



**HAL**  
open science

# Test de capteurs passifs (DGT) dans l'évaluation du risque de transfert du cuivre présent dans des sols viticoles vers la vigne

Emma Vivien

► **To cite this version:**

Emma Vivien. Test de capteurs passifs (DGT) dans l'évaluation du risque de transfert du cuivre présent dans des sols viticoles vers la vigne. Sciences de l'environnement. 2013. hal-04660842

**HAL Id: hal-04660842**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04660842v1>**

Submitted on 24 Jul 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

**Université Bordeaux 1**  
**MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTE,**  
**Mention STEE et Chimie parcours professionnel**  
Spécialité Ecotoxicologie et Chimie de l'Environnement  
(EXCE)

Année Universitaire 2012/2013

**RAPPORT DE STAGE**

VIVIEN Emma

Test de capteurs passifs (DGT) dans l'évaluation du risque de transfert du cuivre présent dans des sols viticoles vers la vigne



**Stage effectué du :** 01/02/2013 au 31/07/2013  
**Maîtres de stage :** Laurence DENAIX et Laetitia ANATOLE-MONNIER  
**Laboratoire d'accueil :** INRA CENTRE DE BORDEAUX  
Unité Mixte 1220 TCEM  
Domaine de la Grande Ferrade, 71 avenue Edouard  
Bourlaux, BP 81, 33883 VILLENAVE D'ORNON  
CEDEX  
**Téléphone :** 05 57 12 25 03  
**Email :** secretariat\_tcem@bordeaux.inra.fr



## Remerciements

Je remercie en premier lieu Mr Hubert de Rochambeau pour m'avoir permis de réaliser un stage au sein de l'INRA Bordeaux-Aquitaine, ainsi que le Labex Cote pour avoir contribué au projet.

J'adresse mes remerciements tous particuliers à mes maîtres de stage Laurence Denaix, Directrice de l'unité « Transfert Sol-Plante et Cycle des Eléments Minéraux dans les Ecosystèmes Cultivés » et Laetitia Anatole-Monnier, pour m'avoir accueillie dans leur équipe, pour m'avoir accompagnée et guidée durant mon projet de stage, pour leurs nombreux conseils et toutes les connaissances qu'elles ont pu m'apporter. Je les remercie également pour leur disponibilité, leur patience et leur extrême gentillesse. Ces six mois de stage m'ont beaucoup apportés sur le plan professionnel et personnel et c'est en grande partie grâce à elles.

Je tiens à dire un grand merci à Cécile Coriou, pour son accompagnement dans ma vie au laboratoire ainsi que pour ses nombreux conseils, sa bienveillance et sa bonne humeur. Je remercie également Sylvie Buisnière, Thierry Robert et Stéphane Thunot pour leur aide précieuse dans mes expérimentations, de laboratoire ou de terrain, ainsi que pour leur amabilité. Je tiens à remercier Nathalie Gallegos et Loïc Prudhomme pour leurs conseils et leur gentillesse, ainsi que pour avoir répondu à mes nombreuses questions logistiques.

Je remercie Rodolphe Lauverjon pour l'aide indispensable qu'il m'a apporté en analyses statistiques et sa grande patience. Je tiens également à remercier Valérie Sapin-Didier, David Achat, Corinne Sert, Sylvie Milin, Pascal Denoroy, Jean-Yves Cornu, Anne Budynek et Christian Morel pour leurs conseils et leur gentillesse.

J'adresse mes remerciements et ma grande reconnaissance à Rémy Bakoto et Yoann Viala, pour leur aide et leur soutien, ainsi que pour leur bonne humeur tout au long de ces six mois.

Je tiens à remercier toute l'UMR TCEM pour leur accueil et leur amabilité, grâce à qui j'ai pu mener ce projet dans les meilleures conditions possibles.

# Sommaire

|  |           |
|--|-----------|
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>SOMMAIRE</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....                                      | <b>4</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES</b> .....                                       | <b>4</b>  |
| <b>INTRODUCTION</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>1. ETAT DES CONNAISSANCES</b> .....                               | <b>6</b>  |
| 1.1. LE CUIVRE.....  | 6         |
| 1.1.1. Cuivre et sol.....  | 6         |
| 1.1.1.1. Teneur en cuivre dans les sols.....                         | 6         |
| 1.1.1.2. Spéciation et répartition.....                              | 6         |
| 1.1.1.3. Facteurs influençant sa mobilité.....                       | 6         |
| 1.1.2. Cuivre et plante .....  | 7         |
| 1.1.2.1. Le cuivre, oligo-élément essentiel .....                    | 7         |
| 1.1.2.2. Absorption et transport.....                                | 7         |
| 1.2. BIODISPONIBILITE.....   | 8         |
| 1.2.1. Notion et définition .....                                    | 8         |
| 1.2.1.1. La disponibilité environnementale.....                      | 8         |
| 1.2.1.2. La biodisponibilité environnementale.....                   | 8         |
| 1.2.1.3. La biodisponibilité toxicologique.....                      | 8         |
| 1.2.2. Evaluation.....   | 9         |
| <b>2. MATERIELS ET METHODES</b> .....                                | <b>10</b> |
| 2.1. CHOIX DES PARCELLES .....                                       | 10        |
| 2.2. PRESENTATION DU MATERIEL VEGETAL.....                           | 11        |
| 2.3. SYSTEME DGT .....   | 11        |
| 2.3.1. Principe de fonctionnement.....                               | 11        |
| 2.3.2. Utilisation du système DGT en laboratoire .....               | 12        |
| 2.4. MISE EN PLACE DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL .....                  | 12        |
| 2.4.1. Essai du mode opératoire.....                                 | 12        |
| 2.4.2. Disposition des systèmes DGT.....                             | 13        |
| 2.4.3. Prélèvement et préparation des échantillons de feuilles ..... | 14        |
| 2.5. AUTRES TECHNIQUES.....  | 14        |
| 2.5.1. Prélèvement par bougie poreuse.....                           | 14        |
| 2.5.2. Extraction du cuivre à l'EDTA.....                            | 14        |
| 2.5.3. Extraction du cuivre à l'eau régale .....                     | 14        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3. ANALYSE DES ECHANTILLONS ET TRAITEMENTS ET DONNEES .....</b>  | <b>14</b> |
| 3.1. CALCUL DES CONCENTRATIONS ET FLUX DE METAL POUR LE SYSTEME DGT .....   | 15        |
| 3.2. TRAITEMENT DES DONNEES .....   | 15        |
| <b>4. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>   | <b>15</b> |
| 4.1. MESURE DGT .....   | 15        |
| 4.1.1. Analyse des flux mesurés au laboratoire .....  | 15        |
| 4.1.2. Comparaison des flux de cuivre mesurés <i>in situ</i> au mois de mars et de mai .....                                    | 16        |
| 4.1.3. Comparaison des flux de cuivre <i>in situ</i> et <i>ex situ</i> .....  | 18        |
| 4.2. RELATION DU FLUX DE CUIVRE DGT AVEC LA CONCENTRATION EN CUIVRE DANS LES FEUILLES DE VIGNES .....                           | 19        |
| 4.3. COMPARAISON DES CAPTEURS DGT AVEC LES AUTRES TECHNIQUES D’EVALUATION DE LA CONCENTRATION EN CUIVRE DANS LES SOLS .....     | 23        |
| <b>SYNTHESE ET RECOMMANDATIONS POUR L'USAGE DE LA DGT POUR EVALUER LA BIODISPONIBILITE DU CUIVRE DANS LES SOLS VITICOLES...</b> | <b>24</b> |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>   | <b>25</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>  | <b>29</b> |
| ANNEXE 1 .....  | 30        |
| ANNEXE 2 .....  | 33        |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau I : Description des 10 parcelles sélectionnées selon le type de sol, l'année de plantation de la vigne, le pH du sol et les concentrations totales en cuivre ..... | 11 |
|--|----|

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Courbe de croissance en réponse au statut nutritionnel de la plante (Michaud, 2007 d'après Reuter et Robinson, 1997).....   | 7  |
| Figure 2 : Concept de biodisponibilité des métaux pour les plantes selon trois composantes: disponibilité environnementale, biodisponibilité environnementale et biodisponibilité toxicologique. (D'après Bravin, 2008).....         | 9  |
| Figure 3 : Schéma d'utilisation du système DGT (Zhang et al., 2001).....   | 12 |
| Figure 4 : Système de contamination supposé des capteurs DGT enterrés .....  | 13 |
| Figure 5 : Disposition des systèmes DGT <i>in situ</i> sur chaque parcelle .....   | 13 |
| Figure 6 : Moyenne des concentrations en cuivre mesurées <i>ex situ</i> par parcelle .....   | 16 |
| Figure 7: Moyenne des flux de cuivre obtenus avec le système DGT sur le terrain en mars ( <i>in situ 1</i> ) et en mai ( <i>in situ 2</i> ) pour chaque parcelle .....   | 17 |
| Figure 8: Moyenne des flux de cuivre obtenus sur les parcelles avec le système DGT en laboratoire ( <i>ex situ</i> ) et sur le terrain au mois de mars ( <i>in situ 1</i> ) et de mai ( <i>in situ 2</i> ) .....                     | 19 |
| Figure 9 : Moyenne des concentrations en cuivre dans les feuilles de vignes par parcelle.....  | 20 |
| Figure 10 : Moyenne des concentrations en cuivre dans les feuilles de vigne en fonction des concentrations de cuivre DGT par parcelle relevés lors de l'essai du mois de mars (A) de mai (B) et la moyenne des deux mesures (C)..... | 21 |
| Figure 11 : Moyennes des concentrations en cuivre dans les feuilles de vigne en fonction des moyennes des concentrations DGT de cuivre <i>ex situ</i> par parcelle .....   | 22 |
| Figure 12 : ACP de l'ensemble des données mesurées sur les sols étudiés .....  | 23 |

## Introduction

En 1878, les vignobles du Sud-Ouest de la France sont envahis par un champignon parasite, le mildiou (*plasmopara viticola*). C'est en 1885 que les premières applications de cuivre sur le feuillage des vignes ont été utilisées avec succès pour lutter contre le parasite (Branas, 1984). Depuis, le développement de produits organiques de synthèse a amené à une diminution de la consommation d'antifongique à base de cuivre mais leur utilisation s'est néanmoins maintenue du fait de leur plus forte persistance et efficacité. Les produits à base de cuivre jouent aujourd'hui encore un rôle central dans la viticulture biologique et restent indispensables par manque d'alternatives efficaces. Le seuil d'utilisation du métal dans ce type de culture est fixé à 6 kg / ha / an (Règlement (CE) n° 889 / 2008). Par le passé en revanche on utilisait 20 à 30 kg et parfois jusqu'à 80 kg et plus de cuivre par hectare et par an dans les cultures conventionnelles (Pollution par le cuivre des sols dans les vignobles, 2009).

Le cuivre est un oligo-élément essentiel pour les plantes mais en excès il peut amener à des problèmes de phytotoxicité, ce qui a été fréquemment observé en Languedoc Roussillon. La région Aquitaine et plus particulièrement le vignoble Bordelais, présente des concentrations élevées en cuivre dans les sols du fait de l'ancienneté et de l'importance de la surface occupée par les domaines viticoles de la région ainsi que de l'importance des attaques de mildiou. Elle a été plus particulièrement touchée par des phénomènes de toxicité liés aux cuivre (Loué, 1986). Il est aujourd'hui indispensable de mieux caractériser la contamination cuprique des sols viticoles et de comprendre les phénomènes d'échange sol-plante du cuivre afin de pouvoir anticiper d'éventuels problèmes de toxicité sur la vigne.

Pour cela, une expérimentation a été mise en place sur 10 parcelles viticoles du domaine de l'appellation Pessac Léognan, parmi les 45 parcelles étudiées par Mme Anatole-Monnier dans le cadre de son projet de thèse visant à caractériser l'impact de la contamination cuprique des sols sur la relation plante/pathogène de la vigne.

## 1. Etat des connaissances

### 1.1. Le cuivre

#### 1.1.1. Cuivre et sol

##### 1.1.1.1. Teneur en cuivre dans les sols

Le fond pédogéochimique moyen de cuivre est de l'ordre de 5 à 30 mg kg<sup>-1</sup> (Besnard *et al.*, 2001 ; Brun *et al.*, 2001). En France, la valeur médiane recensée par le réseau de mesure de la qualité des sols est de 14 mg.kg<sup>-1</sup> et 95 % des valeurs sont inférieures à 54 mg.kg<sup>-1</sup> (GIS SOL, 2011). Il n'existe pas de seuil réglementaire en France ou en Europe pour le niveau de pollution d'un sol. La valeur de référence utilisée est celle règlementant l'épandage des boues de stations d'épurations sur les sols agricoles, fixée à 100mg.kg<sup>-1</sup> de MS ( Arrêté du 8 janvier 1998). Cependant, les importantes quantités de cuivre utilisées par le passé ont amené à de fortes concentrations dans les sols de vignobles : de 150 à 520 mg/kg en Champagne (Besnard *et al.*, 2001), jusqu'à 1030 mg/kg en Languedoc Roussillon (Chaignon *et al.*, 2003, Michaud, 2007). En effet, lors des pulvérisations de fongicides, on estime que 60 à 70 % du cuivre se retrouvent sur les vignes, 20 à 30 % se retrouvent sur le sol et environ 10 % se retrouvent dans l'atmosphère (Chaignon, 2001). Le cuivre rejoint ensuite le sol soit par lessivage des feuilles et des ceps de vigne, soit à la chute des feuilles.

##### 1.1.1.2. Spéciation et répartition

La spéciation d'un élément est la répartition de cet élément entre des formes chimiques définies dans un système (IUPAC, 2000). Dans la solution du sol, on retrouve le cuivre sous plusieurs formes : sous forme d'espèce ionique libre Cu<sup>2+</sup> ou complexées à des ligands organiques et inorganiques. Le Cu de la solution du sol représente généralement moins de 2 % du Cu total du sol (Michaud, 2007). Dans la phase solide, le cuivre se fixe préférentiellement sur la matière organique (Yin *et al.*, 2002 ; Fan *et al.*, 2011), les oxydes de fer, de manganèse, les carbonates et les argiles. De fait, la plus grande partie du cuivre reste fortement adsorbée dans les quelques centimètres supérieurs du sol (Brun *et al.*, 1998).

##### 1.1.1.3. Facteurs influençant sa mobilité

La mobilité d'un élément est définie comme l'aptitude de cet élément à passer de la phase solide du sol à la phase liquide (Juste, 1988). Plusieurs processus la gouvernent donc, et notamment des réactions chimiques telles que des phénomènes de précipitation et dissolution, complexation et dissociation, adsorption et désorption de complexes. Les propriétés chimiques intrinsèques au sol et à la solution du sol tel que le pH, la teneur en matière organique, la composition minéralogique et la texture du sol jouent aussi un rôle important dans la répartition du cuivre au sein de ces deux compartiments. On admet communément que le pH est le principal paramètre régissant la spéciation d'un métal dans le sol et donc sa répartition entre la phase solide et liquide (Rieuwerts *et al.*, 1998). Plus le pH augmente, plus la charge de surface des phases sorbantes de charge variable (matières organiques, oxyhydroxydes de fer) devient négative et ainsi plus leur affinité pour les cations métalliques est forte. Le Cu<sup>2+</sup> se fixe donc sur ces groupements et n'est plus directement biodisponible.

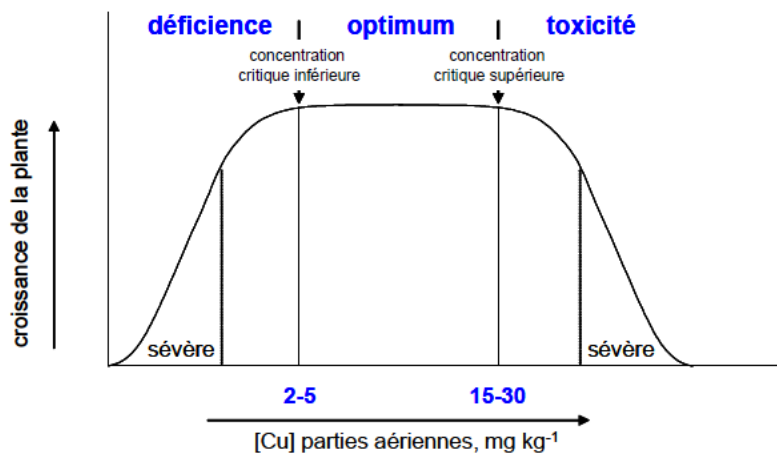


## 1.1.2. Cuivre et plante

### 1.1.2.1. Le cuivre, oligo-élément essentiel

Dans la plante, le cuivre est un oligo-élément qui participe à la photosynthèse, au développement des chloroplastes et il entre dans la composition et l'activation d'un nombre important de protéines (Loué, 1993). Les teneurs de Cu dans les parties aériennes de la plante correspondant à un optimum de croissance se situent entre 5 et 20 mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche, selon l'espèce et le stade de développement du végétal. Le seuil de toxicité du cuivre s'élève entre 15 à 30 mg kg<sup>-1</sup> dans les parties aériennes, selon l'organisme considéré. (Figure 1).

Les phénomènes de toxicité du cuivre sur la vigne se manifestent par une réduction de l'appareil racinaire (Toselli *et al.*, 2008), une modification des paramètres biochimiques comme la diminution du flux d'eau et de sève (Romeu-Moreno et Mas, 1999), qui amènent à un ralentissement de la croissance de la plante (Brun *et al.*, 2003).



**Figure 1** : Courbe de croissance en réponse au statut nutritionnel de la plante (Michaud, 2007 d'après Reuter et Robinson, 1997)

La résistance de la vigne en place sur une parcelle vient du fait que la majorité de son système racinaire est établi au-dessous de la zone la plus enrichie en cuivre (soit les premiers centimètres du sol) dans le cas de vignes anciennes, c'est-à-dire plantées depuis plus de 30 à 40 ans. Les troubles liés à sa toxicité se manifestent généralement lors de replantations sur des jeunes plants ou lors d'une culture intercalaire sur la parcelle, de céréale par exemple (Coic et Coppenet, 1989 ; Loué, 1986 ; Wihgtwick *et al.*, 2008).

### 1.1.2.2. Absorption et transport

Le flux de prélèvement du cuivre par les plantes intègre deux processus (Bravin, 2008) :

- l'adsorption dans l'apoplasme racinaire et à la surface des membranes plasmiques par des interactions électrostatiques ou par adsorption spécifique
- l'absorption au travers des membranes plasmiques par des transporteurs spécifiques

Dans les tissus racinaires, le cuivre se trouve majoritairement sous forme complexée, mais c'est la forme libre Cu<sup>2+</sup> qui semble être la seule absorbée par les racines (Kabata-Pendias, 2001). Cependant, dans la solution du sol le Cu adsorbé sous forme échangeable et le Cu

faiblement complexé représentent un compartiment labile facilement absorbable par les racines (Loué, 1993 ; Brun *et al.*, 2001).

## **1.2. Biodisponibilité**

### **1.2.1. Notion et définition**

La biodisponibilité est définie comme le degré par lequel des substances chimiques présentes dans le sol peuvent être absorbées ou métabolisées par un récepteur humain ou écologique, ou peuvent être disponibles pour une interaction avec des systèmes biologiques (ISO/DIS 11074). Elle peut être interprétée comme un processus dynamique comprenant trois composantes : la disponibilité environnementale, la biodisponibilité environnementale, la biodisponibilité toxicologique (Rapport Record N° 10-0671/1A, 2012).

#### **1.2.1.1. La disponibilité environnementale**

Elle est définie comme « la fraction du contaminant potentiellement disponible pour des organismes et qui résulte des processus physico-chimiques de désorption » (ISO 17402, 2008). Cette définition reste cependant théorique et ne considère que le phénomène de désorption dans l'interaction entre la phase solide et la solution du sol. Or nous avons vu précédemment que la spéciation d'un métal est régit par d'autres réactions et paramètres physico-chimiques et joue un rôle important dans sa répartition au sein des compartiments du sol. De plus, il est admis que les racines peuvent interagir avec le sol environnant et modifier ces différents paramètres, comme le pH ou encore la concentration en molécules organiques (Peijnenburg *et al.* 1997 ; Harmsen *et al.* 2005). La disponibilité environnementale d'un métal au sein de la rhizosphère dépend donc de sa spéciation et de toutes les interactions qui gouvernent cette spéciation.

#### **1.2.1.2. La biodisponibilité environnementale**

C'est « la fraction du composé disponible dans l'environnement qu'un organisme absorbe par des processus physiologiques » (ISO 17402, 2008). L'absorption d'un élément est spécifique à chaque organisme et dépend du temps de contact entre le sol et la racine (Harsem *et al.*, 2005), et peut entraîner une accumulation de cet élément dans le modèle biologique considéré. De fait, la biodisponibilité environnementale d'un métal peut donc être estimée par la quantité de métal accumulée dans la plante pendant la durée d'exposition au sol contaminé (Bravin, 2008).

#### **1.2.1.3. La biodisponibilité toxicologique**

Elle correspond à « la concentration interne d'un élément accumulée et/ou liée à un effet toxique » (ISO 17402, 2008). Là aussi, les seuils de concentrations auxquels on observe des effets toxiques sont spécifiques à chaque organisme et au temps d'exposition.

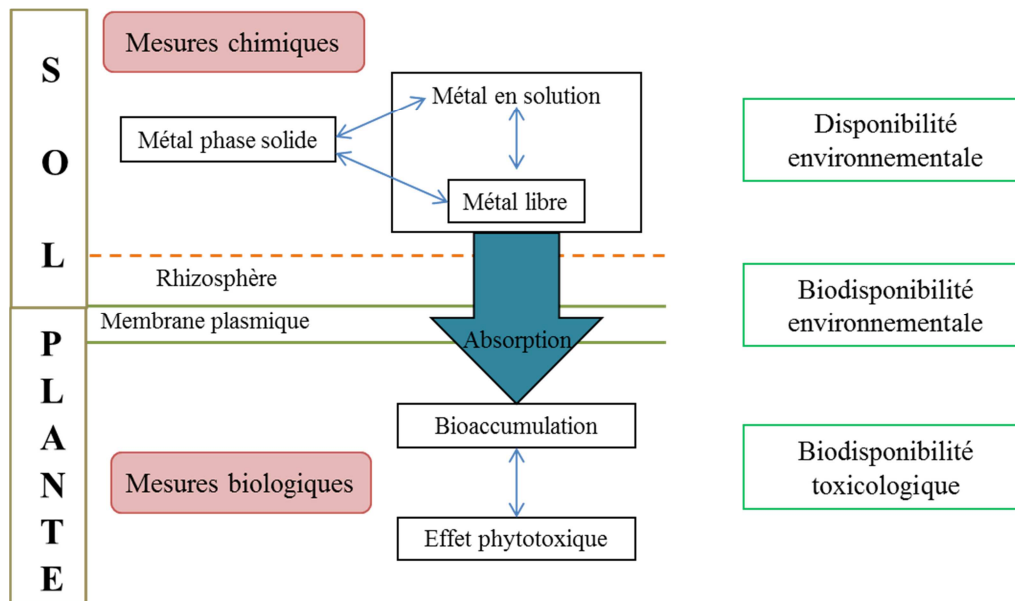
Ainsi, la biodisponibilité du Cu dépend des paramètres et réactions physico-chimiques qui gouvernent la spéciation du métal au sein du système sol, de l'organisme étudié ainsi que du

temps d'exposition. Dans cette étude, c'est la disponibilité ainsi que la biodisponibilité environnementale du cuivre qui ont été estimées.

### 1.2.2. Evaluation

Généralement, deux approches sont utilisées pour prédire la biodisponibilité du Cu (Figure 2) :

- par des paramètres chimiques du sol : mesurer l'extractabilité du Cu par des extractants chimiques (extraction totale, solution du sol, EDTA, DTPA)
- par des paramètres biologiques : analyser les teneurs en Cu dans la plante (partie aérienne, partie racinaire)



**Figure 2 : Concept de biodisponibilité des métaux pour les plantes selon trois composantes: disponibilité environnementale, biodisponibilité environnementale et biodisponibilité toxicologique. (D'après Bravin, 2008)**

La concentration totale en Cu dans le sol n'est pas un bon indicateur quant à la concentration en Cu réellement phytodisponible (Brun *et al.*, 1998 ; Wightwick *et al.*, 2008). Il en est de même pour la concentration en Cu dans la solution du sol qui ne prend pas en compte la fraction de Cu échangeable dans le sol (Komarek *et al.*, 2010). Les techniques d'extraction comme l'EDTA peuvent surestimer le compartiment biodisponible (Novoa-Munoz *et al.*, 2007).

La nécessité de mettre en place des outils adaptés et intégrant l'ensemble des facteurs environnementaux et des phénomènes physico-chimiques régissant la distribution du métal dans le sol a amené au développement de nouveaux outils permettant d'estimer cette fraction biodisponible, et notamment les capteurs passifs tel que le système DGT (Diffusive Gradient in Thin Films). La particularité de ce système est que comme les plantes, il diminue localement la concentration en métal dans la solution du sol et intègre le compartiment labile de métal à la fois dans la solution du sol et dans la phase solide (Zhang *et al.*, 2001).

Son efficacité à mimer l'absorption de métal par une plante a déjà été démontré (Vandenhove *et al.*, 2007 ; Mihalik *et al.*, 2012, Zarrouk *et al.*, 2013\_) et notamment pour le cuivre (Zhang *et al.*, 2001). Récemment, son utilisation *in situ* sur des sols de rizières (Williams *et al.*, 2012) a montré la possibilité de mesurer directement la biodisponibilité dans le milieu naturel, ce qui permet d'intégrer d'éventuelles variations liées notamment aux conditions climatiques.

Cependant, aucune étude n'a été faite sur la validité du système DGT comme indicateur de la biodisponibilité du cuivre pour la vigne.

Afin de répondre au problème d'évaluation de la biodisponibilité du cuivre dans les sols viticoles, il semble donc aujourd'hui nécessaire de valider l'utilisation du système DGT comme indicateur pour l'espèce *Vitis vinifera*, espèce d'intérêt majeur dans la région bordelaise. Avant de pouvoir proposer ce capteur passif comme indicateur de la biodisponibilité dans des analyses de routine, il convient de vérifier plusieurs points :

- Les flux de métaux dans les sols en place sont-ils variables au cours du cycle de culture ?
- La mesure DGT réalisée en conditions contrôlées d'humidité et de température est-elle représentative des flux de métaux dans les sols en place?
- La mesure DGT est-elle représentative de l'absorption du cuivre par *Vitis vinifera* ?
- La technique DGT apporte-t-elle une information supplémentaire par rapport aux autres techniques utilisées en laboratoire ?

Afin de répondre à l'ensemble de ces questions, notre démarche a été de sélectionner un seul cépage, le cépage Merlot premier cépage rouge implanté au monde (IFVV) et le plus répandu dans le Bordelais, qui sera notre plante modèle pour cette étude. Nous avons alors sélectionné des sols de caractéristiques physicochimiques et de teneurs totales en cuivre différentes cultivés en Merlot, pour lesquels nous avons suivi la mesure DGT (en conditions contrôlées au laboratoire et sur le terrain) et les concentrations en cuivre dans les feuilles de vigne.

## 2. Matériels et Méthodes

### **2.1. Choix des parcelles**

Les parcelles choisies font parties du domaine de l'appellation Pessac-Léognan et entrent dans le cadre de recherches menées dans la thèse de Mme Anatole-Monnier. 10 parcelles ont été sélectionnées selon plusieurs critères :

- Cépage Merlot
- Vigne de préférence jeune dont le système racinaire est majoritairement dans l'horizon de surface
- Différentes concentration en cuivre total

Les données de concentrations en cuivre ont été précédemment acquises sur des échantillons de sols. Ces résultats ont permis de classer les parcelles selon un gradient de concentrations en cuivre, afin de constituer un panel de parcelles le plus représentatif possible des vignobles bordelais (Tableau I).

**Tableau I : Description des 10 parcelles sélectionnées selon le type de sol, l'année de plantation de la vigne, le pH du sol et les concentrations totales en cuivre**

| Nom parcelle | Texture du sol | Année de plantation de la vigne | pH  | Cu total mg/kg * |
|--------------|----------------|---------------------------------|-----|------------------|
| F1           | Sableux        | 2004                            | 7,9 | 1,43 ± 0,8       |
| A            | Sableux        | 1982                            | 5,9 | 16,46 ± 1,6      |
| G1           | Argileux       | 1940                            | 6,8 | 101,76 ± 5,6     |
| F2           | Argileux       | 2004                            | 8,3 | 105,76 ± 2,8     |
| G2           | Sableux        | 2005                            | 6,6 | 108,39 ± 7,2     |
| E            | Sableux        | 2007                            | 7,9 | 110,78 ± 5,7     |
| B            | Sableux        | 1995                            | 6,4 | 122,68 ± 1,3     |
| C            | Argileux       | 1990                            | 8,3 | 239,89 ± 5,8     |
| D1           | Sableux        | inconnue                        | 7,0 | 237,20 ± 20,2    |
| D2           | Sableux        | inconnue                        | 6,3 | 383,35 ± 197,7   |

\*La technique d'extraction du cuivre total (extraction à l'eau régale) est détaillée à la page 14. Le site de référence a été identifié comme la parcelle F1. En effet, cette parcelle a été plantée en 2004 sur un ancien sol forestier et n'a à ce jour subi aucun traitement cuprique.

## 2.2. Présentation du matériel végétal

Le cépage Merlot est issu de l'espèce *Vitis vinifera*, qui appartient à l'ordre des *Vitales* et à la famille des *Vitaceae*. Il est greffé sur un porte-greffe. Dans les différentes parcelles étudiées, nous n'avons pas pu obtenir d'informations complètes sur les porte-greffes utilisés mais dans la moitié des parcelles, le porte-greffe était 101-14.

Le développement de la vigne suit 2 cycles théoriques distincts annuels :

- le cycle hivernal : stade de repos végétatif de la vigne, qui débute à la mi-novembre et s'arrête au mois de mars
- le cycle végétatif : stade qui comprend le cycle reproductif, qui s'étend du mois de mars à la mi-novembre.

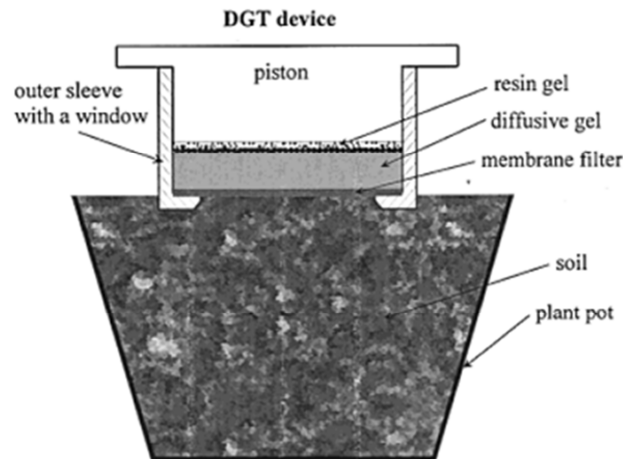
La température joue un rôle essentiel dans le cycle de vie de la vigne : le réveil végétatif dépend d'un cumul de température au-dessus de 10°C. A partir du 1er janvier de l'année, il faut faire la somme de tous les degrés supérieurs à 10°C de température moyenne par jour pour atteindre suivant les cépages entre 1500 °C et 3000°C par cycle végétatif. Les conditions météorologiques des mois de janvier à avril 2013 dans la région bordelaise ont allongé le cycle hivernal et retardé le cycle végétatif du fait de faible température (température moyenne : 8.3°C). En effet, le débourrement des feuilles n'a été observé qu'à partir du mois de mai, qui a habituellement lieu entre fin mars et début avril ([www.opusvins.com](http://www.opusvins.com)).

## 2.3. Système DGT

### 2.3.1. Principe de fonctionnement

Le dispositif de gradient de diffusion en couche mince (Diffusive Gradient in Thin film, DGT) est composé d'un support plastique (piston) sur lequel sont disposés successivement une phase sorbante (résine Chelex), un hydrogel de diffusion et un filtre. Le dispositif est

déposé face au sol, afin de permettre le contact entre la fenêtre de diffusion et le sol étudié (Figure 3). Ainsi, les ions diffusent à travers le filtre et le gel de diffusion pour atteindre la résine, sur laquelle ils se fixent de manière irréversible. En effet, la résine Chelex possède une forte affinité pour les métaux, permettant ainsi de créer un gradient de diffusion au sein de l'hydrogel et d'induire une concentration en métal quasiment nulle à la surface du filtre. Ce mécanisme entraîne une diminution de la concentration en ions dans la solution de sol à proximité du dispositif, ce qui peut entraîner une mobilisation des ions de la phase solide et un réapprovisionnement vers la solution du sol.



**Figure 3 : Schéma d'utilisation du système DGT (Zhang et al., 2001)**

### 2.3.2. Utilisation du système DGT en laboratoire

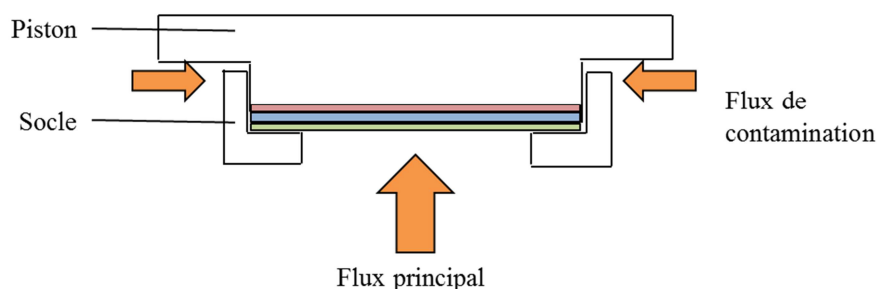
La mesure des flux et concentrations de métaux par la technique DGT est une pratique de routine en laboratoire. Pour cela, le sol étudié est tamisé à 2mm, homogénéisé et humidifié. Trois répétitions DGT, c'est-à-dire trois dispositifs sont placés sur le sol comme vu précédemment. L'échantillon est placé à l'étuve à 28°C durant 48h, seuil à partir duquel on estime que le système DGT a adsorbé la totalité du métal échangeable au contact de sa surface (Hooda *et al.*, 1999). Les DGT sont ensuite prélevées, la résine est mise dans une solution de HNO<sub>3</sub> (69%, ARISTAR) à 1M afin de désorber les ions fixés, pendant au minimum 24h. La résine est ensuite enlevée et la solution obtenue constitue notre échantillon à doser.

## 2.4. Mise en place du dispositif expérimental

### 2.4.1. Essai du mode opératoire

L'utilisation du système DGT *in situ* étant peu documentée, il a été nécessaire de développer un mode opératoire. Pour cela, deux méthodes ont été testées : poser les DGT à la surface du sol et enterrer les DGT à 10cm de profondeur. Le choix de cette hauteur s'est basé sur la reproductibilité et la faisabilité de la méthode, sachant que lors de prélèvement de sol, l'échantillon est extrait de 0 à 20cm de profondeur.

Le système DGT ne présente cependant pas une étanchéité parfaite : un espace entre le piston et le socle laisse supposer que les DGT enterrés pourraient être contaminés par un flux perpendiculaire au dispositif. (Figure 4)

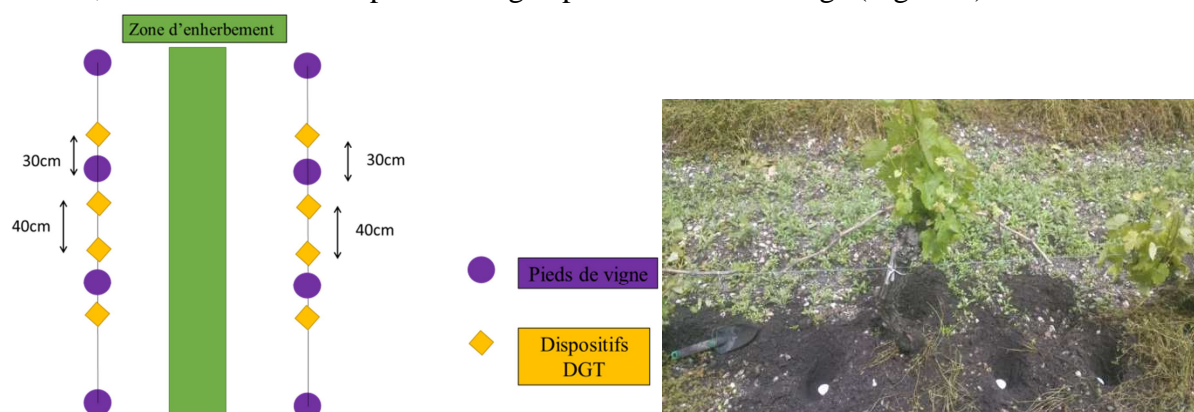


**Figure 4 : Système de contamination supposé des capteurs DGT enterrés**

Afin d'éviter cette contamination, l'espace entre le socle et le piston a été étanchéifié avec du ruban téflon. Les DGT ont ensuite été posés *in situ* sur une parcelle du domaine viticole de l'INRA, à la surface du sol d'une part et à 10cm de profondeur d'autre part, pendant 48h. Durant le temps de pose, les DGT de surface ont été balayés par le vent, malgré leur protection par un fond de bouteille renversé. L'utilisation du capteur en surface n'a donc pas été jugée pertinente et adaptée aux conditions environnementales. Il a donc été décidé d'enterrer les DGT à 10cm de profondeur pour la suite des expériences, afin de mimer au mieux les conditions racinaires. Le mode opératoire est détaillé en annexe 1.

#### 2.4.2. Disposition des systèmes DGT

A la suite de ces résultats préliminaires, il a été choisi d'enterrer huit DGT sur chaque parcelle encadrant au total 4 pieds de vigne plantés sur deux rangs (Figure 5).



**Figure 5 : Disposition des systèmes DGT *in situ* sur chaque parcelle**

Chaque pied est donc entouré de deux DGT, disposés à 30cm de part et d'autre de la base du cep, comme illustré sur la photo ci-dessus. Il est important de remarquer que sur certaines parcelles et à cette profondeur, on a pu observer des racines de pied de vigne.

Les systèmes DGT ont été enterrés durant 48h, rincés puis ramenés au laboratoire. La température du sol a été suivie pendant toute la durée de l'essai, ce paramètre entrant dans le calcul des concentrations en cuivre relevées. L'expérimentation a été menée au mois de mars et au mois de mai sur chacune des 10 parcelles.

Une fois au laboratoire, les échantillons ont été préparés selon le même protocole décrit précédemment lors de l'utilisation des systèmes DGT *ex situ*.

### **2.4.3. Prélèvement et préparation des échantillons de feuilles**

Lors de la deuxième campagne au mois de mai, quatre feuilles au stade F5 F6 ont été prélevées sur chaque pied entouré de capteurs DGT sur chaque parcelle, ce qui constitue un total de 4 échantillons de feuilles par parcelle. Les feuilles ont été rincées, séchées et minéralisées. Pour cela, les feuilles ont été immergées dans une solution d'acide nitrique et d'eau oxygénée puis minéralisées au bain-marie durant 3h.

### **2.5. Autres techniques**

En laboratoire, d'autres techniques d'analyses sont utilisées pour estimer la fraction de cuivre dans des échantillons de sol. Afin de caractériser la complémentarité de l'information apportée par le capteur DGT, ces autres méthodes ont été appliquées sur des échantillons de sol prélevés sur les 10 parcelles étudiées.

#### **2.5.1. Prélèvement par bougie poreuse**

La bougie poreuse est une technique permettant d'extraire la solution du sol. Pour un échantillon de sol, on place 700g de sol humidifié dans une boîte que l'on place à l'étuve à 28°C durant 24h, afin que le sol se stabilise. Ensuite, une bougie microporeuse (Rhizon, Eijkelkamp) est insérée dans le sol, reliée à une seringue récoltant la solution prélevée par la bougie. Après 24h, la solution du sol prélevée est acidifiée à 10% d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub> 69%, ARISTAR) puis analysée.

#### **2.5.2. Extraction du cuivre à l'EDTA**

L'EDTA, ou acide éthylène diamine tétraacétique, est un complexant qui se lie aux cations métalliques et permet leur extraction des échantillons de sol. Le cuivre extrait à l'EDTA est considéré comme le cuivre potentiellement biodisponible.

Afin de réaliser une extraction à l'EDTA, le sol est préalablement séché et tamisé. Ensuite, 2,5g de sol sont placés dans 25mL d'une solution d'EDTA sodique (Analytical reagent grade, Fisher) préparée au laboratoire. L'échantillon est placé sur une table d'agitation durant 1h puis centrifugé à 1000g pendant 15min. Le surnageant est prélevé à l'aide d'une seringue puis filtré et analysé.

#### **2.5.3. Extraction du cuivre à l'eau régale**

L'eau régale est un mélange d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique, permettant d'extraire la totalité des métaux présents dans un échantillon de sol.

Pour une extraction à l'eau régale, le sol est séché, tamisé puis broyé. 500mg de sol sont placés dans 3,75mL d'acide chlorhydrique (HCl 37%, Fisher Chemical) et 1.75mL d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub> 69%, ARISTAR). L'échantillon est chauffé dans un four à micro-onde par rampe de température jusqu'à 180°C pendant 25min. Le minéralisat est ensuite filtré et analysé.

## **3. Analyse des échantillons et traitements et données**

Tous les échantillons ont été analysés en spectrométrie d'absorption atomique par électrothermie (AAS four/flamme).



### 3.1. Calcul des concentrations et flux de métal pour le système DGT

Pour le capteur DGT, la mesure de la masse de cuivre accumulé sur la résine Chelex ainsi que la mesure de la concentration en ions dans les solutions de désorption permettent à l'aide de la loi de Fick le calcul du flux de métal à travers le dispositif.

On le calcule ainsi :

$$F = \frac{M}{A \cdot t}$$

On en déduit la concentration en métal C DGT :

$$C \text{ DGT} = \frac{F \cdot \Delta g}{D}$$

Avec :

F = flux de forme labile de métal (en ng/cm<sup>2</sup>/s)

M = masse de l'ion métallique accumulée sur la résine (en g)

A = l'aire de la surface de gel exposée au sol (fixée à 3.14 cm<sup>2</sup>)

t = temps du déploiement du DGT (en s)

C DGT = concentration de métal labile dans la solution (en µg/cm<sup>3</sup>)

Δg = épaisseur de la couche de gel de diffusion (fixée à 0.093 cm)

D = coefficient de diffusion de l'ion (dépend de la température du sol, en cm<sup>2</sup>/s)

### 3.2. Traitement des données

Toutes les données présentées ont été traitées grâce au logiciel R et soumise au test de normalité de Shapiro Wilk. Suivant les résultats et la nature des échantillons, les tests de Wilcoxon, Kruskal Wallis, Turkey et une analyse en composante principale ont été utilisés. L'ACP a été réalisée grâce au logiciel systat11.

## 4. Résultats et discussion

### 4.1. Mesure DGT

#### 4.1.1. Analyse des flux mesurés au laboratoire

Les flux de cuivre obtenus selon le protocole DGT *ex situ* sont détaillés dans la Figure 6. Les parcelles ont été classées selon un flux DGT croissant de cuivre.

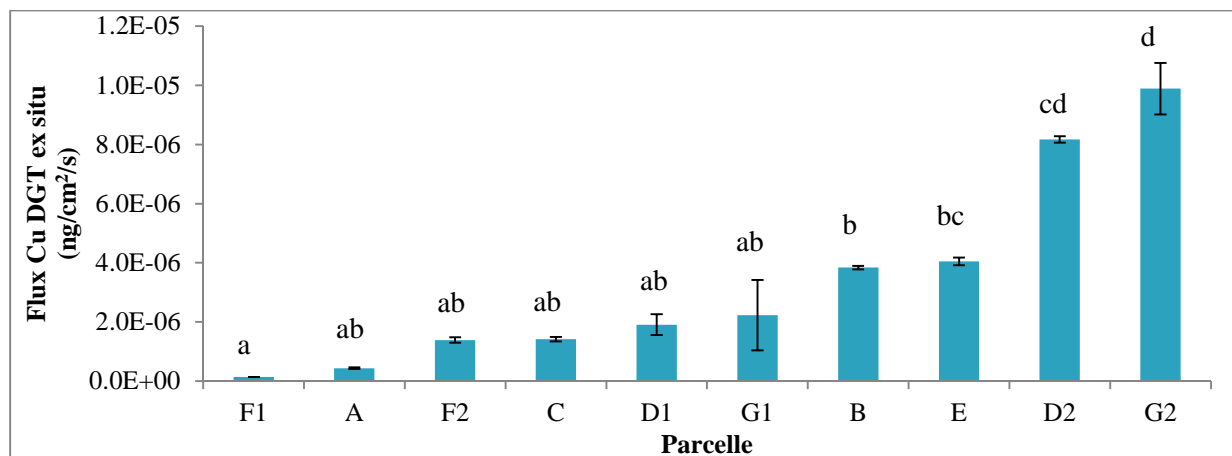
Les flux mesurés varient d'un facteur d'environ 70 entre la parcelle la plus contaminée (G2) et la moins contaminée (F1). Un gradient de cuivre disponible est bien observé avec le système DGT : la parcelle F1, témoin de l'étude, présente le plus faible flux de cuivre disponible soit  $1,39 \cdot 10^{-7}$  ng/cm<sup>2</sup>/s.

Ensuite, nous pouvons constater que les écarts-types de mesure DGT pour chaque sol sont relativement faibles, le seul sol présentant une forte variabilité dans la mesure étant le sol G1. La répétabilité de la mesure DGT est donc globalement bonne et permet d'obtenir des résultats sensiblement identiques. L'utilisation du système DGT en laboratoire présente donc des résultats cohérents et intéressants.

Une analyse de Kruskal-Wallis confirme que les sols présentent des flux DGT statistiquement différent ( $p < 0.005$ ). Grâce au test de Tukey, des classes ont pu être établies, représentées par

les lettres « a », « b », « c » et « d ». Les groupes présentant une lettre en commun n'ont pas été démontrés comme significativement différents. On constate que la parcelle F1 présente des flux de cuivre statistiquement inférieurs à toutes les autres parcelles, ce qui était le résultat attendu, cette parcelle n'ayant subi à ce jour aucun traitement cuprique. Les parcelles A, F2, C, D1 et G1 ont des flux comparables, les autres parcelles présentant des flux relativement différents.

Le classement des parcelles établi selon la concentration de cuivre total croissante dans le Tableau I n'est pas le même que celui pour le flux de cuivre DGT : la parcelle D2, la parcelle présentant la plus forte concentration en cuivre total (383 mg/kg), reste une des parcelles avec un flux de cuivre disponible parmi les plus élevés de  $8,17 \cdot 10^{-6}$  ng/cm<sup>2</sup>/s. Cependant, celui-ci est plus faible que le flux mesuré sur la parcelle G2 ( $9,89 \cdot 10^{-6}$  ng/cm<sup>2</sup>/s), alors que la concentration totale en cuivre de cette parcelle est plus de trois fois inférieure à celle de la parcelle D2. Le facteur pouvant expliquer ces modifications est lié aux propriétés des sols : en effet, la biodisponibilité du métal dépend certes de la quantité de cuivre totale mais surtout des propriétés physico-chimiques du sol qui permettent au cuivre de passer en solution et d'y être présent sous une forme labile. Le pH, la teneur en matières organiques, la texture, la composition en oxydes de fer ou de manganèse du sol jouent sur ces propriétés de sorption et sur la complexation du cuivre. Les sols ne présentaient pas la même texture ni le même pH et nous supposons qu'ils n'ont pas la même teneur en matières organiques ou la même composition minéralogique.



**Figure 6 : Moyenne des concentrations en cuivre mesurées *ex situ* par parcelle**

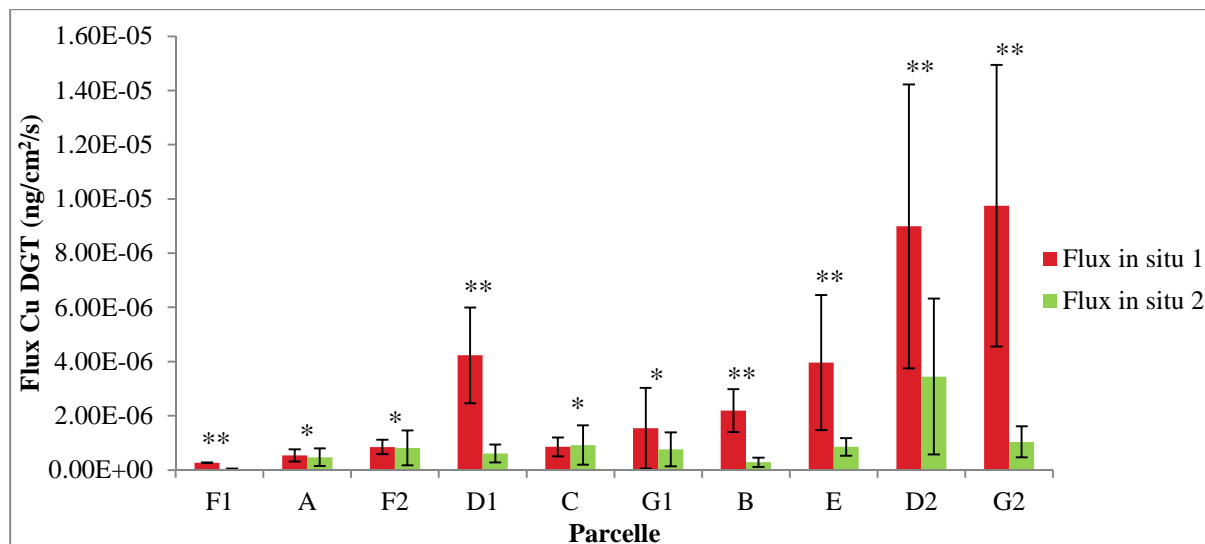
#### 4.1.2. Comparaison des flux de cuivre mesurés *in situ* au mois de mars et de mai

Lors du premier prélèvement, c'est-à-dire au mois de mars (*in situ* 1), les flux DGT de cuivre mesurés sont bien différents entre chaque parcelle, ce qui était une des conditions de nos expériences afin de constituer un panel de sols le plus large possible. Pour la parcelle F1, le flux moyen de cuivre au mois de mars est de  $2,67 \cdot 10^{-7}$  ng/cm<sup>2</sup>/s alors que pour la parcelle G2 le flux est plus de 36 fois supérieur, d'une valeur de  $9,75 \cdot 10^{-6}$  ng/cm<sup>2</sup>/s. A l'exception du sol D1, le classement obtenu à partir des mesures *in situ* 1 est le même que celui obtenu avec les mesures réalisées au laboratoire. L'analyse des flux mesurés en mai montre des différences plus importantes, avec un facteur de 112 entre la valeur la plus élevée (parcelle D2) et la

valeur la plus faible (parcelle F1). Le classement des sols selon leur disponibilité en cuivre est ici complètement modifié.

Les écarts-type de l'ensemble des valeurs sont assez élevés, quelle que soit la date. Cela s'explique par la variabilité du milieu sol, qui est liée à l'hétérogénéité de sa composition minérale et organique ainsi qu'à l'action variable des organismes biologiques, notamment la proximité variable des racines. En effet, alors que la mesure *ex situ* est répétée trois fois sur le même échantillon de terre préalablement homogénéisé et qu'elle ne représente en théorie que la variabilité de réponse du dispositif, la mesure *in situ* est réalisée à 8 endroits différents de la parcelle, intégrant à la fois la variabilité de la réponse du dispositif et l'hétérogénéité spatiale du sol.

La comparaison entre les flux de cuivre mesurés au mois de mars et de mai est représentée par le graphique ci-dessous (Figure 7). En abscisse, on retrouve l'identification de chaque parcelle et en ordonnée la valeur des flux correspondants en  $\text{ng}/\text{cm}^2/\text{s}$ . Les flux mesurés en mars sont représentés en rouge, les flux mesurés en mai en vert.



**Figure 7: Moyenne des flux de cuivre obtenus avec le système DGT sur le terrain en mars (*in situ 1*) et en mai (*in situ 2*) pour chaque parcelle**

Les flux surmontés de deux étoiles ont été démontrés comme statistiquement différents contrairement à ceux surmontés d'une seule étoile.

L'analyse statistique de ces données par un test de Wilcoxon fait ressortir que les flux de mars sont supérieurs aux flux de mai ( $p < 0.005$ ). Dans le détail, cette observation se vérifie pour six des dix parcelles : F1, D1, B, E, D2, G2. Pour la parcelle D1, le flux moyen atteint  $4.23 \cdot 10^{-6} \text{ ng}/\text{cm}^2/\text{s}$  pour l'essai de mars alors que le flux moyen du mois de mai est de  $6.11 \cdot 10^{-7} \text{ ng}/\text{cm}^2/\text{s}$ , soit un flux près de sept fois inférieur à celui de mars.

Il n'existe à priori donc aucune relation entre les deux mesures. Cette observation est assez étonnante : elle signifierait que la mesure DGT faite en mai semble indépendante de celle faite en mars. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : soit la mesure est perturbée par des facteurs biologiques, soit la disponibilité du cuivre évolue en cours de culture sous l'influence de facteurs environnementaux (évolution des paramètres physicochimiques sous

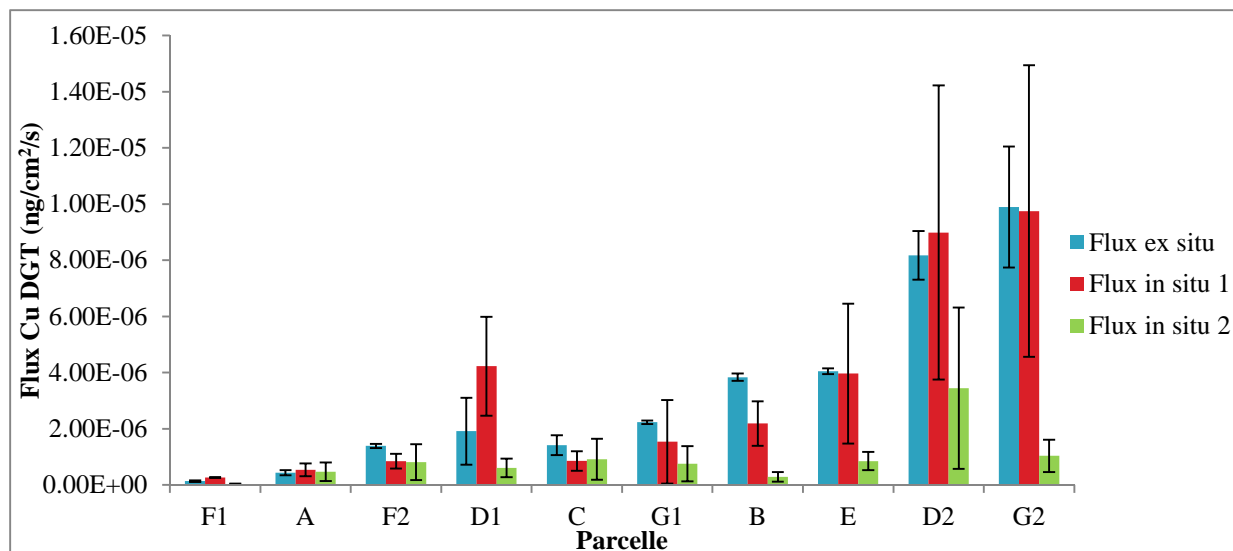
l'influence de facteurs climatiques), soit les mesures DGT du mois de mai ont été mal réalisées. Cette dernière hypothèse est peu probable : en effet, les mêmes dispositifs DGT ont été utilisés par les mêmes opérateurs et le même mode opératoire a été appliqué.

Afin de vérifier l'hypothèse concernant l'évolution de la biodisponibilité du cuivre au cours du temps de l'expérimentation, il aurait fallu réaliser au moins une mesure intermédiaire entre le mois de mars et le mois de mai pour pouvoir la confirmer. Dans le cas où cette différence serait liée aux facteurs biologiques, on peut l'expliquer ainsi : au mois de mars la plante est en repos hivernal et les racines interagissent peu avec le sol environnant. De plus, du fait des faibles températures (9°C en moyenne au mois de mars), on peut considérer que les micro-organismes du sol et au sein de la rhizosphère ont une activité ralentie. La mesure DGT faite sur cette période nous permet donc d'évaluer la quantité théorique de cuivre biodisponible pour le végétal. Au mois de mai, la plante est en phase végétative, ce qui implique que l'activité racinaire a repris et qu'elles ont la capacité de modifier leur environnement proche. Ces modifications peuvent être de plusieurs types : tout d'abord, le pH du sol peut être modifié. La respiration racinaire entraîne la production d'ions  $\text{HCO}_3^-$  et les racines peuvent sécréter des exsudats de type hydroxyles. Ces processus tendent à élever le pH dans le sol rhizosphérique, ce qui entraîne une diminution de la disponibilité du cuivre. Pour le vérifier, il aurait fallu prélever le sol après la mesure DGT, afin de mesurer le pH à l'endroit même où le dispositif a été déposé. Bravin (2008) avait effectivement démontré pour le blé que la réponse de la DGT était fortement modifiée dans le sol rhizosphérique et que le pH augmentait au sein de l'environnement racinaire. Il soulignait cependant que la modification du pH n'explique pas à elle seule la variabilité de la mesure DGT.

Ensuite, le prélèvement de la solution du sol par les racines peut entraîner une compétition avec les différents organismes, et dans notre cas avec le système DGT. De plus, l'élévation de la température a aussi permis aux micro-organismes du sol de reprendre leur activité. La mesure DGT faite au mois de mai rend donc compte de l'ensemble de ces facteurs. L'influence des paramètres biologiques et physicochimiques expliquerait pourquoi les flux du mois de mai sont nettement inférieurs aux flux du mois de mars.

#### **4.1.3. Comparaison des flux de cuivre *in situ* et *ex situ***

Les données mesurées *in situ* et *ex situ* sont comparées dans la Figure 8, avec en ordonnée les flux de cuivre en  $\text{ng/cm}^2/\text{s}$ , en abscisse le nom de la parcelle. En bleu, les résultats obtenus au laboratoire, en rouge ceux obtenus lors de l'essai du mois de mars et en vert ceux du mois de mai. Les flux DGT obtenus sur le terrain lors de la mesure de mars sont linéairement corrélés avec les flux obtenus au laboratoire ( $R^2 = 0,89$ ) : ce résultat indique que l'utilisation du système DGT *in situ* présente des résultats cohérents avec ceux obtenus *ex situ* et que son utilisation est donc possible en plein champ.



**Figure 8: Moyenne des flux de cuivre obtenus sur les parcelles avec le système DGT en laboratoire (*ex situ*) et sur le terrain au mois de mars (*in situ* 1) et de mai (*in situ* 2)**

Cependant, les flux obtenus en mars *in situ* sont plus élevés que ceux obtenus au laboratoire, en moyenne d'un facteur 1,7. En revanche, les flux de cuivre de l'essai 2 sont quasiment tous inférieurs aux flux *ex situ* et *in situ* 1, cette différence étant plus marquée pour les parcelles D1, G1, B, D2 et G2. Par exemple pour la parcelle B, le flux *ex situ* est de  $3,84 \cdot 10^{-6}$  ng/cm<sup>2</sup>/s contre  $2,88 \cdot 10^{-7}$  ng/cm<sup>2</sup>/s pour l'essai 2, soit une différence de plus d'un facteur dix. Il ne semble donc pas y avoir de relation entre le flux de cuivre *ex situ* et le flux *in situ* mesuré en mai.

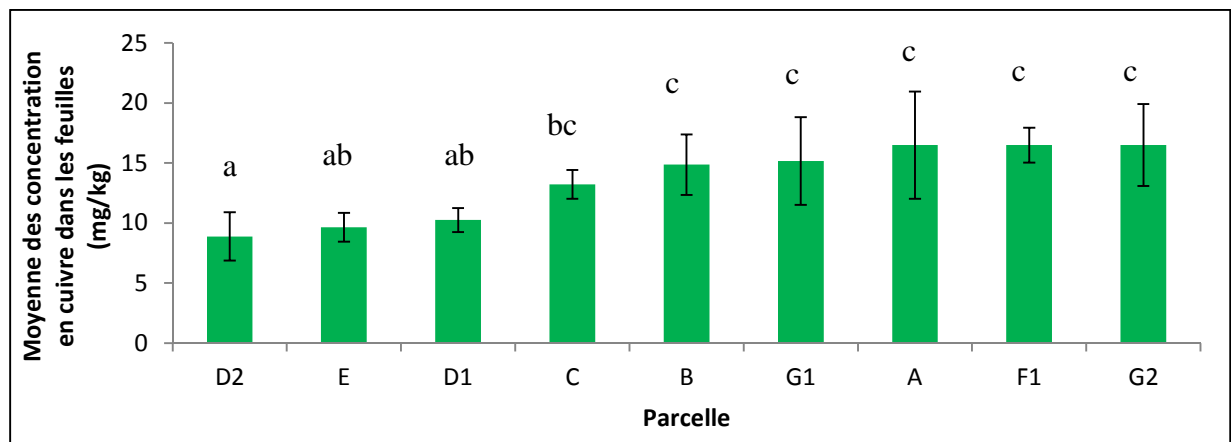
L'ensemble de ces résultats semblent cohérents avec l'hypothèse avancée précédemment. En effet, les résultats de laboratoire sont corrélés positivement à ceux de l'essai 1 : l'expérience *in situ* 1 reflète le flux de cuivre disponible lorsque l'activité des racines est inexistante ou ralentie, ce que miment les conditions de laboratoire, les sols n'étant pas exposés à des racines. Cependant, la mesure *ex situ* est réalisée à 28°C, qui correspond à la température optimale de croissance des micro-organismes ; l'influence de ces derniers sur les mesures DGT et la disponibilité du cuivre est donc ici peu probable. Les flux de cuivre de l'essai 2 sont tous inférieurs à ceux obtenus *ex situ* et en *in situ* 1, ce qui se justifie par la modification des conditions environnementales qui semblent induire une diminution de la biodisponibilité du cuivre.

D'autre part, les sols présentant les plus forts flux de cuivre tous essais confondus, c'est-à-dire B, E, D2, et G2 sont tous des sols sableux (Tableau I). Or les phénomènes de toxicité sur la vigne ont principalement été observés sur des sols enrichis en sable (Toselli *et al.*, 2008).

#### 4.2. Relation du flux de cuivre DGT avec la concentration en cuivre dans les feuilles de vignes

La moyenne des concentrations dans les feuilles de vigne est de 13,5 mg/kg, qui se trouve dans la gamme de valeurs permettant un optimum de croissance de la plante (Figure 1). L'analyse statistique des résultats obtenus par une ANOVA montre qu'il existe une différence significative entre les parcelles. En comparant les données entre chaque parcelle par un test de

Tukey, on peut établir quatre groupes de parcelles, représentés par les lettres a, b et c sur la Figure 9.

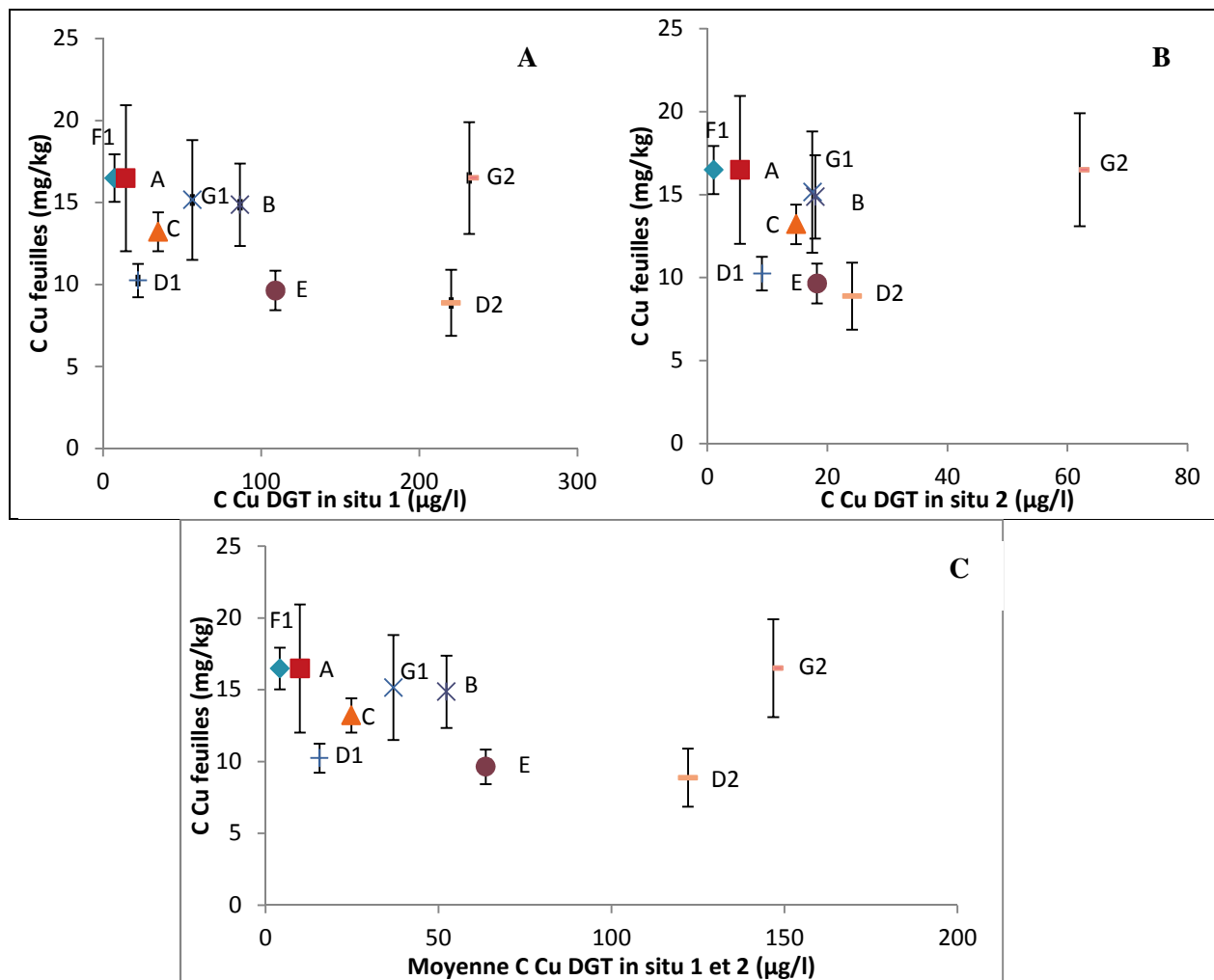


**Figure 9 : Moyenne des concentrations en cuivre dans les feuilles de vignes par parcelle**

Le groupe « a » est significativement différent des groupes « bc » et « c », le groupe « ab » est significativement différent du groupe « c ». La moitié des parcelles se trouve dans le groupe « c », présentant les plus fortes concentrations en cuivre dans les feuilles. Une remarque importante qui peut être faite est que les parcelles A et F1, présentant les plus faibles flux de cuivre DGT, se trouvent dans le groupe « c ». A contrario, la parcelle D2 dont les flux de cuivre DGT sont parmi les plus élevés présente les plus faibles concentrations en cuivre dans les feuilles de vigne. Cette tendance indiquerait que plus la quantité de cuivre disponible augmente dans le sol, plus la concentration dans les feuilles diminue, ce qui est un résultat inattendu.

Afin de vérifier cette hypothèse, la concentration dans les feuilles de vigne a été comparée à la concentration en cuivre mesurée par le système DGT pour chaque parcelle. Ainsi, la Figure 10 présente la relation entre les moyennes des concentrations en cuivre dans les feuilles en mg/kg en ordonnée et les moyennes des concentrations DGT de cuivre en abscisse obtenues lors de la mesure de mars (A), de mai (B) et la moyenne des deux mesures DGT.

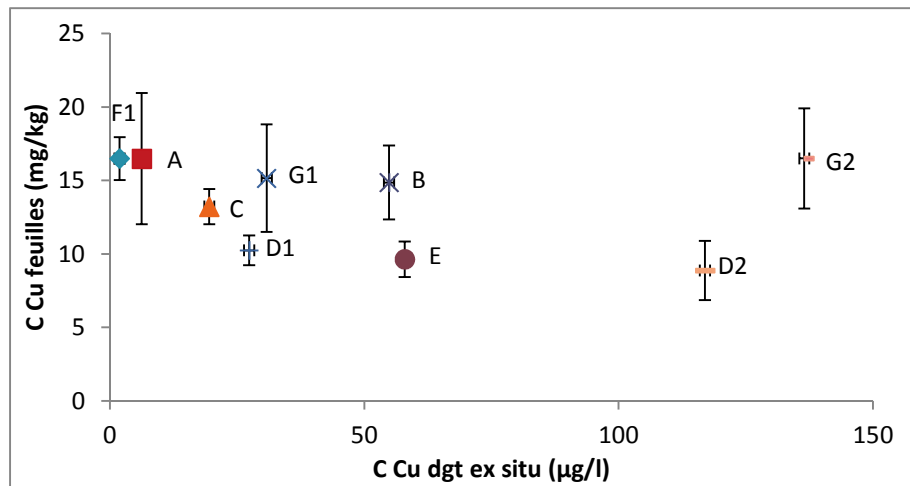
Cependant, en comparant les concentrations en cuivre dans les feuilles avec les concentrations en cuivre mesurées avec les systèmes DGT pour chaque parcelle, les nuages de points obtenus pour l'essai 1 (A) et l'essai 2 (B) ressemblent à des courbes dose-réponse (Figure 10) : on remarque là aussi que plus le flux de cuivre augmente, plus la concentration en cuivre diminue dans les feuilles. Une seule parcelle ne semble pas suivre ce schéma et ce pour les deux essais, la parcelle G2.



**Figure 10 : Moyenne des concentrations en cuivre dans les feuilles de vigne en fonction des concentrations de cuivre DGT par parcelle relevés lors de l’essai du mois de mars (A) de mai (B) et la moyenne des deux mesures (C)**

La concentration en cuivre DGT étant élevée lors des deux mesures, on peut supposer que la différence avec les autres parcelles vient de la teneur en cuivre dans les feuilles qui a pu être surestimée ou alors des propriétés biochimiques spécifiques de ces plants de vigne qui induisent une forte translocation du cuivre vers les parties aériennes.

Il est important de remarquer qu’on obtient le même type de graphique pour les deux essais (10A et 10B), en sachant que les flux de cuivre obtenus lors de la mesure de mai étaient inférieurs à ceux de la mesure de mars ; cette répétabilité de résultats nous permet de mettre en évidence que le système DGT est un bon indicateur de la biodisponibilité du cuivre. En moyennant les mesures des mois de mars et de mai, le même type de courbe dose-réponse est obtenue (Figure 10 C) : on peut donc établir la biodisponibilité du cuivre sur un cycle annuel. Cette tendance de courbe dose-réponse est aussi obtenue en comparant les concentrations dans les feuilles à la concentration en cuivre mesurée *ex situ*, représentée sur la Figure 11. La parcelle G2 ne suit toujours pas la même tendance que les autres parcelles.



**Figure 11** : Moyennes des concentrations en cuivre dans les feuilles de vigne en fonction des moyennes des concentrations DGT de cuivre *ex situ* par parcelle

Ces résultats sont étonnants car, compte tenu des travaux précédents (Zhang *et al.*, 2001), nous nous attendions à une relation positive entre la concentration dans la feuille et les concentrations DGT. De plus, des études précédentes sur boutures franches de *Vitis vinifera* et *Vitis rupestris* (Anatole-Monnier *et al.*, 2013), montrent que plus l'exposition au cuivre augmente, plus la concentration dans les différents organes de la vigne, sauf les feuilles matures, augmente. Cependant, ces résultats sont différents suivant les cultivars, la variété utilisée comme porte-greffe (*Vitis rupestris* 101.14) augmentant très fortement la concentration dans les racines alors que le cépage Merlot aurait plutôt tendance à transloquer le cuivre vers les parties aériennes.

Les résultats obtenus montrant une relation négative entre les concentrations en cuivre DGT dans les sols et les concentrations en cuivre dans les feuilles du végétal nous amènent à penser que les vignes en plein champ auraient recours à une stratégie d'exclusion du métal. Ce mécanisme d'exclusion pourrait se traduire par une augmentation de la concentration en cuivre dans les racines du végétal, ce qui a été observé pour le maïs (Ouzounidou *et al.*, 1995), le concombre et le blé tendre (An, 2006). Qu'en est-il de plantes greffées Merlot sur *Vitis rupestris* 101.14 ? Le greffage peut-il expliquer les résultats obtenus sur le terrain ? Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse. Les difficultés techniques liées aux prélèvements de plants *in situ* ou à l'interprétation des résultats obtenus sur le terrain avaient déjà été souligné par Michaud en 2007. En effet dans notre étude, les pieds choisis sont plantés depuis au minimum 6 ans et cultivés par les viticulteurs. Le système racinaire est donc bien développé et il n'est pas impossible que les vignes aient une morphologie racinaire leur permettant de « fuir » la contamination. Dans l'hypothèse où plus l'horizon de surface est contaminé, plus les racines des plantes vont puiser les éléments en profondeur dans des couches non contaminées, le niveau de concentration en éléments des feuilles produites serait modifié et non lié à une stratégie d'exclusion du cuivre de l'organisme. Ainsi, nos observations seraient complètement biaisées par ce comportement. Afin de vérifier cette théorie, il serait nécessaire de compléter cette étude par des travaux en conditions contrôlées

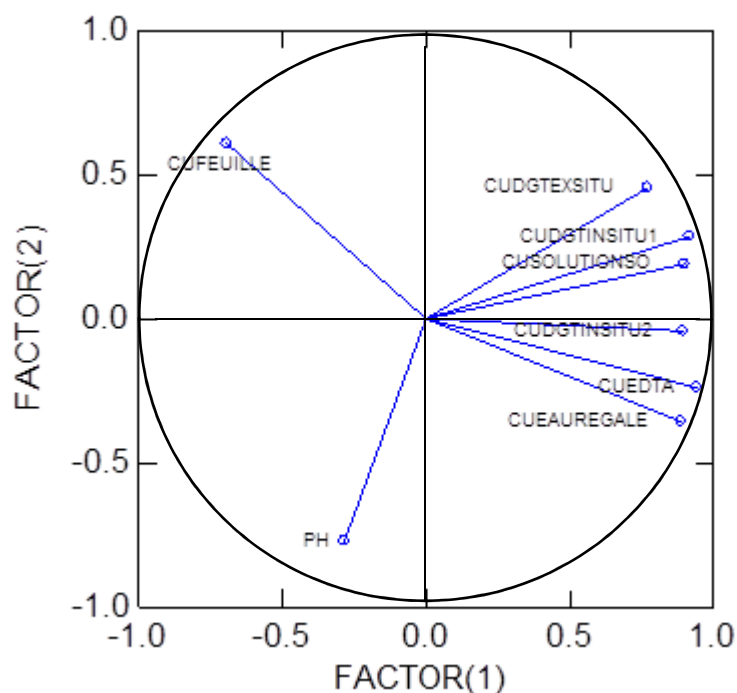


en pots et avec des plants greffés, où les racines seraient inévitablement exposées à la contamination cuprique.

#### 4.3. Comparaison des capteurs DGT avec les autres techniques d'évaluation de la concentration en cuivre dans les sols

En laboratoire, des techniques sont utilisées pour évaluer la teneur totale d'un métal dans un sol (extraction à l'eau régale), la concentration de cet élément dans la solution du sol (extraction par bougie poreuse), ainsi que la disponibilité de l'élément (extraction à l'EDTA). Le capteur DGT a été démontré comme un bon outil dans l'évaluation de la biodisponibilité d'éléments métalliques du fait qu'il intègre l'ensemble du pool labile des éléments dans un sol. L'enjeu est de savoir ici si l'outil DGT apporte une information différente et complémentaire des autres techniques déjà utilisées en routine en laboratoire et si la mesure DGT pourrait être déduite des mesures précédentes. Pour cela, ces trois extractions ont été réalisées sur des échantillons de sol des dix parcelles étudiées. L'ensemble des résultats des extractions ainsi que les résultats obtenus pour les essais de DGT *in situ* et *ex situ* sont regroupés en annexe 2.

Afin d'établir d'éventuelles relations entre les différentes techniques, les données ont été comparées par une analyse en composantes principales (ACP). Le graphique obtenu est représenté par la Figure 12.



**Figure 12** : ACP de l'ensemble des données mesurées sur les sols étudiés

L'axe 1 explique 66% de la variabilité de l'ensemble des données et l'axe 2 en explique 18%, ce qui indique que les variables sont très corrélées entre elles et qu'une analyse en deux dimensions, c'est-à-dire suivant ces deux axes est suffisante. Plus une variable sera proche du cercle de corrélation, plus cette variable sera bien expliquée et plus elle sera proche d'un axe

(c'est à dire plus l'angle entre cette variable est l'axe sera faible), plus elle sera bien représenté par cet axe.

Les variables Cu DGT *ex situ*, Cu DGT *in situ* 1, Cu solution du sol, Cu DGT *in situ* 2, Cu EDTA et Cu eau régale se trouvent toutes du même côté du cercle et toutes assez proches de l'axe 1, ce qui signifie qu'elles sont bien corrélées entre elles et relativement bien expliquées. Ainsi, les concentrations DGT mesurées soit au laboratoire, soit sur le terrain semblent essentiellement corrélées avec la teneur totale en cuivre du sol, ou la teneur en cuivre extractible à l'EDTA, mais pas ou peu avec le pH. Les régressions linéaires entre ces variables permettent de calculer des régressions linéaires significatives entre la concentration DGT mesurée *in situ* en mars et en mai et la teneur totale de cuivre dans les sols :

$$[\text{Cu}]_{\text{DGT in situ 1}} = 16 + 0.673 [\text{Cu}]_{\text{EDTA}} \quad (R^2=0.76 ; p<0.01)$$

$$[\text{Cu}]_{\text{DGT in situ 1}} = 14.54 + 0.445 [\text{Cu}]_{\text{eau régale}} \quad (R^2=0.64 ; p<0.05)$$

$$[\text{Cu}]_{\text{DGT in situ 2}} = 2.563 + 0.168 [\text{Cu}]_{\text{EDTA}} \quad (R^2=0.65 ; p<0.005)$$

$$[\text{Cu}]_{\text{DGT in situ 2}} = -0.199 + 0.128 [\text{Cu}]_{\text{eau régale}} \quad (R^2=0.61 ; p<0.005)$$

Les essais de régressions multiples en ajoutant la variable pH n'ont pas permis d'améliorer la régression. Le modèle retenu est donc une régression linéaire simple avec la teneur en cuivre du sol, extraite par l'eau régale ou l'EDTA.

. La concentration en cuivre biodisponible dans le sol apparaît ici dépendant de la teneur totale mais indépendante du pH, contrairement à ce qui avait été montré par Brun (1998) et Fan (2011). Il serait important de confirmer ces résultats sur un plus grand nombre de données.

## **Synthèse et recommandations pour l'usage de la DGT pour évaluer la biodisponibilité du cuivre dans les sols viticoles**

Cette étude nous a permis de mettre en évidence que le système DGT est un bon indicateur de la biodisponibilité du cuivre dans les sols viticoles. Cette mesure est dépendante de la concentration en cuivre total dans le sol mais permet d'intégrer l'influence des paramètres environnementaux. Il serait tout de même intéressant de confirmer ces résultats sur un nombre plus important de parcelles et sur une échelle de temps plus longue afin de valider son utilisation *in situ*. Dans une perspective d'amélioration de la mesure, il serait pertinent d'approfondir la problématique liée à la profondeur du prélèvement racinaire. Ainsi, des analyses DGT sur des horizons plus profonds permettraient de valider ou non l'hypothèse de « fuite » du système racinaire face à la contamination cuprique. L'analyse en parallèle d'un autre élément (autre oligoélément comme le zinc ou élément non essentiel comme le plomb ou le cadmium) permettrait peut-être de mieux comprendre le comportement de prélèvement de la vigne, expliquant ainsi les relations entre biodisponibilité dans le sol et prélèvement.

Les phénomènes de toxicité liés au cuivre étant principalement observés sur les jeunes plants de vigne (et donc possédant leur système racinaire dans l'horizon de surface, le plus contaminé en cuivre) ainsi que sur les cultures installées après arrachage d'une vieille vigne, la mesure DGT pourrait permettre de prévenir ces symptômes. En effet, une mesure préalable

avant replantation permettrait de diagnostiquer ou non la nécessité de mettre en place une décontamination ou une gestion agronomique adaptée de la parcelle. L'élévation du pH par épandage de chaux ou l'apport de matière organique afin d'immobiliser le métal diminuerait la biodisponibilité du cuivre et ainsi améliorerait sensiblement le succès de la replantation, dans la mesure où une décontamination totale n'est pas envisageable sur des sols agricoles.

Cette analyse DGT pourrait être réalisée en routine dans les laboratoires ou bien par les professionnels du monde agricoles. Ainsi, le protocole établie en annexe 1 pourrait être proposé comme outil au diagnostic de la contamination cuprique d'une parcelle.

## Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans cette étude nous permettent tout d'abord de valider l'utilisation du système DGT *in situ* ; en effet, les flux de cuivre obtenus sur le terrain hors période végétative sont comparables et corrélés à ceux obtenus au laboratoire. Par contre, la mesure du flux de cuivre réalisée à des périodes distinctes du cycle de culture de *Vitis vinifera* donne des résultats significativement différents. Ainsi, la technique *in situ* semble permettre d'intégrer les facteurs environnementaux qui ne sont pas reproductibles avec la technique *ex situ*, et notamment l'influence du système racinaire ainsi que l'activité biologique du milieu sol. En perspective de ces résultats, ces mesures pourraient être réalisées à d'autres périodes de l'année, afin d'observer l'évolution de la disponibilité du cuivre sur un cycle annuel.

L'observation de la diminution de la concentration dans les feuilles de vigne avec l'augmentation de la concentration en cuivre dans les sols vient souligner une problématique qui pourrait amener à controverse : en effet, la bouillie bordelaise est utilisée en viticulture comme fongicide contre le mildiou par pulvérisation du produit sur les feuilles. Plus la quantité de bouillie utilisée est importante, plus les concentrations en cuivre dans les sols seront élevées. Les résultats présentés dans ce rapport avance que plus la quantité de cuivre biodisponible dans le sol augmente, plus la concentration en cuivre dans les feuilles diminue, et donc l'effet contre le mildiou diminue. On obtient donc le résultat inverse de celui préconisé, à une échelle quantitative certes moindre. Il est donc aujourd'hui essentiel de prendre en compte les phénomènes régissant la biodisponibilité des éléments afin de gérer au mieux les pratiques agricoles dans un contexte de prise de conscience environnementale.

## Références bibliographiques

**An Y-J.**, 2006. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere* 62, 1359–1365

**Anatole-Monnier L., Thiery D., Coriou C., Bussière S., Gambier S., Cors S., Denaix L.**, 2013. Effect of copper exposure on growth of grapevine and on distribution in plant organs depending on the cultivar. 12<sup>th</sup> International Conference on the Biogeochemistry of the Trace Elements (ICOBTE), USA, Athens, June 16-20 2013.

**Arrêté du 8 janvier 1998** fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n°97–1133 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées

**Besnard E., Chenu C., Robert M.**, 2001. Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environmental Pollution* 112, 329-337.

**Branas J.**, 1984. Histoire et fonctions du cuivre dans la viticulture de qualité.

**Bravin M.**, 2008. Processus rhizosphériques déterminant la biodisponibilité du cuivre pour leblé dur en sols à antécédent viticole

**Brun L.A., Maillet J., Richarte J., Herrmann P., Remy J.C.**, 1998. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution* 102, 151-161

**Brun L.A., Maillet J., Hinsinger P., Pépin M.**, 2001. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution* 111, 293-302

**Brun L.A., Le Corff J., Maillet J.**, 2003. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. *Environmental Pollution* 122, 361–368

**Chaignon V.**, 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides

**Chaignon V., Sanchez-Neira I., Hermann P., Jaillard B., Hinsinger P.**, 2003. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution* 123, 229-238

**Coic Y., Coppenet M.**, 1989. Les oligo-éléments en agriculture et élevage. 114p, *INRA*, p 68

**Fan J., He Z., Q. Ma L., J. Stoffella P.**, 2001. Accumulation and availability of copper in citrus grove soils as affected by fungicide application. *Journal Soils Sediments* 11, 639–648

- Gis Sol.** 2011. L'état des sols de France. *Groupement d'intérêt scientifique sur les sols*, 188 p.
- Groupe d'experts ad hoc « Vin »**, 2009. Pollution par le cuivre des sols dans les vignobles.
- Harmsen J., Rulkens W., Eijsackers H.**, 2005. Bioavailability: concept for understanding or tool for predicting ? *Land Contamination & Reclamation* 13, 161-171
- Hooda P.S., Zhang H., Davison W., Edwards A.C.**, 1999. Measuring bioavailable trace metals by diffusive gradients in thin films (DGT): soil moisture effects on its performance in soils. *European Journal of Soil Science* 50, 285-294
- Institut Français de la Vigne et du Vin**, 2009. Merlot, la découverte du chaînon manquant !
- International Union of Pure and Applied Chemistry**, 2000
- Juste C.**, 1988. Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. *Science du sol* 26/2, 103-11
- Kabata-Pendias A.**, 2001. Trace Elements in Soils and Plants. *CRC Press*
- Komárek M., Čadková E., Chrastný V., Bordas F., Bollinger J.C.**, 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* 36, 138–151
- Loué A.**, 1986. Les oligo-éléments en agriculture. 339 p. *Agri-Nathan*
- Loué A.**, 1993. Les oligo-éléments en agriculture. *Agri-Nathan*
- Michaud A.**, 2007. Interaction entre biodisponibilité, phytotoxicité du cuivre et nutrition en fer de graminées. Mécanismes physiologiques et rhizosphériques
- Mihalik J., Henner P., Frelon S., Camilleri V., Fevrier L.**, 2012. Citrate assisted phytoextraction of uranium by sunflowers: Study of fluxes in soils and plants and resulting intra-planta distribution of Fe and U. *Environmental and Experimental Botany* 77, 249–258
- Nóvoa-Muñoz J.C., Queijeiro J.M., Blanco-Ward D., Álvarez-Olleros C., Martínez-Cortizas A., García-Rodeja E.**, 2007. Total copper content and its distribution in acid vineyards soils developed from granitic rocks. *Science of the Total Environment* 378, 23–27
- Ozounidou G., Ciamporova M., Moustakas M., Karataglis S.**, 1995. Responses of maize (*Zea Mays L.*) plants to copper stress. I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots. *Environmental and Experimental Botany* 35, 167-176
- Peijnenburg W., Posthuma L., Eijsackers H., Allen H.**, 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 163-172

**Rapport Record N° 10-0671/1A**, 2012. Biodisponibilité et Bioaccessibilité des polluants dans le cas des sols pollués.

**Règlement (CE) n° 889 / 2008**

**Rieuwerts J.S., Thornton I., Farago M.E., Ashmore M.R.**, 1998. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability* 10, 61-75

**Romeu-Moreno A. and Mas A.**, 1999. Effects of Copper Exposure in Tissue Cultured *Vitis vinifera*. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2519-2522

**Toselli M., Baldi E., Marcolini G., Malaguti D., Quartieri M., Sorrenti G., Marangoni B.**, 2008. Response of potted grapevines to increasing soil copper concentration. *Australian Society of Viticulture and Oenology Inc*

**Vandenhove H., Antunes K., Wannijn J., Duquène L., Van Hees M.**, 2007. Method of diffusive gradients in thin films (DGT) compared with other soil testing methods to predict uranium phytoavailability. *Science of the Total Environment* 373, 542–555

**Wigthwick A. M., Mollah M. R., Partington D. L., Allinson G.**, 2008. Copper Fungicide Residues in Australian Vineyard Soils. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2457–2464

**William P.N., Zhang H., Davison W., Zhao S., Lu Y., Dong F., Zhang L., Pan Q.**, 2012. Evaluation of in situ DGT measurements for predicting the concentration of Cd in Chinese field-cultivated rice: impact of soil Cd:Zn ratios. *Environmental Science & Technology* 46, 8009–8016

**Yin Y., Impellitteri C., You S.J., Allen H.**, 2002. The importance of organic matter distribution and extract soil:solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. *The Science of the Total Environment* 287, 107-119

**Zhang H., Zhao F.J., Sun B., Davison W., Mc Grath S.P.**, 2001. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environmental Science & Technology* 35, 2602-2607

**Zarrouk S., Bermond A., Kolsi Benzina N., Sappin-Didier V., Denaix L.** 2013. Diffusive gradient in thin-film (DGT) models Cd and Pb uptake by plants growing on soils amended with sewage sludge and urban compost. *Environmental Chemistry Letters*

# Annexes

## Annexe 1

### Mode opératoire

#### Préparation et utilisation des systèmes DGT in situ

**Objet :** La technique de Diffusive Gradient in Thin films DGT permet de quantifier la disponibilité physico-chimique vis-à-vis des végétaux

**Hygiène et sécurité :** Port de la blouse et des gants au laboratoire  
Port des gants sur le terrain

**Principe de la méthode :** ainsi que va le faire une racine, la DGT prélève des métaux présents en solution, induisant une déplétion et une réalimentation par la phase solide. La DGT prélève non seulement les ions libres mais également des espèces labiles, tels que certains complexes métal-ligand organique. Cette méthode permet d'obtenir un flux de métaux vers la surface, intégrant ainsi les phénomènes de diffusion et de réalimentation.

**Matériel nécessaire :**

Pour la préparation des sols in situ :

- Pelle en plastique
- Peigne en plastique
- Eau ultra-pure
- Seaux
- Papier absorbant
- Gants

Pour la préparation des systèmes DGT :

- Chelex Gel Strip (0.4mm)
- Diffusive Gel (0.8mm)
- Filtre 0.45  $\mu$ m 25nm Versapor-450
- Pistons
- Anneaux de maintien
- Poches plastiques
- Emporte pièce
- Plaque en téflon
- Pincettes plastiques
- Pissettes d'eau ultra pure
- 2 boîtes de pétrie
- Ruban téflon

Pour la mise en solution des ions :

- Pince plastique
- Pissette d'eau ultra pure
- Tubes de 5 ml (autant que de système DGT)
- Pipette piston de 5 ml
- Filtre sans cendre Wattman 50
- 3 boîtes de pétrie
- Embout de pipette 1 ml
- Pissette d'eau ultra pure
- Balance
- Fiole de 100 ml
- Solution de HNO<sub>3</sub> à 15.8M



**Réactif :** HNO<sub>3</sub> à 1M

**Contraintes de la méthode :** il est impératif que le temps de contact entre le DGT et le sol soit relativement égal entre chaque répétition. Il faut donc penser à noter l'heure de pose ainsi que l'heure de dépose et convertir le temps en secondes.

**Le mode opératoire :**

Pour l'assemblage des dispositifs DGT :

Dans le labo « préparation des solutions » recouvrir la paillasse à l'aide d'un papier protecteur afin d'éviter les éventuelles contaminations.

Les chelex et diffusive gel se présentent sous la forme d'un film qu'il faut découper à l'emporte-pièce afin d'obtenir des disques de diamètre 2.5cm. Pour cela :

- Retirer le diffusive gel de son tube, le déposer bien à plat sur la plaque en téflon et réserver le tube
- Découper des disques de 2.5cm de diamètre en appuyant fortement l'emporte-pièce sur le gel. On peut faire environ 14 disques dans un film
- Récupérer, à l'aide d'une pince plastique propre, les disques et les remettre dans le tube qui contenait initialement le film
- Laver à l'eau ultra pure la plaque de téflon
- Faire de même pour le chelex

Une fois que l'on a le nombre nécessaire de diffusive gel et de chelex gel, on peut procéder à l'assemblage des dispositifs :

- Verser dans une boîte de pétrie les disques diffusive gel contenus dans l'un des tubes
- Verser dans une boîte de pétrie les disques de chelex gel contenus dans l'un des tubes
- Placer quelques filtres Versapor-450 dans une boîte de pétrie pleine d'eau ultra pure Prendre soin de retirer les disques de séparation de chaque filtre
- Prendre délicatement, à l'aide d'une pince plastique propre, un des disques de chelex et le placer sur le piston. Il faut faire attention que la chelex soit dans le bon sens, c'est-à-dire que la partie la plus « granuleuse » soit sur le dessus
- De la même manière, poser le diffusive gel sur le piston, peu importe le sens
- Placer ensuite le filtre Versapor-450 (papier filtre)
- Refermer le dispositif à l'aide de l'anneau de maintien

Pour les DGT à mettre en profondeur :

- Couper une bande de ruban téflon de 20 cm
- Placer cette bande sur la jointure entre le piston et l'anneau de maintien du DGT

Une fois les dispositifs assemblés :

- Humidifier la fenêtre avec de l'eau ultra pure et placer le DGT bien à plat dans une poche
- Recommencer l'opération pour chaque dispositif
- Noter sur les poches si les systèmes sont destinés à être posés en surface ou en profondeur
- Placer les poches au réfrigérateur

Pour la préparation des sols et la pose des dispositifs DGT :

On placera 8 dispositifs DGT par point d'échantillonnage :

- Creuser sur une profondeur de 10cm
- Éliminer les graves de la surface créée
- Ratisser le sol afin d'obtenir un substrat fin (avec les mains si sols graveleux)
- Enfoncer le système DGT dans le sol

2/3

- Noter l'heure exacte
- Recouvrir avec la terre extraite
- Noter la position du dispositif
- Attendre 48h

Pour récupérer les dispositifs DGT :

- Creuser sur une profondeur de 10cm
- Récupérer les DGT
- Noter l'heure
- Rincer les dispositifs avec de l'eau ultra pure
- Les placer dans des poches plastiques en indiquant le nom de l'échantillon
- Placer les poches dans un seau

Une fois au laboratoire, placer les DGT au réfrigérateur jusqu'à leur analyse.

Pour la préparation des tubes qui recueillent la chelex :

- Préparer des étiquettes aux noms des échantillons
- Coller ces étiquettes sur des tubes de 5 ml
- Peser ces tubes et noter la valeur
- Préparer une solution de HNO<sub>3</sub> à 1M (soit 6.33 ml de HNO<sub>3</sub> à 15.8M et compléter à 100 ml avec de l'eau ultra pure)
- Remplir les tubes avec 2 ml de cette solution
- Peser à nouveau les tubes

Pour démonter les dispositifs DGT et la mise en solution des ions :

Ramener les poches contenant les dispositifs DGT au laboratoire « préparation des solutions ». Recouvrir la paillasse de feuille de protection afin d'assurer un maximum de propreté.

- Préparer une feuille où sera noté le nom de l'échantillon et sa place
  - Ouvrir les poches se rapportant au même point d'échantillonnage et placer les DGT à l'endroit prévu sur la feuille
  - Faire de même pour tous les DGT
  - Rincer les dispositifs à l'eau ultra pure
  - Ouvrir avec précaution chaque dispositif DGT, retirer et jeter le filtre et le diffuseur gel
  - Prélever à l'aide d'une des pinces les disques de chelex
- 
- Les rincer à l'eau ultra pure puis les sécher sur du papier filtre propre
  - Les introduire dans les tubes correspondants
  - Peser les tubes pleins

Le temps nécessaire à l'échange des ions entre la chelex et l'acide est de 24h minimum à température ambiante.

- Après 24h, retirer la chelex à l'aide d'un embout de pipette 1 ml (un embout par tube)
- Jeter les chelex et les embouts de pipettes dans une poubelle réservée aux déchets spéciaux

La manip est maintenant terminée, il faut laver les dispositifs DGT. Pour cela, les introduire dans un récipient contenant de l'eau et du TFD4. Frotter chaque partie des dispositifs avec une brosse à dents. Les rincer ensuite 2 fois à l'eau permutée et 2 fois à l'eau ultra pure. Les mettre à sécher bien à plat sur du papier absorbant puis les recouvrir.

## Annexe 2

**Moyennes des concentrations de cuivre mesurées lors de l'essai DGT ex situ, in situ 1 et in situ 2, l'extraction de la solution du sol, l'extraction à l'EDTA et l'extraction à l'eau régale par parcelle**

| Parcelle | [Cu] <sub>ex situ DGT</sub><br>µg/L | [Cu] <sub>in situ 1 DGT</sub><br>µg/l | [Cu] <sub>in situ 2 DGT</sub><br>µg/l | [Cu] <sub>solution du sol</sub><br>µg/l | [Cu] <sub>EDTA</sub><br>mg/kg | [Cu] <sub>Eau Régale</sub><br>mg/kg |
|----------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------------|
| A        | 6,26 ± 1,3                          | 14,37 ± 6,1                           | 9,1 ± 6,3                             | 60,04                                   | 9,51 ± 0,11                   | 16,46 ± 1,64                        |
| B        | 54,89 ± 1,9                         | 56,42 ± 20,4                          | 5,43 ± 3,14                           | 224,89                                  | 72,80 ± 2,51                  | 122,68 ± 1,31                       |
| C        | 19,54 ± 4,9                         | 22,1 ± 9                              | 18,27 ± 14,4                          | 218,38                                  | 102,01 ± 0,33                 | 239,89 ± 5,77                       |
| D1       | 27,38 ± 7,7                         | 108,96 ± 45,4                         | 17,98 ± 4,5                           | 385,44                                  | 190,35 ± 0,46                 | 237,20 ± 20,21                      |
| D2       | 116,97 ± 12,4                       | 231,54 ± 134,9                        | 62,03 ± 48,9                          | 474,62                                  | 298,67 ± 21,76                | 383,35 ± 197,77                     |
| E        | 57,95 ± 1,5                         | 86,56 ± 54,4                          | 17,48 ± 6,6                           | 103,53                                  | 73,72 ± 0,57                  | 110,78 ± 5,7                        |
| F1       | 1,92 ± 0,4                          | 7,14 ± 0,3                            | 1,04 ± 1,2                            | 7,32                                    | 2,28 ± 0,04                   | 1,43 ± 0,77                         |
| F2       | 19,21 ± 1,1                         | 22,68 ± 7                             | 15,74 ± 12,3                          | 60,69                                   | 46,46 ± 1,5                   | 105,76 ± 2,84                       |
| G1       | 30,82 ± 0,8                         | 34,76 ± 33,5                          | 14,78 ± 10,8                          | 97,46                                   | 49,1 ± 1,41                   | 101,76 ± 5,6                        |
| G2       | 136,49 ± 29,7                       | 220,1 ± 117,2                         | 24,11 ± 11,4                          | 434,56                                  | 76,43 ± 0,53                  | 108,39 ± 7,17                       |

## **Résumé**

L'utilisation de la bouillie bordelaise comme traitement préventif contre un champignon parasite de la vigne, le mildiou, remonte à la fin des années 1800. Ce produit à base de sulfate de cuivre fait aujourd'hui l'objet de restrictions qui limitent son autorisation uniquement en agriculture biologique à certaines doses. Les fortes quantités de bouillie utilisées par le passé ont amenées à l'accumulation de cuivre dans les sols de vignobles, et notamment dans le Bordelais. Le cuivre est un élément essentiel au développement des plantes mais à forte dose, il peut amener à des problèmes de toxicité. La compréhension des systèmes de transfert sol- plante du métal est aujourd'hui une nécessité afin de mieux appréhender ces phénomènes de phytotoxicité. Une technique pertinente pour évaluer la biodisponibilité des métaux dans les sols est l'utilisation de capteurs passifs tels que la DGT (Gradient Diffusif en couches minces).

L'objectif de cette étude est de caractériser la contamination cuprique des sols de vignobles ainsi que de valider l'utilisation d'un capteur passif, le système DGT (Diffusive Gradient in Thin Films), comme outil d'évaluation de la biodisponibilité du cuivre pour la vigne. Pour cela, une campagne de mesures a été menée sur dix parcelles du domaine de l'appellation Pessac Léognan, afin d'évaluer les quantités de cuivre biodisponible sur deux périodes de l'année et donc dans des conditions environnementales différentes. Ces données ont été comparées à celles obtenues en laboratoire ainsi qu'aux concentrations mesurées dans le modèle végétal. La technique DGT a finalement été confrontée aux autres analyses de routine utilisées pour estimer les quantités de cuivre dans les sols.

## **Abstract**

Bordeaux mixture is used as preventive treatment against mildew, a parasitic fungus of vine, since the end of the 19th century. This fungicide is composed of copper sulphate. It is one of the only fungicides allowed in biological agriculture in small doses.

High quantities used at the beginning of the 20th century induced an accumulation of copper in vineyards soils, particularly in Bordeaux region. Copper is an essential metal for plants but at high dose, it can have toxic effects. Nowadays, it is important to understand transfer mechanisms between soil and plant to prevent toxicity issues.

One method to assess metal bioavailability in soil is the use of passive samplers such as DGT (Diffusive Gradients in Thin films).

The objective of this study is to define copper contamination in Bordeaux vineyards and to validate DGT device as an indicator of copper bioavailability in soils. Ten vineyard's soils have been chosen in Pessac Leognan appellation, and copper bioavailability was estimated in March and May and compared to metal concentration in vine leaves. Finally, DGT technique was compared to others measurements of copper bioavailability in soils.