refuges non fauchées jusqu'à la fauche ou jusqu'au pâturage suivant, soit au moins un mois; la localisation de la zone refuge doit varier à chaque fauche. Après le 30 septembre, seul le pâturage est autorisé
- La méthode doit être appliquée sur la totalité de la superficie de la parcelle et la superficie minimale de chaque parcelle sur laquelle est appliquée la méthode doit être supérieure ou égale à 10 ares
- Système allaitant

### **1b4 ou 2b3 - Prairie à haute valeur biologique (MAE8 – MC4)**

- 1-2 coupes sont réalisées sur la saison
- Aucune intervention (pâturage, fauche,...) sur la parcelle pendant une période précisée dans l'avis conforme et s'étendant, sauf cas particuliers, du 1er janvier à une date en juillet précisée dans cet avis. Toutefois, une intervention unique de nivellement superficiel (étaupinage ou réparation de dégâts de sangliers) est tolérée entre le 1er janvier et le 15 avril

- Le bétail présent sur la parcelle après cette date ne peut recevoir ni concentré, ni fourrage
- Aucun apport de fertilisants et d'amendements ne peut avoir lieu, à l'exception des restitutions par les animaux lors du pâturage
- L'utilisation de produits phytosanitaires est interdite, à l'exception du traitement localisé contre les orties, chardons et rumex
- Pas de semis ou de sur-semis
- En cas de gestion autre que par pâturage, seule la fauche avec exportation du produit de la fauche est autorisée. Dans ce cas, au moins 10 % de la superficie de la parcelle seront maintenus sous la forme de bandes refuges non fauchées. A chaque fauche, une telle zone refuge doit être maintenue jusqu'à la fauche suivante. Toutefois, la localisation de la zone refuge doit varier à chaque fauche. En cas de pâturage après la fauche dans le délai prévu dans l'avis conforme, la zone refuge pourra être pâturée. L'avis conforme précise les autres modalités éventuelles de pâturage
- Sauf justification dans l'avis conforme, les travaux de drainage ou de curage des fossés sont interdits
- La méthode doit être appliquée sur la totalité de la superficie de la parcelle et la superficie minimale de chaque parcelle sur laquelle est appliquée la méthode doit être supérieure ou égale à 10 ares
- Système allaitant

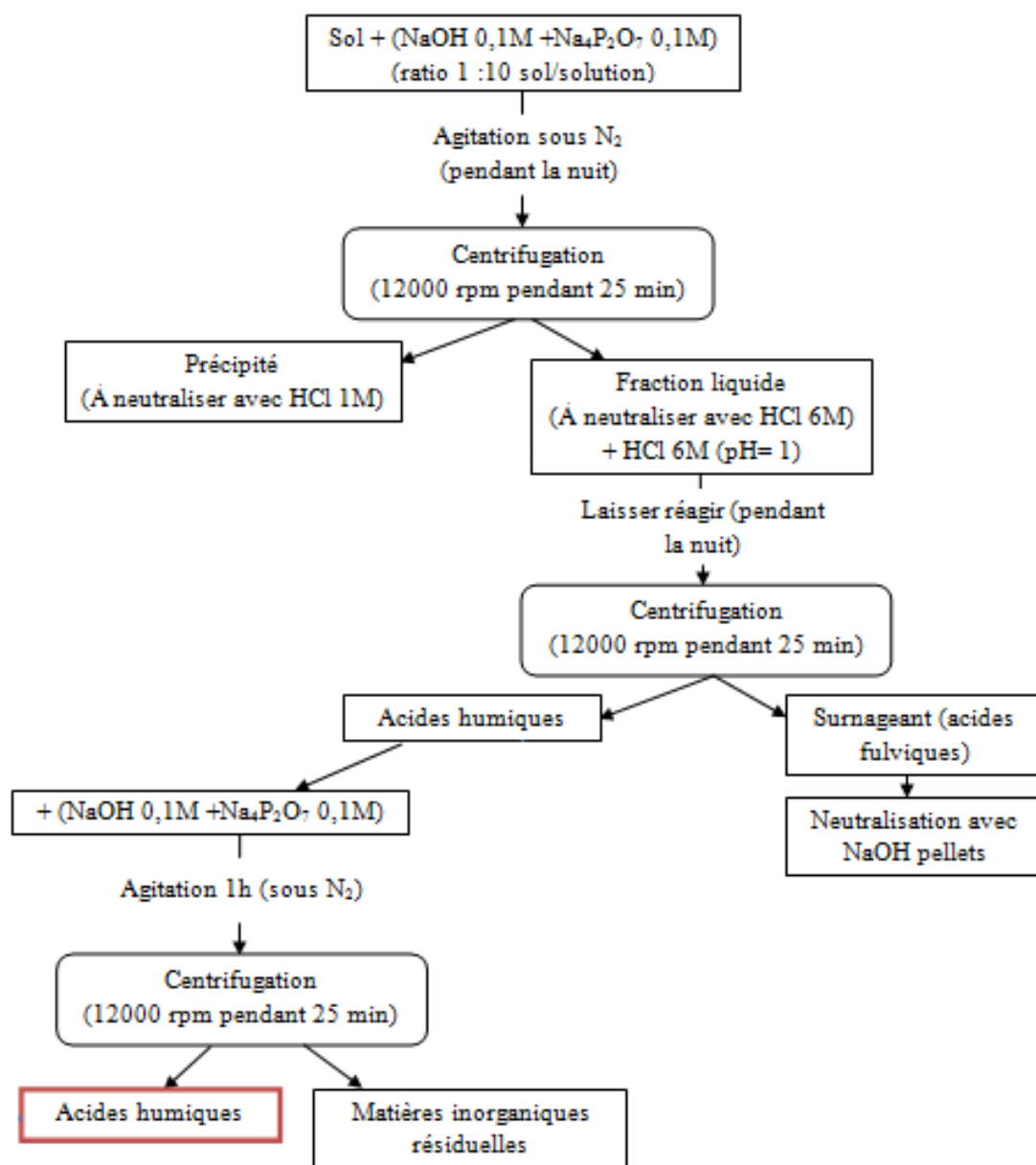
### **2b1 - Pâturage continu**

- La parcelle est pâturée sans interruption dans la saison (avril-octobre/novembre)
- Système allaitant

### **2b2 - Pâturage tournant**

- La parcelle est pâturée en moyenne durant 8-15 jours (en fonction de la région et de la repousse), avec un retour sur parcelle toutes les 5 à 7 semaines en fonction des surfaces disponibles et du chargement.
- Système allaitant

**Annexe 2 : Protocole d'extraction par une solution de NaOH et pyrophosphate de sodium (Prentice et Webb, 2010)<sup>3</sup>**



<sup>3</sup> Prentice, Andrea J., et Elizabeth A. Webb. 2010. « A comparison of extraction techniques on the stable carbon-isotope composition of soil humic substances ». *Geoderma* 155: 1-9.

### **Annexe 3 : Signification des paramètres physico-chimiques et de l'activité biologique étudiés**

**Corg, Le carbone organique** (g/kg) est le carbone produit par des organismes vivants. Le dosage de la teneur en carbone organique permet de déterminer le taux de la matière organique d'un sol qui est une source importante d'éléments nutritifs pour les plantes et la connaissance de sa teneur totale dans le sol renseigne sur sa potentialité fertilisante.

**Le rapport C/N** (Carbone organique / Azote total) : il indique l'évolution de la matière organique. Il intervient dans la mesure où il oriente la décomposition de la matière organique, soit vers la minéralisation (C/N bas), soit vers l'humification (C/N élevé).

**RespiPot, la respiration potentielle** (mg C-CO<sub>2</sub>/gr sol j) est la quantité de CO<sub>2</sub> dégagé après une incubation des échantillons du sol durant 28 jours à 28°C et à une teneur en eau voisine de la capacité au champ. Ces déterminations prennent tout leur intérêt lorsqu'il s'agit de comparer des traitements différents sur un même type de sol.

**PropNH<sub>4</sub>** est la proportion N-NH<sub>4</sub> du N minéralisé total (%)

**AmmoPot, l'Ammonification** (kg Nmin total 28 j/ha) est la production d'ammonium ou d'ammoniac du fait d'une activité biologique, à partir soit de matière organique en décomposition, soit par la réduction de nitrate. L'ammonification à partir de la matière organique a pour but de produire une source d'azote directement utilisable par les organismes pour leur propre synthèse.

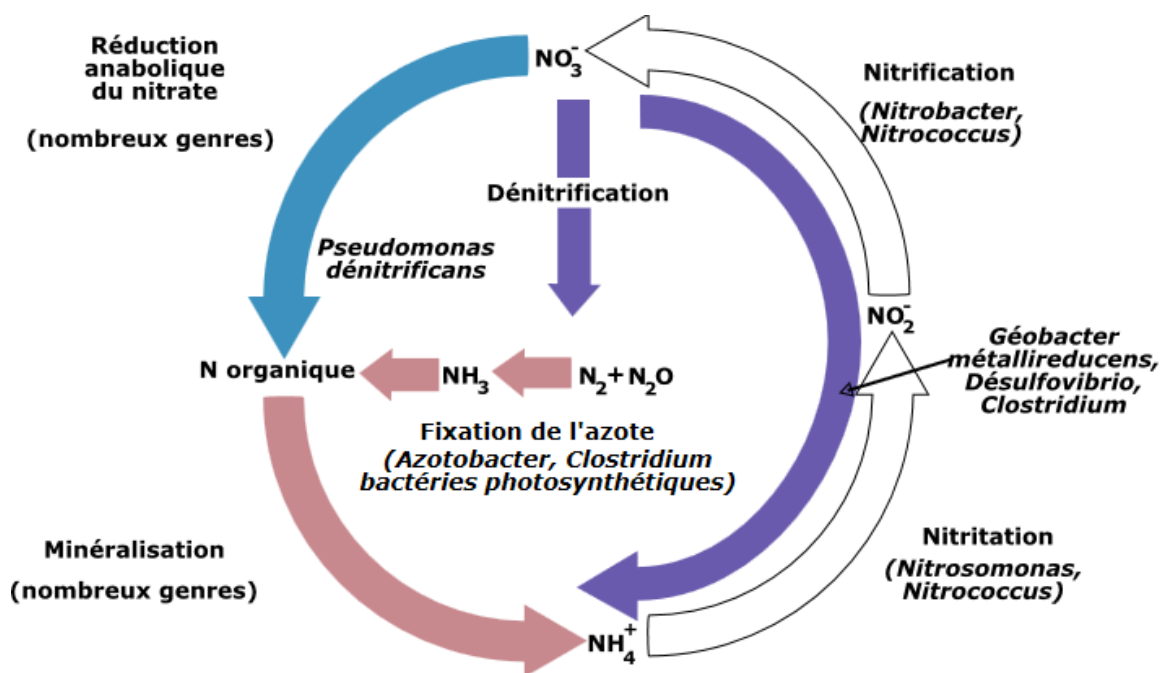


Figure 21: Cycle d'azote (BIOECOSYS, 2015)<sup>4</sup>

<sup>4</sup> BIOECOSYS, Approche méthodologique pour l'évaluation des services écosystémiques des prairies biologiques et conventionnelles en fonction de leur mode de gestion, 2015, Présentation, Centre wallon de Recherches agronomiques