



MINISTÈRE
DE L'ALIMENTATION,
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

avec la contribution financière du
compte d'affectation spéciale
«Développement agricole et rural»



N° _____

Université de Pau et des Pays de l'Adour

Ecole doctorale des Sciences Exactes et leurs Applications (ED 211)

THESE

Présentée par

Stéphane FAUCHER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

Spécialité : Chimie Analytique et Environnement

Développement de méthodes d'évaluation de la teneur en éléments trace pour la qualité sanitaire des récoltes

Soutenue publiquement le 18 décembre 2013 devant le jury composé de :

Directeurs de thèse : Cyril CUGNET - Gaëtane LESPES

RAPPORTEURS

Mehmet OTURAN Professeur (Université Paris-Est, Marne la Vallée)
Ricardo RISO Professeur (Université de Bretagne Occidentale, Brest)

EXAMINATEURS

Mireille BARBASTE Ingénieur de recherche (US1118 USRAVE, INRA, Bordeaux)
Philippe CHERY Maître de conférences (Bordeaux Science Agro, Bordeaux)
Cyril CUGNET Maître de conférences (IPREM-LCABIE, UMR 5254, Université de Pau)
Bruno GRASSL Professeur (IPREM-LCABIE, UMR 5254, Université de Pau)
Gaëtane LESPES Professeur (IPREM-LCABIE, UMR 5254, Université de Pau)

A mes grands-parents

A mes parents

A mon frère

Remerciements

Au terme de ce travail de thèse, débuté en janvier 2011 et réalisé au Laboratoire de Chimie Analytique Bio Inorganique et Environnement (IPREM-LCABIE, Université de Pau et des Pays de l'Adour (UPPA)), je voudrais remercier tout le personnel du laboratoire de m'avoir accueilli parmi eux et plus particulièrement les personnes qui ont eu la gentillesse de m'accompagner, me former et me soutenir tout au long de ces trois années de recherche.

Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie les rapporteurs, M. Mehmet OTURAN et M. Ricardo RISO d'avoir examiné mon manuscrit de thèse.

Je remercie la Région Aquitaine, le Compte d'Affectation Spéciale « Développement Agricole et Rural » (CASDAR) d'avoir accepté de financer ce travail. Je remercie également les membres du Projet Région et du RMT Quasaprove de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis d'intégrer leur projet. En particulier, Mme. Emilie DONNAT et M. Francis FLEURAT-LESSARD, coanimateurs au sein du CASDAR et RMT, et Mme. Florence FORGET et Mme. Laurence DENAIX, coanimatrices du Projet Région.

Je souhaite remercier l'équipe de l'Unité de Service et de Recherche en Analyses Végétales et Environnementales (US1118 USRAVE, INRA, Bordeaux) et plus particulièrement Mme. Mireille BARBASTE et M. Patrice SOULE pour leur aide fournie tout au long de ces trois années. Merci pour votre bienveillance, pour l'intérêt que vous avez porté sur le bon déroulement de mon travail, merci de m'avoir accueilli à plusieurs reprises et d'avoir toujours effectué les analyses des éléments trace métalliques dans les plantes dans les meilleurs délais.

Je tiens également à remercier M. Philippe CHERY (Bordeaux Science Agro, Bordeaux) de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son investissement, de m'avoir fait partager ses connaissances concernant l'étude statistique des données et de m'avoir formé sur différents outils de calculs statistiques.

De même, j'adresse un grand merci à M. André GAVANLAND (UE 0802 Domaine expérimental d'Auzeville, INRA, Auzeville-Tolosane) et à son équipe pour avoir mis leurs parcelles à disposition et pour l'investissement dont ils ont fait preuve pour que les prélèvements se déroulent dans les meilleures conditions possibles. Merci pour votre dévouement lors des différentes campagnes de prélèvement, pour votre disponibilité et votre gentillesse.

Je remercie également M. Bruno GRASSL d'avoir accepté de juger mon travail au sein de ce jury.

Je remercie tout particulièrement mes deux directeurs de thèse, Mme. Gaëtane LESPEL et M. Cyril CUGNET de m'avoir accordé leur confiance pour réaliser ce travail de thèse, de m'avoir permis d'intégrer le laboratoire, de travailler dans de bonnes conditions et de m'avoir suivi, formé, conseillé et soutenu tout au long de mon parcours.

J'adresse également mes remerciements à Mme. Isabelle LE HECHO pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de Master Recherche au LCABIE, ce stage m'ayant totalement conforté dans l'idée d'effectuer une thèse. Merci également de m'avoir dirigé vers les personnes qui, à ce moment, étaient mes futurs directeurs de thèse.

Je remercie M. Laurent AUTHIER de m'avoir fait partager son expérience et ses compétences en électrochimie, pour ses remarques et ses conseils constructifs.

Je remercie également M. Jérôme FRAYRET pour sa disponibilité et son aide sur les différents appareils d'analyse du laboratoire ainsi que M. Eric NORMANDIN pour avoir à maintes reprises réussi à déjouer les caprices de mon ordinateur.

Mes remerciements s'adressent également aux gestionnaires du laboratoire. Géraldine, Mickaël et Carole, merci pour votre disponibilité et d'avoir toujours répondu à mes demandes avec efficacité et gentillesse.

Je remercie l'Ecole Doctorale pour les différentes formations que j'ai pu suivre et plus particulièrement pour m'avoir permis d'enseigner à l'UPPA grâce au monitorat. Un merci particulier à Mme. Martine POTIN-GAUTIER et Mme. Maïté BUENO pour m'avoir initié et soutenu dans cette tâche. Je remercie les étudiants que j'ai pu encadrer de m'avoir donné envie de poursuivre dans cette voie, et plus particulièrement Julia, Xavier et Lorena qui ont participé à une partie de mes travaux dans le cadre de leur stage.

Je remercie tous les membres du laboratoire ainsi que mes collègues doctorants du bureau O120 : Stéphanie, Sébastien et Thomas. Un merci particulier à Julien, qui a rédigé sa thèse en même temps que moi, pour son soutien et ses encouragements. Je souhaite un bon courage et une bonne réussite à tous les futurs docteurs et nouveaux doctorants.

Merci à mon groupe de musique, les « Yellow Rabbits », Claire, Lili, Fabien, Jérémy, Vivien & co. pour les moments de décompression qui permettent de s'aérer l'esprit. Je nous souhaite beaucoup de concerts à venir !! Merci à mes amis qui auront toujours été présents dans les bons et mauvais moments.

Enfin, je réserve mes remerciements les plus chaleureux à ma famille qui m'a accompagné, encouragé et soutenu depuis toujours, plus particulièrement à mes parents Anne-Marie et Henri et à mon frère Laurent.

Stéphane

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
GLOSSAIRE	xiv
INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre 1: Etat de l'art	7
1.1 Introduction	9
1.2 Du sol à la plante	11
1.2.1 Le sol	11
1.2.1.1 La phase solide du sol	13
a) <i>La fraction minérale</i>	14
b) <i>La fraction organique</i>	18
1.2.1.2 La phase gazeuse du sol	18
1.2.1.3 La phase liquide du sol	19
1.2.2 Réactivité à l'interface solide - liquide	19
1.2.2.1 Bioaccessibilité, biodisponibilité et labilité	20
a) <i>Biodisponibilité</i>	20
b) <i>Bioaccessibilité</i>	21
c) <i>Labilité</i>	23
1.2.2.2 Le transfert sol - plante	24
1.2.3 La plante	26
1.2.3.1 Le blé	26
1.2.3.2 Le tournesol	28
1.2.4 Les ETM dans le système sol - plante.....	29
1.2.4.1 Essentialité et toxicité des ETM pour la plante	29
a) <i>Notion de danger et de risque</i>	29
b) <i>Les oligo-éléments</i>	30
c) <i>Toxicité des ETM retenus dans l'étude vis-à-vis de la plante</i>	31
1.2.4.2 Réglementation	33

1.3	Approches analytiques	37
1.3.1	Les protocoles d'échantillonnage à la parcelle	37
1.3.1.1	Définition	37
1.3.1.2	Les principaux types d'échantillonnage.....	42
1.3.2	Investigation de la solution de sol	45
1.3.2.1	Echantillonnage.....	45
1.3.2.2	Les méthodes de fractionnement.....	47
1.3.3	Intérêt de l'électrochimie analytique.....	49
1.3.3.1	Principe	49
1.3.3.2	Méthodes électrochimiques.....	49
1.3.3.3	Electrodes.....	50
Chapitre 2:	Matériels et méthodes	53
2.1	Site d'étude.....	55
2.1.1	Choix des parcelles.....	55
2.1.2	Equipement de prélèvement	57
2.1.3	Stratégie d'échantillonnage	58
2.1.3.1	Echantillonnage.....	58
2.1.3.2	Conditionnement.....	59
2.1.3.3	Calendrier.....	60
2.2	Préparation des échantillons.....	60
2.2.1	Séchage et broyage	61
2.2.2	Produits chimiques et matériaux de référence.....	62
2.2.2.1	Au LCABIE :	62
2.2.2.2	A l'USRAVE :	62
2.2.3	Minéralisation.....	63
2.2.3.1	Minéralisation des sols.....	63
2.2.3.2	Minéralisation des grains	64
2.3	Caractérisation physico-chimique des sols.....	65

2.4	Détermination de la concentration totale en ETM.....	66
2.4.1	Principe de fonctionnement des instruments utilisés	66
2.4.1.1	Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif : ICP-MS	66
2.4.1.2	Spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif : ICP-AES	67
2.4.2	Préparation des échantillons et procédure d'étalonnage	69
2.4.2.1	Analyse des échantillons de sol minéralisés	69
2.4.2.2	Analyse en concentration totale des échantillons des solutions de sol (lixiviats) .	69
2.4.3	Paramètres des instruments	70
2.5	Analyse de fractionnement des ETM par voltammétrie de redissolution anodique (ASV).....	72
2.5.1	Instrumentation.....	72
2.5.2	Préparation de la solution de sol	73
2.5.3	Préparation des électrodes	74
2.5.3.1	Procédé de sérigraphie	74
2.5.3.2	Electrodéposition du mercure	75
2.5.4	Procédure d'étalonnage et d'analyse.....	76
2.5.4.1	Analyse du cuivre et du plomb dans les minéralisats de sol.....	76
2.5.4.2	Analyse du cuivre et du plomb électrolabiles dans les lixiviats	78
2.6	Analyses statistiques des données.....	79
2.6.1	Traitement des valeurs inférieures aux limites de quantification.....	79
2.6.2	Statistiques descriptives des données et recherche de corrélations.....	79
2.6.3	Analyses géostatistiques.....	81

Chapitre 3: Développement d'un protocole d'échantillonnage..... 87

3.1	Introduction	89
3.2	Echantillonnage au point de prélèvement	90
3.2.1	Tournesol.....	90
3.2.2	Blé	92

3.3	Echantillonnage à la parcelle.....	96
3.3.1	Démarche préliminaire	96
3.3.2	Evaluation du protocole	100
3.3.2.1	Caractérisation statistique des jeux de concentrations.....	100
3.3.2.2	Représentativité du protocole à la parcelle	103
3.3.2.3	Résolution du protocole	108
3.3.2.4	Robustesse du protocole	110
3.4	Bilan	117
Chapitre 4: Détermination du cuivre total et électrolabile dans les sols agricoles.....		119
4.1	Introduction	121
4.2	Contexte de l'étude	121
4.2.1	Choix des électrodes.....	121
4.2.2	Choix des sols.....	122
4.3	Développement de la technique	123
4.3.1	Conditions utilisées	124
4.3.2	Effet du pH et de la conductivité du milieu analytique.....	128
4.4	Applications.....	130
4.4.1	Procédure de quantification du cuivre et du plomb dans le sol de référence ...	130
4.4.2	Recherche d'informations sur la biodisponibilité du cuivre dans des sols agricoles contaminés par le plomb.....	133
4.5	Bilan	137
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		139
BIBLIOGRAPHIE		145
ANNEXES		155
VALORISATION DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES.....		173

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1 : Etat de l'art

Figure 1.1: Tableau périodique des éléments présentant la classification des métaux, métalloïdes et non métaux	9
Figure 1.2 : Organisation interne du sol et échanges avec l'écosphère (lithosphère, hydrosphère et atmosphère) et la biosphère	11
Figure 1.3 : Composition moyenne d'un sol (pourcentages volumiques)	12
Figure 1.4 : Structure et composition de principaux types d'argile	15
Figure 1.5 : Triangle des textures minérales (USDA)	17
Figure 1.6 : Illustration de la bioaccessibilité et la biodisponibilité des composés dans le sol	22
Figure 1.7 : Transport des ETM vers la racine, par diffusion et par flux de masse	25
Figure 1.8 : Les différents stades de développement du blé	27
Figure 1.9 : Les différents stades de développement du tournesol	28
Figure 1.10 : Courbe de croissance des végétaux selon la quantité d'oligoélément ingérée	30
Figure 1.11 : Découpage de la parcelle en vue d'un échantillonnage de sol et/ou de plantes	37
Figure 1.12 : Les différents plans d'échantillonnage : a) Ciblé ; b) aléatoire simple ; c) Systématique ; d) aléatoire stratifié	42
Figure 1.13 : Domaines d'électroactivité de différents matériaux d'électrode en milieu aqueux	51

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Figure 2.1 : Localisation du site et des parcelles d'étude situés à Auzeville-Tolosane, France	56
Figure 2.2 : Placette de prélèvement systématique issue du RMQS	58
Figure 2.3 : Photographie des types de broyeurs utilisés (a) MM200 pour les sols (b) M20 pour les grains ...	61
Figure 2.4 : Schéma type d'un ICP-MS	67
Figure 2.5 : Schéma type d'un ICP-AES	68
Figure 2.6 : Cellule électrochimique utilisée pour les analyses	72
Figure 2.7 : Principe de la sérigraphie	74
Figure 2.8 : Paire d'électrodes préparées par sérigraphie	75
Figure 2.9 : Etapes d'une mesure de la concentration en ETM par ASV	77
Figure 2.10 : Représentation schématique de cercles de corrélations types	81
Figure 2.11 : Exemple de variogramme type	83

Chapitre 3 : Développement d'un protocole d'échantillonnage

Figure 3.1 : Positionnement des grains de tournesol échantillonnés	90
Figure 3.2 : Concentrations en ETM dans les grains de tournesol en fonction de la zone de prélèvement dans le capitule	91
Figure 3.3 : Concentrations en ETM dans les grains de tournesol en fonction du nombre de : ligne 1) grains prélevés et ligne 2) capitules considérés	92
Figure 3.4 : Comparaison des concentrations moyennes en ETM selon le nombre d'épis de blé considérés par point de prélèvement a) Parcelle C6 - campagne de prélèvement 2011 b) Parcelle CL - campagne de prélèvement 2012	93
Figure 3.5 : Comparaison des concentrations moyennes obtenues à partir de 2 et 20 plantes prélevées en un même point, pour 25 points de prélèvement sur une même parcelle (CL - campagne de prélèvement 2012)	94
Figure 3.6: Etablissement au champ du PEAS	98
Figure 3.7 : Application du PEAS a) à la parcelle C6 b) à la parcelle CL	99
Figure 3.8 : Analyse en composantes principales des concentrations en ETM dans le sol et dans les grains : a) cercle des corrélations et par b) histogrammes de corrélation	102
Figure 3.9 : Variogrammes typiques des concentrations dans les grains obtenus pour a) le cadmium, b) le cuivre et c) le zinc	105
Figure 3.10 : Cartographie des distributions spatiales des ETM dans les grains de blé, a) Cadmium b) Zinc	106
Figure 3.11 : Comparaison de la moyenne des concentrations en ETM dans les grains obtenue par le PEAS avec les concentrations en ETM dans les échantillons composites de grains pour a) le tournesol sur la parcelle C6 et b) le blé sur la parcelle CL	113
Figure 3.12 : Distribution spatiale du cuivre dans les grains de blé de la parcelle CL	115

Chapitre 4 : Détermination du cuivre total et électrolabile dans les sols naturels

Figure 4.1 : Voltammogramme obtenu par SWASV pour une concentration en cuivre de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ dans du tampon acétate 0,2 mol L^{-1} . Paramètres: Electrodeposition : -0,8 V pendant 60 s, temps d'équilibration 30 s, fréquence 25 Hz, pas de 8 mV, amplitude du potentiel 25 mV	121
Figure 4.2 : Détermination du cuivre en utilisant la même solution et la même électrode. Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1	124
Figure 4.3 : Détermination du cuivre en utilisant la même solution et une électrode différente. Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1	125
Figure 4.4 : Détermination du cuivre en utilisant une solution différente et la même électrode. Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1	126
Figure 4.5 : Détermination du cuivre en utilisant une solution et une électrode différentes. Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1	127
Figure 4.6 : Evolution de la surface du pic de cuivre par SPE-SWASV selon la variation du pH entre 0 et 4,5. Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1	128
Figure 4.7 : Evolution du signal du cuivre obtenu par SPE-SWASV (\diamond) en fonction de la concentration en nitrate de potassium dans la solution [KNO_3] (mêmes paramètres que pour la figure 4.1) et comparaison entre le cuivre sous forme libre (Cu^{2+} , Δ) et le cuivre électrolabile ($(\text{Cu}^{2+} + \text{CuNO}_3^+)$, $+$) prédit par le logiciel Visual Minteq	129
Figure 4.8 : Droites d'étalonnage du cuivre dans une gamme de 0 à 63 $\mu\text{g L}^{-1}$ dans le tampon acétate (Δ) et dans la MB (\diamond) par SPE-SWASV. Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1	131
Figure 4.9 : Voltammogrammes obtenus pour l'étalonnage du cuivre et du plomb par ajouts dosés (a) Solution de blanc minéralisé et dilué 15 fois (MB); (b) Solution de sol minéralisé et dilué 15 fois (MS); (c) Idem que (b) + Addition de 10 $\mu\text{g}(\text{Cu}) \text{L}^{-1}$ et de 30 $\mu\text{g}(\text{Pb}) \text{L}^{-1}$; (d) Idem que (b) + Addition de 20 $\mu\text{g}(\text{Cu}) \text{L}^{-1}$ et de 60 $\mu\text{g}(\text{Pb}) \text{L}^{-1}$. Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1. Les signaux ont été corrigés du blanc	133

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1 : Etat de l'art

Tableau 1.1 : Principaux constituants du sol	13
Tableau 1.2 : Classement granulométrique des particules minérales	16
Tableau 1.3 : Gammes de valeurs ordinaires et d'anomalies naturelles des ETM dans les sols (exprimées en mg(métal) kg ⁻¹ (sol))	31
Tableau 1.4 : ETM indispensables aux organismes biologiques et toxicité	32
Tableau 1.5 : Valeurs moyennes de concentrations en ETM (mg kg ⁻¹) mesurées dans les sols et les plantes	33
Tableau 1.6 : Valeurs seuils de concentrations en ETM dans les sols agricoles, le blé et le tournesol	35
Tableau 1.7 : Comparaison de protocoles d'échantillonnage utilisés par des instituts français	39
Tableau 1.8 : Séparation des fractions particulaire, colloïdale, dissoute	46
Tableau 1.9 : Comparaison des méthodes de fractionnement les plus courantes	48

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Tableau 2.1 : Cultures semées sur les parcelles d'étude	57
Tableau 2.2 : Calendrier des campagnes de prélèvements sur les parcelles C6 et CL	60
Tableau 2.3 : Paramètres ICP-MS sélectionnés pour les analyses	70
Tableau 2.4 : Performances des méthodes analytiques ICP (µg L ⁻¹)	71
Tableau 2.5 : Conditions expérimentales de lixiviation de sol	73
Tableau 2.6 : Type de modèles de variogramme courant	84

Chapitre 3 : Développement d'un protocole d'échantillonnage

Tableau 3.1 : Concentrations en ETM dans le sol et dans les grains en mg kg^{-1} de matière sèche et type de distribution	101
Tableau 3.2 : Comparaison de la moyenne des concentrations en ETM dans les grains (mg kg^{-1}) avec les concentrations en ETM dans les échantillons composites de grains	104
Tableau 3.3 : Comparaison des caractéristiques des variogrammes obtenus après ajout de la grille systématique	109
Tableau 3.4 : Evaluation de l'ergodicité théorique du PEAS en effectuant des nouveaux tirages de points de prélèvement PEAS	111
Tableau 3.5 : Analyses descriptives des données	112

Chapitre 4 : Détermination du cuivre total et électrolabile dans les sols naturels

Tableau 4.1 : Caractéristiques physico-chimiques des sols agricoles étudiés	123
Tableau 4.2 : Quantités de cuivre total et de plomb total contenues dans le sol de référence (loam soil ERM-CC141) en $\text{mg(ETM) kg}^{-1}(\text{sol})$ calculées selon différents mode d'étalonnage	132
Tableau 4.3 : Concentrations en cuivre et plomb totaux et électrolabiles dans différents sols agricoles	135
Tableau 4.4 : Comparaison des concentrations en cuivre et plomb labiles déterminées par DGT et SPE-SWASV	136

GLOSSAIRE

Composés chimiques :

Ag : Argent élémentaire

AgCl : Chlorure d'argent

Al : Aluminium élémentaire

Al³⁺ : Aluminium III (ion aluminium)

As : Arsenic élémentaire

Au : Or élémentaire

Bi : Bismuth élémentaire

C : Carbone élémentaire

Cd : Cadmium élémentaire

Ce : Cérium

CH₄ : Méthane

Cl : Chlore élémentaire

CO₃²⁻ : Ion carbonate

COC : Carbone organique colloïdal

COD : Carbone organique dissous

Cu : Cuivre élémentaire

Cu²⁺ : Ion cuivre (libre)

CuNO₃⁺ : Nitrate de cuivre

e⁻ : Electron

ETM : Eléments Trace Métalliques et métalloïdes

Fe : Fer élémentaire

H₂ : Dihydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HF : Acide fluorhydrique

Hg : Mercure élémentaire

HNO₃ : Acide nitrique

In : Indium élémentaire

KCl : Chlorure de potassium

KNO₃ : Nitrate de potassium

L : Ligand (complexation)

Li : Lithium élémentaire

M : Métal

ML : Complexe (métal-ligand(s))

M^{n+} : Cation libre

Mg : Magnésium élémentaire

N: Azote élémentaire

NH_3 : Ammoniac

NO : Monoxyde d'azote

NO_2 : Dioxyde d'azote

OH^- : Ion hydroxyde

P : Phosphore élémentaire

PFA : Perfluoroalkoxy

PO_4^{3-} : Phosphate

Pb : Plomb élémentaire

Si : Silicium

Si^{4+} : Ion silicium IV

Tl : Thallium

Y : Yttrium

Zn : Zinc élémentaire

Grandeurs :

$^{\circ}C$: Degré Celsius

A : Ampère

C : Coulomb

CEC : Capacité d'Echange Cationique

E : Potentiel

FT : Facteur de transfert

Hz : Hertz

IQR : Etendue inter quartile (Inter-Quartile Range)

K_d : Constante de stabilité d'un complexe

k_d : Constante cinétique de dissociation d'un complexe

k_f : Constante cinétique de formation d'un complexe

L/S : Rapport de lixiviation Liquide/Solide

MB : Solution de blanc minéralisé (Mineralization Blank)

MS : Solution de sol minéralisé (Mineralized Solution) OU Masse Sèche *selon le contexte*

ppma : Parties Par Million d'Atomes

rpm : Tour(s) par minute (Revolutions Per Minute)

Q1 : Premier quartile

Q2 : Deuxième quartile ou médiane

Q3 : Troisième quartile

RSD : Coefficient de variation (Relative Standard Deviation)

UV : Ultra-Violet

V : Volt

Techniques et méthodes analytiques :

ACP : Analyse en Composantes Principales

ANOVA : Analyse de variance (ANalysis Of Variance)

DGT : Gradient de diffusion en film mince (Diffusive Gradient in Thin film)

ICP-AES : Spectrométrie d'émission atomique à plasma induit (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry)

ICP-MS : Spectrométrie de masse à plasma induit (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

PEAS : Protocole d'Echantillonnage Aléatoire Stratifié

SKCS : Single Kernel Characterisation System

SPE : Electrodes ségrigraphiées (Screen-Printed electrodes)

STEP : Station d'Épuration

SWASV : Voltammétrie de redissolution anodique pulsée à vagues carrées (Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry)

Organismes :

ARENBI : Analyse des Risques Environnementaux et Bio-Indicateurs

CASDAR : Compte d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural

CETIOM : Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains

EC : Commission européenne (European Community)

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

LCABIE : Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

Quasaprove : QUALité SANitaire des PROductions VEgétales de grande culture

RMQS : Réseau de Mesure de la Qualité des Sols

RMT : Réseau Mixte Technologique

UE : Unité Expérimentale

UPPA : Université de Pau et des Pays de l'Adour

USDA : U.S. Department of Agriculture

USRAVE : Unité de Service et de Recherche en Analyses Végétales et Environnementales

INTRODUCTION GENERALE

La France est située au premier rang de l'Union Européenne et au 5^{ème} rang mondial pour sa production de blé et de tournesol. La culture de ces deux végétaux dans le grand Sud Ouest, (Aquitaine, Midi-Pyrénées, Languedoc Roussillon) représente respectivement 8 % et 25 % de la production française. Ce secteur d'activité agricole occupe donc à l'échelle européenne, nationale et régionale une place prépondérante non seulement en termes socio-économique, mais également vis à vis de la nutrition et de la santé. Plus particulièrement, la qualité sanitaire des récoltes représente une des préoccupations permanentes des consommateurs et des pouvoirs publics. Elle est définie comme l'innocuité (c'est-à-dire l'absence de danger) des récoltes pour la santé du consommateur. Des réglementations européennes et françaises limitent les teneurs en espèces chimiques, dont celles en éléments trace, dans l'alimentation animale (32/2002 CE) et humaine (1881/2006 CE). A l'origine, les éléments trace proviennent de la roche mère formant le sol. Les activités anthropiques peuvent contribuer à augmenter leurs concentrations dans les écosystèmes et plus particulièrement dans les sols agricoles par l'application d'intrants tels que les produits phytosanitaires, les engrais inorganiques et organiques mais également dans certaines situations les dépôts atmosphériques ou les contaminations accidentelles. Etant donné qu'ils ne peuvent être ni dégradés ni détruits, les éléments trace tendent à s'accumuler partiellement dans les sols, à y migrer et à se transférer dans les eaux et dans les organismes vivants dont les plantes. Ainsi, ils sont en perpétuel mouvement entre tous les compartiments environnementaux. Dans ce contexte, leurs concentrations doivent donc être contrôlées. Des outils fiables sont nécessaires afin d'évaluer d'éventuelles anomalies de concentration et d'anticiper tout risque lié à la consommation de végétaux contaminés.

Il existe différentes façons d'appréhender la qualité sanitaire. La première est liée à l'obligation des organismes en charge des productions agricoles de garantir la valeur de leur produit dans le respect des réglementations. Pour ce faire un diagnostic sur les végétaux cultivés est réalisé. La deuxième fait appel à des outils d'évaluation plus précoces d'une contamination potentielle. Dans ce travail, ces deux volets ont été considérés.

En ce qui concerne le diagnostic, les concentrations en éléments trace sont généralement déterminées dans la plante à l'échelle de la parcelle. La chaîne analytique alors mise en œuvre se doit d'être maîtrisée, de la phase d'échantillonnage jusqu'au rendu du résultat. La première étape de cette chaîne concerne le prélèvement des végétaux à analyser. Ce prélèvement peut être effectué avant ou lors de la récolte, la collecte pré-récolte présentant l'avantage de pouvoir établir un diagnostic précoce. Par la suite, la réduction de l'échantillon (à la parcelle) et de la prise d'essai (au laboratoire) constitue une nouvelle étape importante vis à vis de la représentativité de l'échantillon, ces processus d'échantillonnages successifs devant garantir la justesse et la reproductibilité des concentrations déterminées à l'échelle de la parcelle. Or, bien que l'échantillonnage des végétaux soit déterminant, aucun référentiel n'existe en la matière. Nous nous sommes donc intéressés à ce point, avec pour objectif final de définir des protocoles qui *in fine* serviraient de base à un guide d'échantillonnage proposé aux professionnels en charge de la production de grandes cultures, typiquement blé et tournesol. Une attention particulière a donc été donnée à l'aspect opérationnel des protocoles, déclinés à deux échelles : la réduction de l'échantillon à la parcelle (nombre de plantes à prélever) et de la prise d'essai au laboratoire (masse d'échantillon à analyser).

En ce qui concerne la détection précoce d'un danger lié au transfert de contaminants du sol vers la plante, les approches proposées se réfèrent le plus souvent à la détermination des concentrations en ces contaminants dans les sols de parcelles susceptibles d'accueillir un type particulier de culture. Il est aujourd'hui reconnu que l'évaluation de la concentration totale des éléments trace dans un échantillon de sol n'est pas suffisante pour prédire les risques écotoxicologiques. Toutefois, elle est un prérequis nécessaire pour définir une stratégie d'analyse pertinente permettant d'évaluer ces risques au regard des espèces chimiques ciblées et du potentiel qui existe à être prélevées par les plantes. C'est pourquoi nous avons choisi d'exploiter les potentialités des méthodes d'analyse électrochimiques vis à vis de leur capacité à déterminer les concentrations électrolabiles en éléments trace dans les solutions de sol. L'objectif ici est de disposer d'une méthode simple, peu onéreuse et potentiellement utilisable sur le terrain afin d'estimer de façon rapide la fraction susceptible d'être biodisponible pour les organismes dont les plantes.

Ce manuscrit de thèse est constitué de quatre chapitres. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique posant le contexte de l'étude, la problématique environnementale de la présence en éléments trace dans les sols agricoles et de leurs conséquences sur les cultures. Il présente également les principales notions et décrit les techniques d'analyse des concentrations totale et de la distribution physico-chimique des éléments trace.

Le deuxième chapitre recense les matériels et les méthodes utilisés pour déterminer les concentrations totales et celles des formes électrolabiles des éléments trace étudiés.

Le troisième chapitre présente le développement des protocoles d'échantillonnage. Les résultats des différentes campagnes de prélèvement, les analyses statistiques appliquées sur les données obtenues pour les sols et les plantes et les opérations d'optimisation sont explicités.

Le quatrième chapitre présente le développement et la validation de la méthode électrochimique permettant la détermination des concentrations des éléments trace électrolabiles associés à la part biodisponible et l'application de cette méthode à des échantillons de solutions de sol.

Enfin, une conclusion générale synthétise les résultats obtenus pour l'ensemble des études réalisées et présente les perspectives à ce travail.

Certains des résultats présentés sont issus d'articles, publiés ou soumis à publication dans des journaux scientifiques internationaux dans le cadre de cette thèse. Les articles ont alors été traduits et intégrés dans ce manuscrit.

Chapitre 1: Etat de l'art

1.1 Introduction

L'appréhension de la qualité sanitaire des végétaux cultivés repose tout d'abord sur la connaissance des systèmes sol-plante. C'est pourquoi la première partie de ce chapitre y sera consacrée, avec un intérêt pour les éléments trace, métaux et métalloïdes, puisqu'ils s'avèrent être nos principaux objets d'étude. L'évaluation du transfert des éléments trace des sols agricoles vers les plantes met en œuvre des outils allant de l'échantillonnage à l'analyse. Dans la seconde partie de ce chapitre nous avons donc choisi de nous intéresser particulièrement à ses deux étapes de la chaîne analytique.

Un élément à l'état de trace, ou élément trace (ET) est défini comme un élément présent dans une matrice avec une concentration totale inférieure à 100 parties par million d'atomes (100 ppma) ou 100 mg (métal) kg^{-1} (matrice) [1]. Parmi les éléments trace, les métaux et métalloïdes (ETM) occupent une place particulière du fait de leur ubiquité et de leur persistance dans les différents compartiments environnementaux [2,3].

Dans le tableau périodique (figure 1.1), les éléments sont considérés comme « de plus en plus métalliques » lorsque l'on se déplace vers le coin inférieur gauche du tableau périodique alors que les non-métaux sont localisés dans la partie supérieure droite du tableau périodique.

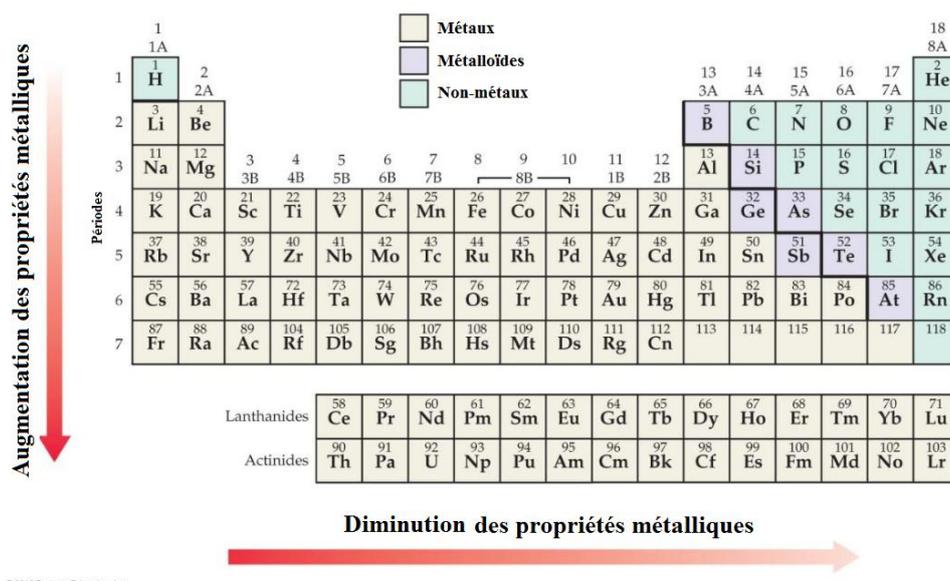


Figure 1.1: Tableau périodique des éléments présentant la classification des métaux, métalloïdes et non métaux [4]

Les métaux sont distingués des non-métaux par :

- leurs propriétés physiques et plus particulièrement la capacité de l'élément à conduire la chaleur et l'électricité, leur éclat métallique, leur malléabilité et ductilité ;
- leurs propriétés chimiques et plus particulièrement leur facilité à réagir avec les acides, à céder des électrons pour former des cations et des oxydes ayant des propriétés basiques en solution [5].

Les métalloïdes (ou semi-métaux) sont des éléments ayant des propriétés intermédiaires entre les métaux et les non-métaux. Généralement, ils ont l'apparence et les propriétés physiques des métaux mais se comportent chimiquement comme des non-métaux. Sur le tableau périodique, ils séparent les métaux des non-métaux selon une diagonale [5].

Les métaux et métalloïdes sont couramment considérés selon leur essentialité et/ou leur toxicité, notions issues des études biochimiques et environnementales qui seront plus développées ci-après (paragraphe 1.2.4.1). Parmi les diverses appellations, la notion de métaux lourds se réfèrent dans de nombreux textes aux métaux toxiques pour l'Homme et accumulés dans son organisme. D'autres textes les définissent comme des métaux ayant une densité supérieure à 3,5 à 7 g cm⁻³ selon les auteurs, ou encore ayant un numéro atomique élevé, en général supérieur à celui du sodium ($Z = 11$) [5–8]. Il n'y a alors aucun lien entre la densité du métal et sa toxicité. De même, il n'existe aucune définition référencée permettant de classer les éléments chimiques dans la famille des métalloïdes. La délimitation de ces éléments dépend des auteurs. Certains englobent même les métalloïdes dans la famille des métaux [9].

Ces quelques exemples permettent de mettre en évidence le paradoxe suivant : malgré l'intérêt constant et toujours important qu'ils suscitent, les métaux et métalloïdes à l'état de trace demeurent mal définis, voire mal qualifiés. Aussi, pour une meilleure lisibilité de ce manuscrit, seul le terme d'ETM sera employé et désignera l'ensemble des éléments trace, métaux et métalloïdes.

1.2 Du sol à la plante

1.2.1 Le sol

Le sol est à la fois le produit et le support du développement de la végétation. Il a une épaisseur allant de quelques centimètres jusqu'à plusieurs mètres. Il représente la couche superficielle de l'écorce terrestre, formée par l'altération de la roche-mère sous-jacente sous l'action des êtres vivants, de processus biologiques, physiques et chimiques. Il est l'interface entre l'atmosphère (couche gazeuse entourant la Terre), l'hydrosphère (zones de présence d'eau) et la lithosphère (croûte terrestre et partie supérieure du manteau supérieur) (figure 1.2). Il intervient comme système source, système transformateur et système de transfert des éléments trace [10].

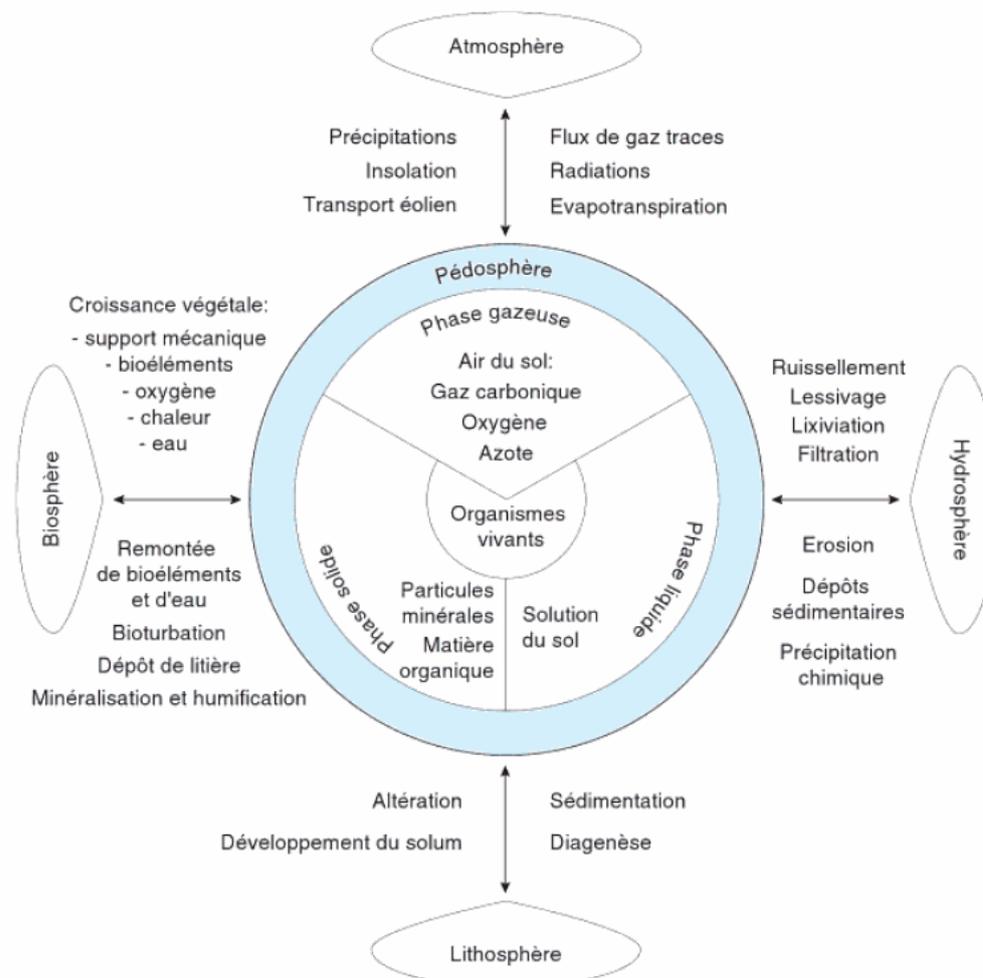


Figure 1.2 : Organisation interne du sol et échanges avec l'écosphère (lithosphère, hydrosphère et atmosphère) et la biosphère [10]

L'observation d'une coupe de sol par la réalisation d'une fosse permet de révéler la non homogénéité du sol. En effet, différentes couches y sont observées, parallèles à la surface et de différentes épaisseurs. Chaque couche est appelée horizon en raison de son organisation plus ou moins horizontale de ses limites supérieures et inférieures. L'ensemble des horizons caractéristiques d'un sol donné est nommé profil [11].

Un sol est un milieu poreux, dont la phase solide est constituée de minéraux et de composés organiques formant des assemblages plus ou moins volumineux et donnant au sol sa structure. Cette phase solide n'est pas continue et délimite un espace poral de géométrie complexe et de dimensions variées. Cette caractéristique explique la présence de phases fluides, liquide et gazeuse, susceptibles de se déplacer et de donner lieu à des flux de matière (figure 1.3). Elle explique également la présence d'organismes vivants végétaux et animaux qui y trouvent un espace pour croître et se développer. La coexistence de plusieurs phases est à l'origine d'interfaces dont les propriétés physico-chimiques déterminent en grande partie le fonctionnement des sols et leur évolution [12].

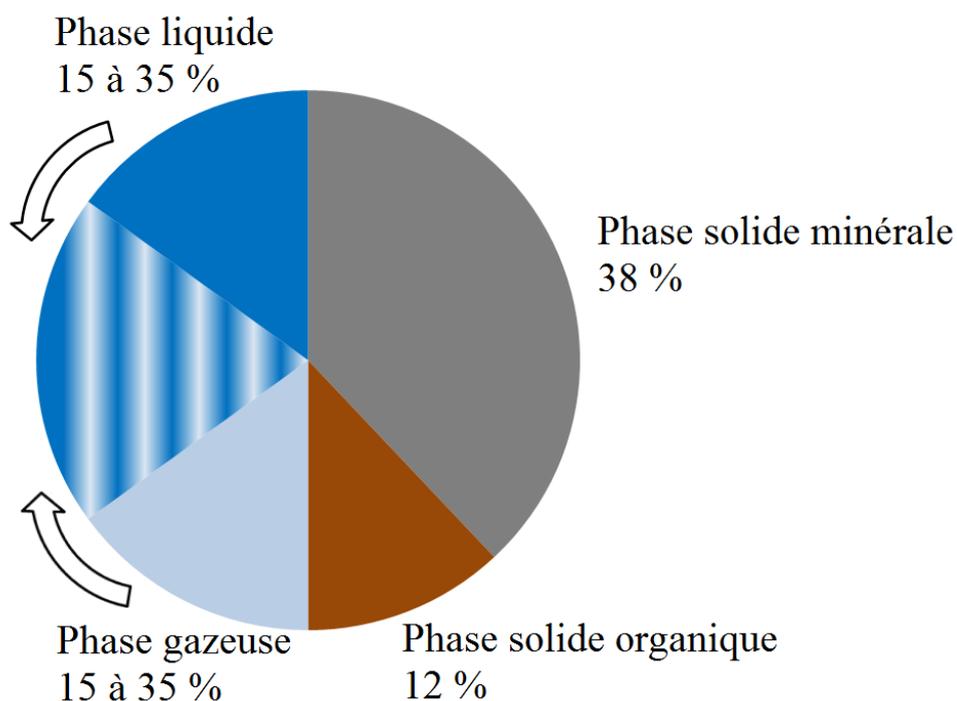


Figure 1.3 : Composition moyenne d'un sol (pourcentages volumiques), d'après [13]

1.2.1.1 La phase solide du sol

La phase solide du sol occupe 40 à 70 % du volume total du sol, la partie restante constituant les phases fluides. La phase solide est constituée d'une fraction minérale et d'une fraction organique en proportions variables. En général, cette phase est majoritairement minérale et constitue environ 90 à 99 % de la masse globale du sol selon le type de sol. Le taux de matière organique des sols cultivés représente en moyenne 1 à 20 % de la masse du sol. La composition de cette phase dépend de la nature de la roche-mère et des conditions de formation du sol [14]. La réactivité de ses constituants au regard des ETM est variable en fonction de leur nature mais également de leur taille (tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Principaux constituants du sol [15]

CONSTITUANTS MINERAUX	Minéraux argileux (phyllosilicates)	- Kaolinites - Illites - Vermiculites - Smectites - Montmorillonites - Chlorites - Interstratifiés
	Oxyhydroxydes	Fe : Hématite, Goethite Al : Gibbsite Mn : Birnessite Ti : Rutile
	Carbonates	Calcite, aragonite Dolomite
MATIERE ORGANIQUE	Organismes vivants et humus	- Acides humiques / fulviques - Humines - Arthropodes - Bactéries - Champignons

a) La fraction minérale

La fraction minérale du sol résulte de la transformation de la roche-mère. Deux grands groupes de minéraux sont identifiés :

- Les minéraux primaires sont hérités de la roche-mère sous jacente par des processus de désagrégation mécanique tels que les conditions climatiques. Ils sont peu réactifs vis à vis des éléments chimiques tels que les métaux [14]. Bien que relativement résistants aux phénomènes d'altération chimique selon leur taille et leur structure, ils peuvent toutefois être transformés en minéraux dits secondaires [16].
- Les minéraux secondaires sont des minéraux résultant de l'altération biogéochimique et/ou de la désagrégation des minéraux primaires. Ces deux processus interviennent dans la pédogénèse qui est le processus de formation du sol à partir de la roche mère. La désagrégation est provoquée par les agents climatiques tels que le vent, le gel et l'eau [17]. Elle entraîne un fractionnement successif de la roche tout en conservant sa composition minéralogique. L'altération biogéochimique des roches est provoquée par l'eau associée ou non à l'oxygène, le dioxyde de carbone ou les acides organiques. Elle provoque une réorganisation des minéraux et peut conduire à la modification de la minéralogie. Les minéraux secondaires sont de faibles tailles et sont réactifs vis-à-vis des éléments chimiques tels que les métaux [10].

La fraction grossière du sol, de la taille des sables et limons, est héritée des minéraux de roches les moins altérables à température et pression ordinaires. Ils peuvent jouer un rôle sur la structure, la perméabilité du sol et fournir une réserve d'éléments réactifs dans le sol [18].

Les constituants minéraux les plus réactifs vis-à-vis des métaux sont les espèces argileuses, les oxydes-hydroxydes de fer, aluminium et manganèse, les carbonates et les phosphates.

- Les argiles ont une structure formée d'une superposition de feuillets (phyllosilicate) de structure alternée tétraédrique ($\text{Si}_2\text{O}_5^{2-}$) et octaédrique ($\text{Al}_2\text{OH}_4^{2+}$) (figure 1.4). La petite taille des argiles leur confère des propriétés colloïdales et la forme en feuillets font qu'ils développent une forte surface spécifique. Des substitutions isomorphes, c'est-à-dire la substitution d'un élément par un élément de valence inférieure (Si^{4+} par Al^{3+} ou Al^{3+} par Fe^{2+} ou Mg^{2+}), se produisent à l'intérieur de ces polyèdres et conduisent à une charge de surface globalement négative [19]. A cette charge permanente s'ajoute une charge variable de surface due à la présence de groupement hydroxyles de type silanols ($-\text{SiOH}$) et aluminol ($-\text{AlOH}$). Ces groupements sont amphotères (dépendant du pH) et sont capables de réagir de manière spécifique avec les ETM avec pour conséquence, la libération de protons H^+ conduisant à une acidification du sol [20].

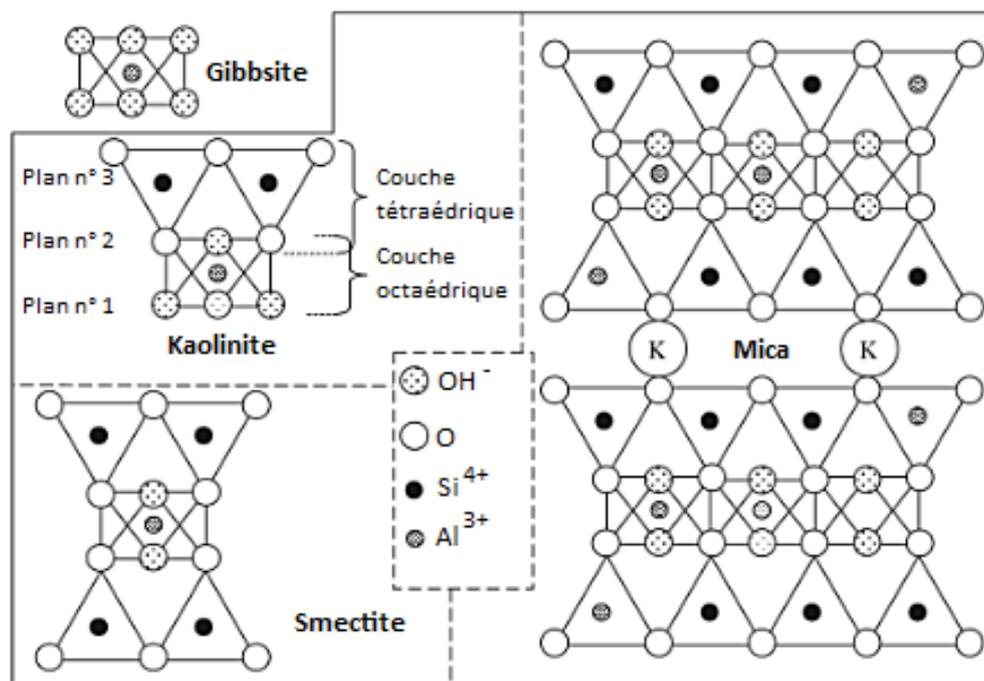


Figure 1.4 : Structure et composition de principaux types d'argile [11]

- Les oxyhydroxydes sont des composés amphotères formés d'éléments métalliques tels que le fer, l'aluminium et le manganèse, des atomes d'oxygènes et groupes hydroxyles OH. Ils constituent avec les argiles une fraction importante du complexe d'altération (ensemble des minéraux secondaires issus de minéraux primaires) [21]. La charge, uniquement due aux groupements hydroxyles de surface, est déterminée par les paramètres intrinsèques de la solution de sol [15]. Pour des pH acides, les groupements OH se protonent pour donner $-\text{OH}^{2+}$ attirant ainsi les anions. Pour des pH basiques, les groupements OH se déprotonent en $-\text{O}^-$ attirant ainsi les cations dont les ETM. La forte affinité des oxydes de fer pour les éléments traces est telle que certains auteurs envisagent de les utiliser pour réduire la biodisponibilité des métaux lourds dans les sols pollués [22].
- Les molécules carbonatés et les phosphatés, lorsqu'elles sont hydratés, conduisent à la formation de groupements tels que $-\text{CaOH}$ et $-\text{POH}$. Les ions carbonates (CO_3^{2-}) et phosphates (PO_4^{3-}) ainsi dissociés entraîne l'adsorption des ETM à leur surface. Les carbonates et phosphates sont le siège de processus d'adsorption et coprécipitation des ETM entraînant leur rétention dans les sols [23,24].

La composition des particules minérales de diamètre apparent inférieur à 0,2 cm permet de définir la texture du sol. Généralement, les différents types de particules sont classés selon un critère de taille (granulométrie). Cinq types de particules sont distingués (tableau 1.2), la fraction de particules de diamètre apparent supérieure à 0,2 cm étant constituée de graviers (0,2 à 2,0 cm), de cailloux (2,0 à 7,5 cm), de pierres (7,5 à 25 cm) et de blocs (> 25 cm) [25].

Tableau 1.2 : Classement granulométrique des particules minérales [26]

Diamètre (μm)	Type
200 - 2000	Sables grossiers
50 - 200	Sables fins
20 - 50	Limons grossiers
2 - 20	Limons fins
< 2	Argiles

La texture minérale du sol permet de renseigner la porosité et le régime hydrique du sol. C'est une caractéristique stable, ne variant qu'en fonction de l'évolution à long terme du sol. La texture minérale du sol est déterminée par projection des données dans le triangle des textures (figure 1.5) [27]. Chaque échantillon y est situé en fonction de sa teneur pondérale en sables (sables grossiers + sables fins), limons (limons grossiers + limons fins) et argiles, la somme des trois étant ramenée à 100 %.

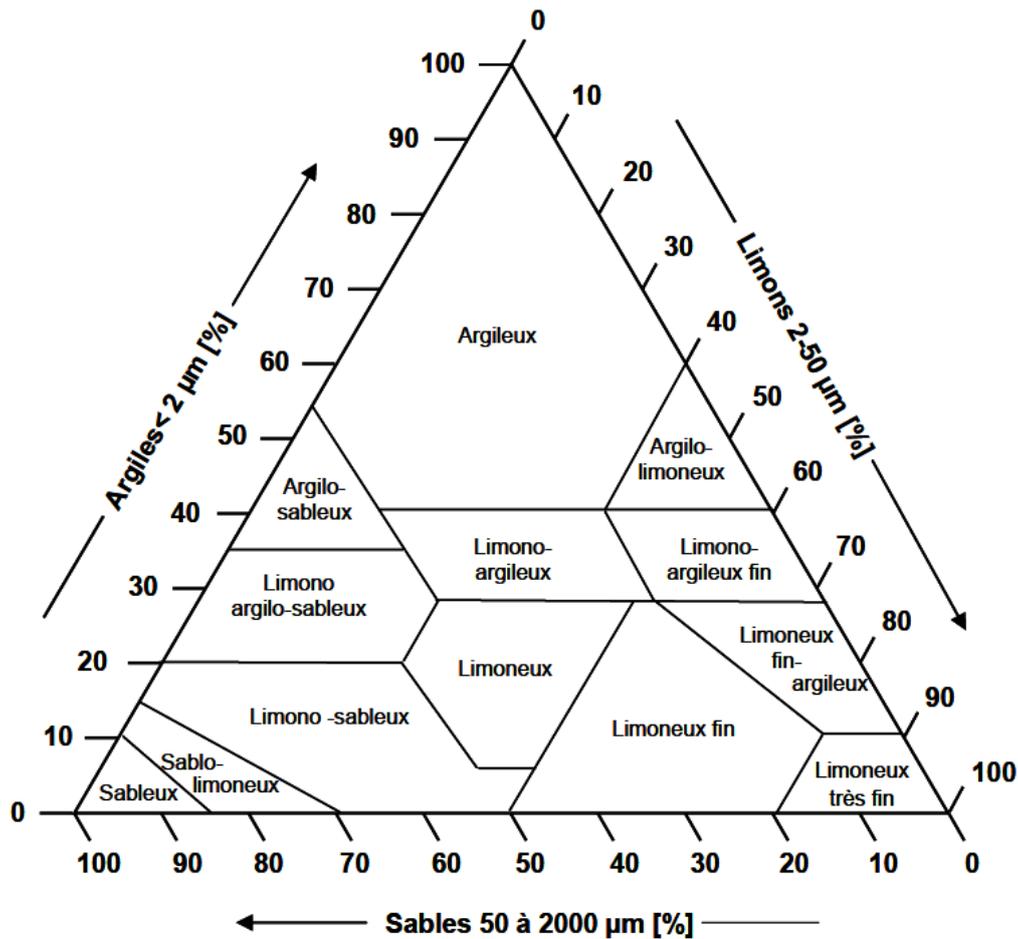


Figure 1.5 : Triangle des textures minérales (USDA¹) [27]

¹ USDA United States Department of Agriculture

b) La fraction organique

La fraction organique correspond à des composés carbonés et azotés issus de l'activité biologique des êtres vivants animaux et végétaux et à leurs produits de décomposition. La fraction organique contient majoritairement [28] :

- La matière organique morte, qui correspond aux débris, déchets et sécrétions des végétaux et animaux à différents stades de décomposition. Elle représente une source d'énergie potentielle pour les espèces qui la consomment ;
- La matière organique vivante, incluant la faune et la flore (racines) du sol, les bactéries et champignons. Les bactéries et champignons sont les principaux responsables de la décomposition et de la minéralisation de la matière organique.

1.2.1.2 La phase gazeuse du sol

La phase gazeuse du sol est également nommée l'atmosphère du sol car sa composition est souvent voisine de celle de l'air (soit majoritairement 78 à 80 % d'azote, 18 à 20 % d'oxygène et 0,2 à 3 % de dioxyde de carbone). Cela dit, sa composition peut être très variable dans l'espace en fonction de la profondeur du sol et de l'activité biologique avoisinante [28]. La quantité non négligeable de dioxyde de carbone est majoritairement expliquée par la respiration des organismes vivants contenus dans les sols et les processus de minéralisation de la matière organique dont ils sont responsables. D'autres substances telles que NO, N₂O, NH₃, CH₄, et autres gaz apportés par des activités anthropiques peuvent entrer dans la composition de la phase gazeuse du sol. Ces substances peuvent être présentes à l'état libre ou dissous dans la solution de sol en fonction de leurs propriétés de solubilisation. Toutefois, la phase gazeuse peut être absente dans le sol lors de phénomènes de précipitation intense saturant le sol en eau [29].

1.2.1.3 La phase liquide du sol

La phase liquide du sol, également nommée solution de sol, est constituée d'eau et de diverses substances minérales et organiques dissoutes (ions et certains complexes), colloïdales (entités de tailles comprises entre 1 nm et 1 µm) et particulaires (> 1 µm) dont la nature et la concentration dépendent des caractéristiques du sol et de divers phénomènes tels que le climat, l'activité biologique et les apports anthropiques. La solution de sol est difficile à décrire en raison de sa grande variabilité spatiale et temporelle. De ce fait, il n'y a pas de composition type de cette solution. Il est toutefois possible de réaliser des solutions de sol synthétiques connaissant les caractéristiques générales de la solution [15]. La solution de sol a un rôle important d'un point de vue environnemental étant donné qu'elle est le vecteur principal de la mobilisation des éléments chimiques du sol. Elle est notamment responsable de la qualité et de la croissance des végétaux, ceux-ci y puisant les éléments nutritifs présents sous formes biodisponibles. Dans ce contexte, les propriétés de la solution de sol peuvent fortement affecter le développement des plantes et dans les cas critiques, avoir des conséquences agronomiques et environnementales désastreuses.

1.2.2 Réactivité à l'interface solide - liquide

Bien que le transfert des ETM vers les parties aériennes des plantes puisse avoir lieu par voie atmosphérique [30], les études se sont focalisées sur le transfert des ETM par la voie racinaire et donc à la solution de sol. Le sol est un milieu complexe contenant des ETM sous différentes formes chimiques (spéciation) dans différents compartiments de la matrice (fractionnement). La spéciation se définit comme étant la distribution des espèces chimiques d'un élément au sein d'un système solide ou liquide. L'analyse de spéciation permet d'identifier et/ou quantifier ces espèces chimiques. Le fractionnement est un processus de classification d'un ou d'un groupe d'analyte(s) dans un échantillon donné en fonction des propriétés physiques (taille, solubilité,...) ou chimiques (réactivité, labilité, ...) des espèces constitutives des échantillons [31,32].

Dans le sol, les ETM peuvent exister sous formes d'ions libres, complexées ou liées à des particules de sol de tailles plus ou moins importantes. Cependant, seules les formes libres ou faiblement complexées sont reconnues comme étant biodisponibles. Evaluer la biodisponibilité d'un élément trace requiert donc l'estimation des concentrations en ces formes dans la solution du sol. D'un point de vue analytique, deux défis sont liés à cette évaluation : l'échantillonnage de la solution de sol et la mesure de ces formes (cf. paragraphe 1.3.2).

L'évaluation du transfert des ETM du sol aux plantes nécessite le recours aux concepts de bioaccessibilité et de biodisponibilité des ETM dans le sol. Ces concepts sont très largement utilisés mais souvent confondus [33–35]. Ils sont abordés plus en détail ci-après.

1.2.2.1 Bioaccessibilité, biodisponibilité et labilité

La concentration totale en ETM présents dans le sol n'est pas reliée à la concentration effective prélevée par la plante [36–38]. La disponibilité environnementale correspond à la partie de la concentration totale en ETM contenus dans le sol pouvant être transférée vers des compartiments où les ETM seront moins énergétiquement retenus, le compartiment ultime étant représenté par la phase liquide, c'est-à-dire la solution de sol [39]. Pour un système sol - plantes, le transfert des ETM du sol à la plante s'effectue essentiellement par l'intermédiaire de l'absorption des ETM contenus dans la solution de sol par les racines [40].

a) Biodisponibilité

Le concept de biodisponibilité connaît de nombreuses définitions différentes selon le domaine scientifique considéré (toxicologie, pédologie, ...) [35]. Pour certains auteurs, en agronomie, elle correspond à la quantité d'éléments réellement absorbés par un organisme vivant [41]. D'autres la définissent comme la quantité d'ions libres présents dans la solution de sol [14] ou encore la quantité d'éléments absorbés atteignant les vaisseaux de la sève (toxicologie) [42]. Baize définit la notion de biodisponibilité comme « l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment du sol vers un organisme vivant (microflore, faune, flore et homme). La biodisponibilité implique le franchissement d'une barrière biologique, celle constituée par les

parois cellulaires (des racines ou des stomates chez les végétaux supérieurs). » [43]. Toujours selon Baize, elle résulte de l'interaction de trois paramètres :

- L'espèce chimique présente dans la solution du sol (nature et concentration) ;
- Les propriétés physico-chimiques et microbiologiques du sol ;
- L'organisme vivant considéré.

Dans le cas des sols cultivés, la biodisponibilité représente le niveau d'exposition des racines aux ETM. Elle ne dépend pas seulement de la spéciation à un temps donné des ETM présents dans les sols mais également de l'évolution temporelle de la spéciation. En effet, les racines peuvent interagir avec le sol environnant et en modifier les propriétés physico-chimiques (pH, spéciation, concentration en solution des ETM, ...), créant ainsi une zone de sol « bio-influencé » au niveau de la racine (la rhizosphère) [44]. La rhizosphère est ainsi définie comme « le volume du sol soumis à l'influence de l'activité racinaire » [45].

La spéciation des ETM et donc leur biodisponibilité peuvent être fortement influencées au niveau de la rhizosphère par l'espèce végétale, le sol et le temps d'exposition [46].

Dans la suite de ce manuscrit, la biodisponibilité exprime la quantité d'ETM directement disponible pour l'organisme vivant, ici la plante, à un temps donné.

b) Bioaccessibilité

La bioaccessibilité regroupe la partie biodisponible des ETM plus la partie potentiellement disponible mais éloignée des organismes vivants et/ou temporellement adsorbés sur les particules de sol par une réaction réversible (figure 1.6) [41].

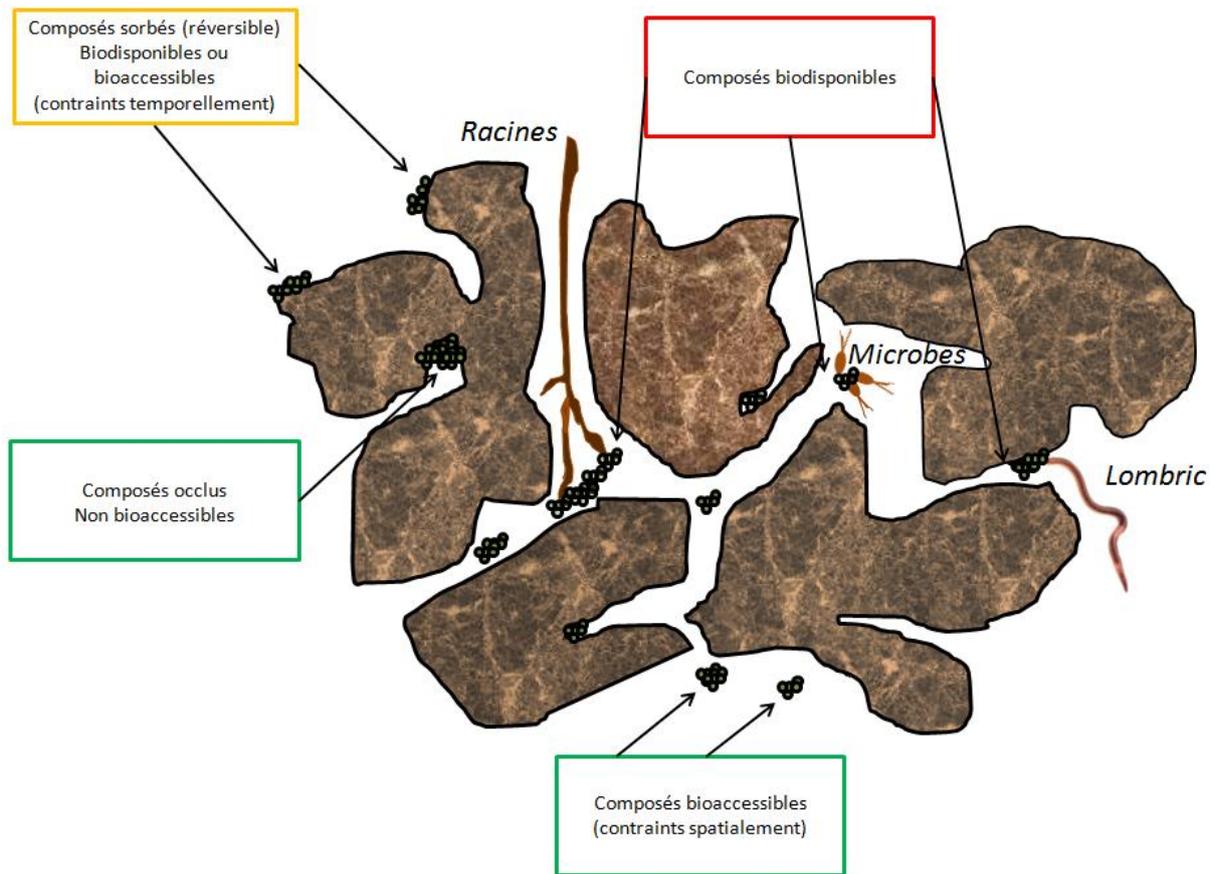


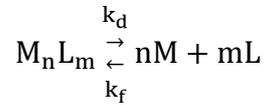
Figure 1.6 : Illustration de la bioaccessibilité et la biodisponibilité des composés dans le sol, adapté de [41]

Ainsi selon la figure 1.6, seuls les composés occlus ne sont pas bioaccessibles.

La bioaccessibilité et la biodisponibilité des ETM varient en fonction de plusieurs facteurs parmi lesquels, le pH, le potentiel redox, la capacité d'échange de cation (CEC), les proportions d'argile, la teneur en matière organique, les activités biologiques du sol et le temps d'exposition. Le pH, la CEC, la teneur en oxyhydroxydes et la teneur en matière organique semblent être les principaux facteurs responsables de la mobilisation des ETM [47–50], c'est-à-dire de leur passage en solution à partir de la phase solide (le sol) [51].

c) Labilité

De manière générale, l'équilibre de dissociation d'un complexe ETM-ligand (organique ou inorganique) s'écrit :



Avec M ion libre de l'ETM, L ligand organique ou inorganique, k_d la constante de vitesse de dissociation du complexe et k_f la constante de vitesse de formation du complexe.

La stabilité du complexe $M_n L_m$ est caractérisée par une constante thermodynamique de dissociation K_d définie par :

$$K_d = \frac{(M)^n (L)^m}{(M_n L_m)}$$

Avec (M), (L) et $(M_n L_m)$ représentant les activités de chaque composé à l'équilibre.

La stabilité du complexe varie avec le K_d et est fonction des activités des composés à l'équilibre. La constante de stabilité du complexe s'écrit aussi en fonction des constantes de vitesses de dissociation et formation du complexe, selon :

$$K_d = \frac{k_d}{k_f}$$

La constante k_f est essentiellement limitée par la vitesse de déprotonation de M hydraté [52]. Il existe des complexes, très stables dans certaines conditions, qui sous l'effet d'une perturbation, peuvent se dissocier très rapidement [53]. La labilité traduit alors la facilité avec laquelle un complexe se dissocie lorsqu'il est soumis à une perturbation. Ainsi, une chute de la stabilité du complexe engendrera une augmentation de sa labilité. La réciproque n'est pas toujours vraie car une réaction peut être réalisable mais de cinétique très lente. On distingue ainsi les complexes labiles des complexes non labiles selon qu'ils se dissocient à l'échelle de temps du phénomène considéré ou pas. Pour des systèmes dynamiques, la mesure des espèces libres et labiles d'un élément est un bon indicateur de sa biodisponibilité [54]. En effet, il est communément accepté que *in fine* seul l'ion libre est internalisé au sein de l'organisme vivant.

1.2.2.2 Le transfert sol - plante

La solution de sol fournit à la plante la majorité des nutriments dont elle a besoin pour se développer mais également des éléments potentiellement toxiques, d'origine naturelle ou anthropique. Ces éléments peuvent alors engendrer la contamination du sol. Les quantités d'ETM absorbées par les racines dépendent de la concentration, du fractionnement, de la spéciation des ETM présents dans la solution du sol et de leur capacité à migrer depuis le sol jusqu'à la surface des racines.

Les ETM sont transportés de la solution de sol vers les racines par deux processus (figure 1.7):

- La diffusion : La plante, en prélevant un élément, conduit à une diminution de la concentration en ETM dans la solution de sol proche de la racine, donc à la création d'une différence de concentration entre le sol proche de la racine et le sol plus lointain. L'élément va se déplacer spontanément vers la racine, c'est-à-dire vers la zone où la concentration est la plus faible. Ce transport s'exerce sur de petites distances (0,1 - 15 mm). C'est le principal processus de transport vers la plante des ETM, sauf lorsque leur concentration dans la solution du sol est élevée, comme dans le cas des sols pollués sur des sites industriels [55–57].
- Le flux de masse : La plante a des besoins importants en eau ; elle peut donc absorber les solutés en même temps que l'eau. Le prélèvement de l'eau produit une différence de potentiel hydrique entre le sol proche de la racine et le sol plus lointain, conduisant alors à des mouvements d'eau, accompagnés des éléments solubles, du sol vers la racine. Ce transport des ETM s'effectue sur de plus longues distances que la diffusion (quelques cm) [55].

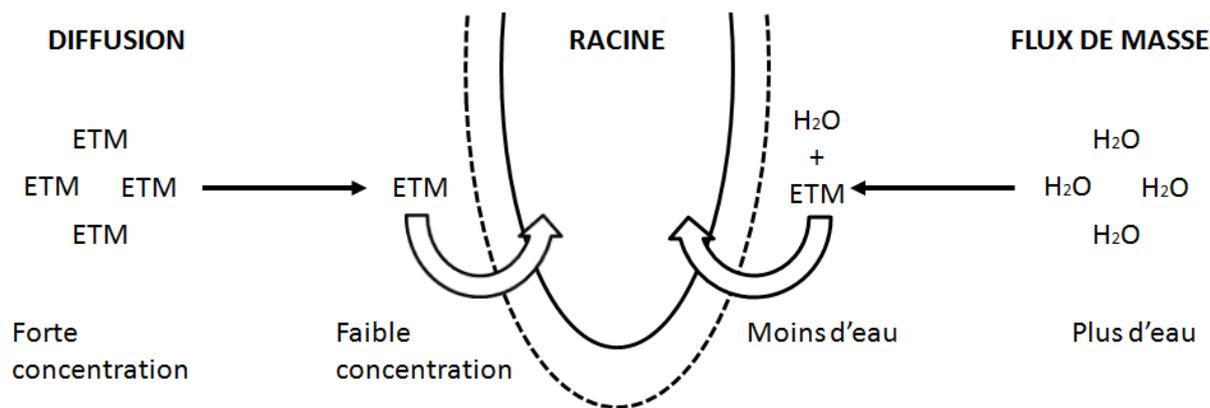


Figure 1.7 : Transport des ETM vers la racine, par diffusion et par flux de masse, adapté de [55]

La quantité d'ETM présents dans les divers organes d'une plante dépend du transport de l'extérieur des racines vers l'intérieur, puis de leur translocation des racines vers les organes de la plante [58]. La fraction d'un élément susceptible d'être absorbée par les racines correspondant à la fraction biodisponible est également qualifiée de fraction phytodisponible [59]. Elle est dépendante des propriétés du sol, de l'espèce végétale considérée et de l'élément étudié. Le meilleur outil pour mesurer la phytodisponibilité des ETM est l'organisme végétal lui-même [60,61].

Le facteur de transfert sol/plante, noté FT, permet d'évaluer le taux d'absorption des ETM du sol par la plante. Il est défini selon l'équation :

$$FT = [ETM]_{\text{plante}} / [ETM]_{\text{sol}}$$

Avec $[ETM]_{\text{plante}}$ la concentration totale en ETM dans la plante et $[ETM]_{\text{sol}}$ la concentration totale en ETM dans le sol dans lequel la plante est issue, les concentrations étant exprimées en mg.kg^{-1} de matière sèche de sol ou de plante [62,63]. Les valeurs de FT dépendent de l'ETM considéré [63], des caractéristiques physico-chimiques du sol [63–65] et de la nature des plantes [65]. Bien que facile à évaluer, le FT est cependant assez controversé car il implique la concentration totale en ETM dans le sol, non représentative de la fraction biodisponible. De plus, son calcul nécessite le prélèvement de la plante entière (racines incluses). Or, il est difficile de séparer le sol des racines. En effet, même un rinçage rigoureux des racines n'est jamais complet et ne suffit pas à éliminer la totalité des particules de sols adsorbées sur les racines. Certains auteurs préfèrent donc utiliser la concentration en ETM biodisponible dans le sol plutôt que sa teneur totale en ETM, avec la difficulté de pouvoir l'estimer [66,67].

D'autres auteurs utilisent la concentration en ETM dans les parties comestibles puis sur les parties non consommables plutôt que leur concentration dans la plante entière. Cependant cette alternative sur le calcul des concentrations totales dans les plantes est assez peu utilisée dans la littérature [63]. Après l'absorption par les racines, les éléments trace métalliques peuvent être transférés vers les parties aériennes par la sève. Ce processus est appelé translocation et peut varier considérablement en fonction du métal, mais également de l'espèce végétale [68]. Pour la plupart des espèces, la majorité des ETM absorbés par les plantes demeurent dans les racines, et seulement une faible proportion est transférée vers les parties aériennes [69,70]. En effet, dans le processus d'internalisation et de translocation, le facteur limitant est le transfert des ETM depuis la partie externe de la racine vers sa partie interne où se trouvent les vaisseaux de sève. De ce fait, il y a souvent une accumulation des ETM dans la racine.

1.2.3 La plante

Pour croître et se développer, la plante a besoin d'eau, de lumière et d'éléments nutritifs. La plante puise l'eau et les éléments nutritifs nécessaires à son développement directement dans la solution de sol. Les principaux éléments nutritifs dont la plante a besoin sont l'azote, le phosphore et le potassium. La plante puise également des éléments indispensables en plus petites quantités (calcium, magnésium, soufre...) ainsi que les oligo-éléments (cuivre, zinc...). La plante n'a pas les mêmes besoins nutritifs selon sa variété et son espèce. Les céréales sont des plantes cultivées principalement pour leurs grains, et utilisées principalement dans l'alimentation de l'Homme et des animaux. Les céréales et oléagineux, avec 9 millions et 2 millions d'hectares cultivés, soit 17 et 4 % des terres arables respectivement, représentent les deux premiers groupes de culture française en superficie [71–74].

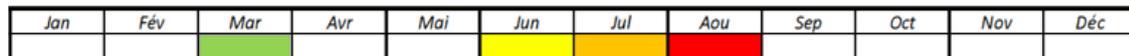
1.2.3.1 Le blé

Le blé est une céréale qui appartient à la famille des graminées (plante à tige creuse et dont les grains sont regroupés en épis) [75]. Le grain de blé représente la partie consommable dans l'alimentation humaine. Les grains de blé sont principalement constitués d'amidon (environ 70 % de la matière sèche), de protéines (10 à 18 % de la matière sèche selon les variétés et les

conditions de cultures) et de pentosanes² (7 à 10 % de la matière sèche). Les autres constituants sont les lipides, la cellulose, les sucres libres, les minéraux et les vitamines [76,77]. La consommation humaine (pain et biscuits) représente le débouché principal du blé, suivie de l'alimentation animale [76]. Il est également utilisé à moindre mesure pour des usages industriels (amidonnerie et glutennerie). Au cours des prochaines années, la demande mondiale devrait progresser d'environ 1 % par an. Cette augmentation de la demande s'explique par la production de biocarburant de plus en plus rependue dans les pays de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) [78].

Il existe deux grandes variétés de blé : le blé dur et le blé tendre. La dureté du blé est une caractéristique du grain définie comme sa résistance à la déformation. Elle peut être mesurée par plusieurs méthodes et notamment le broyage d'un seul grain (SKCS : Single Kernel Characterisation System). En ce qui concerne le blé dur, on distingue le blé de printemps, qui se sème au mois de mars et le blé d'hiver, qui se sème à l'automne, durant le mois d'octobre durant lequel les conditions météorologiques sont humides mais pas trop fraîches (figure 1.8).

Blé de Printemps



Blé d'Hiver

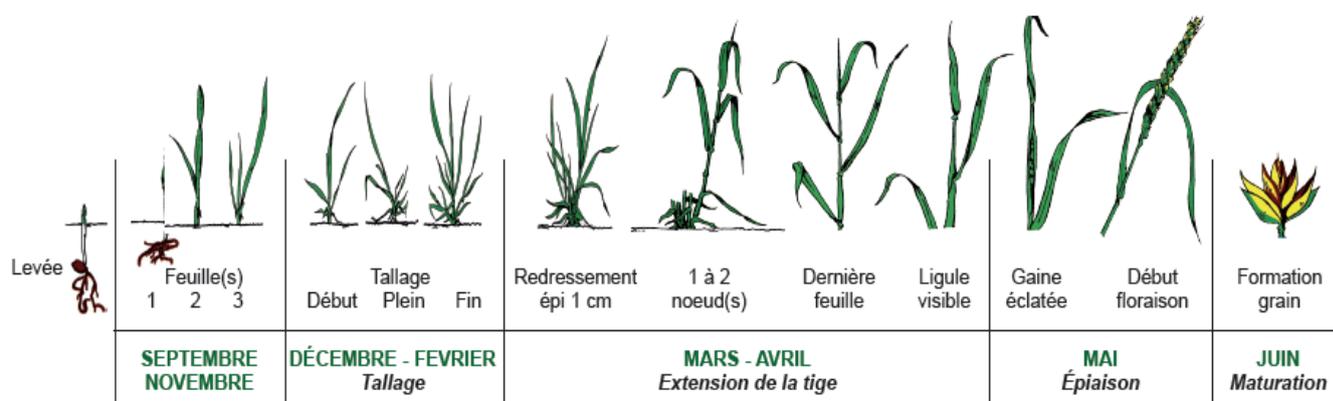
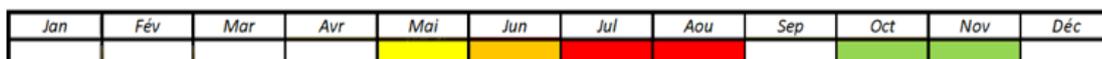


Figure 1.8 : Les différents stades de développement du blé [79,80]

² Pentosane : Composé chimique formé par l'association de plusieurs pentoses (glucides non hydrolysables dont la molécule renferme 5 atomes de carbone)

1.2.3.2 Le tournesol

Le tournesol est un oléagineux cultivé pour ses grains riches en matières grasses [72]. En effet, les grains de tournesol contiennent majoritairement de l'huile (44 %), de l'eau (9 %), des protéines (18 %), de la cellulose (15 %) et d'autres matières (14 %) [81]. La surface cultivée en tournesol représente autour de 700 000 hectares en France [72,82]. L'extraction d'huile à partir des grains et la consommation directe par l'Homme représentent les utilisations principales de la production du tournesol. L'huile de tournesol est l'une des mieux équilibrées quant aux acides gras qui la composent et elle est riche en acide linoléique, acide gras essentiel pour l'alimentation animale. Le tourteau de tournesol, c'est-à-dire le produit obtenu après extraction de l'huile et utilisé en alimentation animale, se situe parmi les meilleurs en termes de valeur nutritive, en raison de sa forte teneur en matières azotées totales (45-55 %) et de sa teneur élevée en vitamines du groupe B. Le tournesol est utilisé dans différents secteurs, notamment en lipochimie (savons, détergents, cosmétiques), en valorisation énergétique (combustibles à partir des coques et tiges ou biocarburants), en alimentation animale et dans l'alimentaire (pectines utilisées comme épaississant naturel) [83–85]. Les tournesols sont semés traditionnellement du mois d'avril jusqu'à mi-juin, lorsque les risques de gel sont passés. Ils sont récoltés dans le courant du mois d'août (figure 1.9).

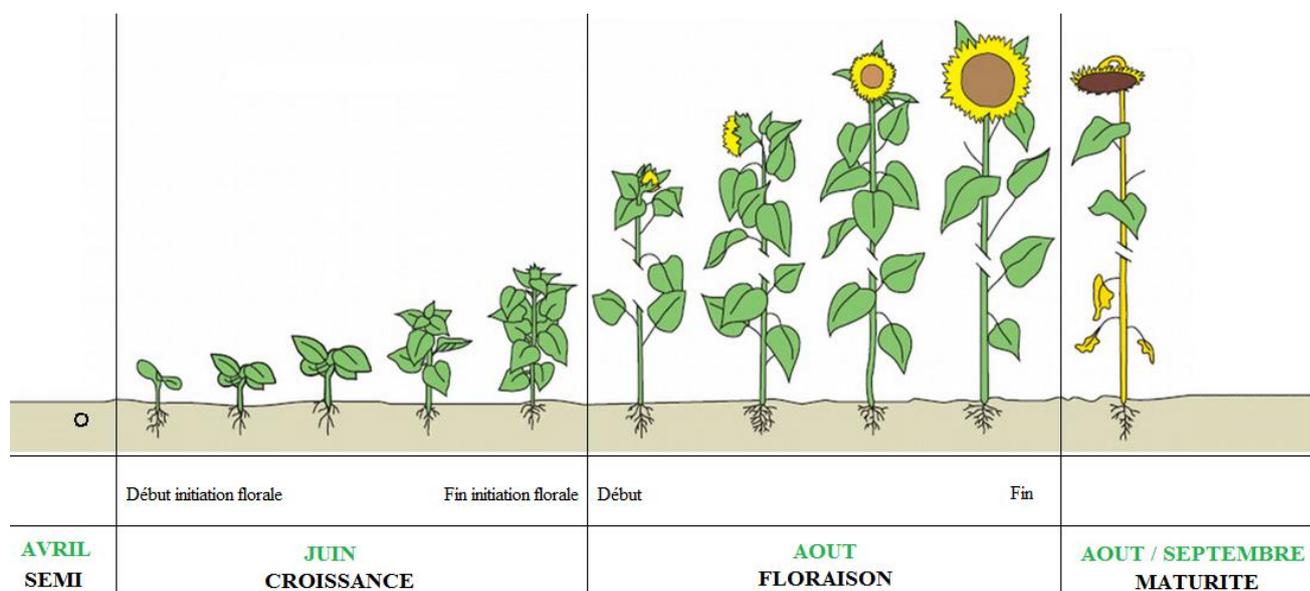


Figure 1.9 : Les différents stades de développement du tournesol [86]

1.2.4 Les ETM dans le système sol - plante

La qualité sanitaire des céréales repose sur l'absence de contaminants dans les parties végétales consommées : grains, feuilles et tiges pour l'alimentation animale, grains uniquement pour l'alimentation humaine. Parmi ces contaminants, certains sont particulièrement préoccupants : Ils présentent une toxicité avérée et leurs concentrations dans les produits commercialisés sont réglementées par des textes européens (1126/2007 CE, 1881/2006 CE, 32/2002 CE). Cette réglementation est lourde de conséquences économiques pour les filières agricoles concernées. Il s'agit pour les organes végétaux des ETM (cadmium, plomb et arsenic) et des résidus de pesticides. La région Aquitaine présente une grande diversité de contamination pour les ETM considérés dans la réglementation (notamment le cadmium et le plomb) avec les sols agricoles parmi les moins riches et les plus riches de France [87]. D'autre part, les retombées atmosphériques en ETM sont faibles mais les flux apportés par les intrants agricoles sont parmi les plus élevés de France, notamment pour l'arsenic, le cadmium et le cuivre.

Ainsi, dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi de prendre en compte ces cinq éléments chimiques : l'arsenic, le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc.

1.2.4.1 Essentialité et toxicité des ETM pour la plante

a) Notion de danger et de risque

Par définition, un danger est « la capacité ou la propriété intrinsèque d'un équipement, d'une substance, d'une méthode de travail à causer un dommage pour la santé. » [88]. Le risque représente l'éventualité d'une rencontre entre un organisme vivant et un danger auquel il peut être exposé. Pour qu'il y ait risque, il faut qu'il y ait à la fois un danger et une exposition à ce danger. La notion de risque est à mettre en relation avec des situations ou des procédés (environnement et activités) qui présentent une probabilité de conséquence négative. C'est-à-dire la probabilité qu'un danger se réalise et provoque des dommages [88-91].

b) Les oligo-éléments

Un élément est essentiel et qualifié d'oligo-élément si l'interruption de son apport dans un organisme débouche sur des symptômes caractéristiques de carence qui ne peuvent être évités que par l'apport de l'élément lui-même [92]. Les oligo-éléments sont des éléments indispensables à la vie, présents en faibles quantités dans les tissus biologiques [93]. Des carences en oligo-éléments provoquent des troubles de croissance de la plante et des symptômes de déficiences peuvent se manifester. De même, un excès en oligo-éléments représente un véritable risque pour la plupart des végétaux si la dose absorbée devient trop importante [94] (figure 1.10).

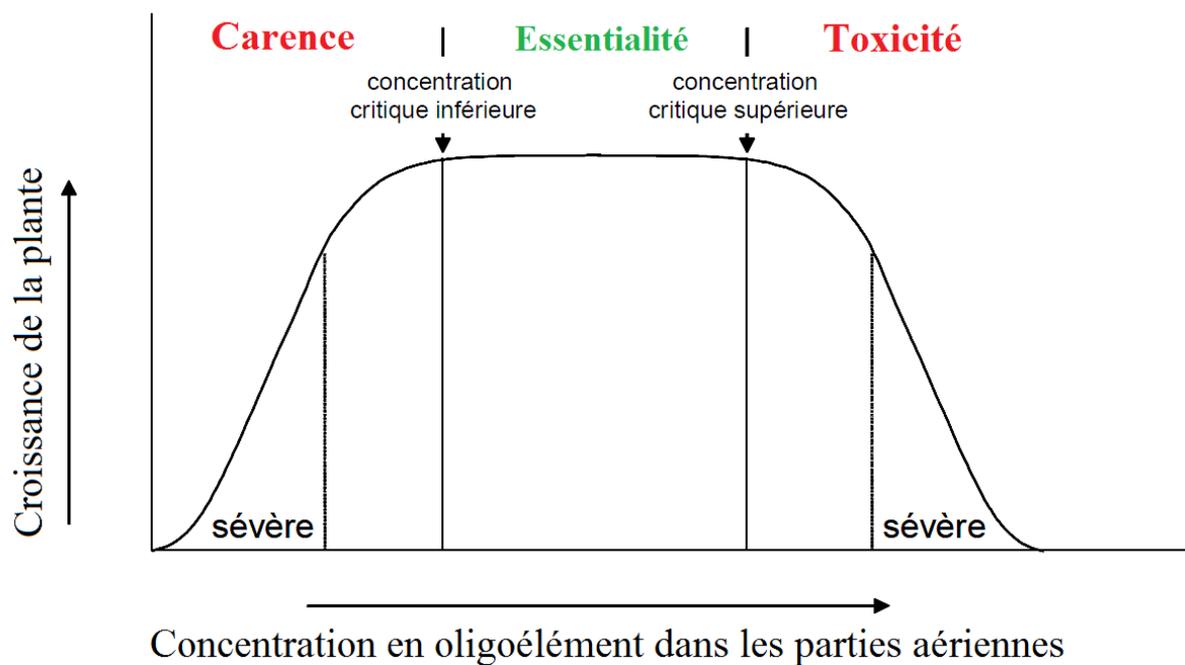


Figure 1.10 : Courbe de croissance des végétaux selon la quantité d'oligoélément ingérée, adapté de [94]

c) Toxicité des ETM retenus dans l'étude vis-à-vis de la plante

A l'origine, tous les sols contiennent naturellement des ETM du fait de leur présence naturelle dans la roche mère [95,96]. La concentration en ETM dans le sol peut varier d'un sol à un autre en fonction de la nature de la roche-mère et des processus physico-chimiques et biologiques intervenant dans le sol. La quantité d'ETM ainsi présente constitue le bruit de fond, dit fond pédogéochimique [97]. Des études ont été menées, notamment par Denis Baize³, afin de définir une gamme de valeurs de « concentrations naturelles » en ETM, à l'échelle nationale française. Lorsque des valeurs de concentration en ETM apparaissent anormalement hautes, il est courant de les qualifier d'anomalies [98]. Le tableau 1.3 présente le fond pédogéochimique ainsi obtenu et classe les concentrations en trois catégories : ordinaires, anomalies modérées et fortes anomalies.

Tableau 1.3 : Gammes de valeurs ordinaires et d'anomalies naturelles des ETM dans les sols (exprimées en mg(métal) kg⁻¹(sol)) [97]

ETM	Gamme de valeurs naturelles couramment observées	Gamme de valeurs d'anomalies naturelles modérées	Gamme de valeurs de fortes anomalies naturelles
Arsenic	1 - 25	30 - 60	60 - 284
Cadmium	0,05 - 0,45	0,7 - 2,0	2,0 - 4,63
Cuivre	2 - 20	20 - 62	65 - 160
Plomb	9 - 50	60 - 90	100 - 10180
Zinc	10 - 100	100 - 250	250 - 11426

Les plus fortes concentrations en ETM détectées dans les sols sont généralement d'origine anthropique : activités urbaines, industrielles et agricoles [95,99,100]. Etant donné qu'ils ne peuvent pas être dégradés ni détruits, les ETM persistent et s'accumulent dans les sols [2,3].

En particulier, les activités agricoles contribuent fortement à la contamination des sols par les ETM. Les produits employés sont destinés à améliorer les propriétés des sols. Il s'agit des engrais, composts, boues de station d'épuration et autres produits destinés à lutter contre les ravageurs des cultures semées dans ses sols [61,101].

³ Denis Baize : Pédologue et directeur de recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Unité de Science du Sol - Centre de Recherche d'Orléans

Parmi les ETM étudiés, certains présentent intrinsèquement un danger pour les plantes alors que d'autres ETM, les oligoéléments, sont essentiels à faibles concentrations pour la plante mais présentent un danger si leurs concentrations sont trop importantes (tableau 1.4).

Tableau 1.4 : ETM indispensables aux organismes biologiques et toxicité [102]

ETM	Indispensable à faibles concentrations		Toxique à fortes concentrations	
	Végétaux	Animaux	Végétaux	Animaux
Arsenic		✓	✓	✓
Cadmium			✓	✓
Cuivre	✓	✓	✓	✓
Plomb			✓	✓
Zinc	✓	✓	✓	✓

Le cuivre et le zinc sont des oligo-éléments. Pour des plantes se développant sur des sols possédant des teneurs totales faibles en cuivre et zinc, ou en présence de cuivre ou zinc peu mobiles, la plante peut présenter des carences en ces oligo-éléments. C'est le cas, en particulier, de plantes poussant sur des sols calcaires ou riches en matières organiques, dans lesquels le cuivre et zinc sont fortement complexés aux substances organiques [40].

Le cuivre participe entre autre à la synthèse des protéines, la photosynthèse, la respiration, divers systèmes enzymatiques, etc. Les besoins en cuivre de la plante sont estimés à 2-5 jusqu'à 20 à 30 mg kg⁻¹ de matière sèche selon l'espèce [40]. Le zinc participe à la formation de plusieurs hormones de croissance, la constitution de systèmes enzymatiques importants, la synthèse de la chlorophylle, etc... Les besoins en zinc de la plante sont estimés à 15 - 20 et jusqu'à 100 à 300 mg kg⁻¹ de matière sèche selon l'espèce [40,103].

Le cadmium et le plomb sont des métaux toxiques indépendamment de leurs concentrations dans la plante. Le cas de l'arsenic est particulier étant donné que c'est un oligo-élément essentiel au métabolisme de certains organismes vivants, mais que certaines formes chimiques de ce composé sont avérées être toxiques [104,105]. L'arsenic est indispensable à faible concentration pour certains animaux alors qu'il est non essentiel et toxique, même à faible concentration, pour les végétaux [102].

La littérature définit des valeurs moyennes fréquemment observées concernant les concentrations en ETM dans les sols [97], les plantes en général [106] et dans les grains de blé [107] et de tournesol [108] (tableau 1.5). Les concentrations en arsenic, ne faisant pas l'objet de réglementation pour l'alimentation humaine, ne sont pas toujours déterminées dans les plantes. Cela dit, elles le sont pour l'alimentation animale (directive 2002/32/CE du parlement européen et du conseil du 7 mai 2002 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux (tableau 1.6)).

Tableau 1.5 : Valeurs moyennes de concentrations en ETM (mg kg^{-1}) mesurées dans les sols et les plantes adapté de [93,103,104,105]

	Arsenic	Cadmium	Cuivre	Plomb	Zinc
Sol	1-25	0,05-0,45	2-20	9-50	10-100
Plantes	Non défini	0,05	10	1	50
Grains de blé	Non défini	0,02-0,03	2,9-3,3	0,11-0,22	18,0-19,6
Grains de tournesol	0,005	0,245	18,2	0,267	47,8

Il en ressort que le transfert des ETM du sol vers les grains des deux espèces de végétaux retenus pour l'étude peut-être important. De plus, le tournesol est une plante qui accumule plus d'ETM dans ses grains que le blé [109]. Des réglementations sur les teneurs en ETM ont été mises en place afin de limiter leur présence dans les parties consommables des plantes.

1.2.4.2 Réglementation

Les notions de contamination et de pollution sont couramment employées pour désigner la présence anormale, généralement d'origine anthropique, d'éléments ou de composés minéraux, organiques ou d'agents pathogènes dans un milieu donné dont la qualité se trouve alors affectée.

Par définition, une pollution désigne l'accumulation d'un composé en quantité telle qu'il peut induire un danger pour les organismes vivants ou compromettre l'usage qui est habituellement fait du milieu récepteur. Parallèlement, le terme de contamination désigne une augmentation des teneurs totales dans le milieu naturel suite à des apports anthropiques, sans préjuger d'une évolution négative de la qualité [110].

Comme énoncé précédemment, la teneur totale en ETM permet d'évaluer le stock de ces éléments contenus dans le sol à un moment donné mais ne donne aucune information sur sa biodisponibilité des ETM pour les plantes.

De ce fait, il est difficile de fixer une valeur limite universelle de la teneur totale d'un élément ayant une signification de risque qui soit utilisable pour tous les types de sols, types de plantes cultivées ni pour les divers usages des sols. Une valeur-seuil d'une norme ne peut donc servir que de « signal d'alerte » au dessus duquel une investigation plus détaillée est nécessaire. En l'absence d'une réglementation française spécifique au sol, l'arrêté du 8 janvier 1998, relatif à l'épandage agricole des boues, impose des teneurs limites en ETM au-delà desquelles l'épandage de boues de STEP n'est pas autorisé. Au niveau européen, la directive n° 86-278 du 12 juin 1986, relative à la protection de l'environnement et notamment des sols, définit les valeurs limites de concentration en ETM dans les sols agricoles [97].

Concernant les plantes, les teneurs en arsenic, en cadmium et en plomb dans le blé et le tournesol sont soumises à des réglementations selon les directives 32/2002/CE et 1881/2006/CE de la commission européenne selon leur utilisation pour l'alimentation des animaux et des Humains respectivement (tableau 1.6). Ces valeurs limites sont identiques dans le blé et le tournesol concernant l'alimentation animale. A ce jour, et à notre connaissance, il n'y a pas de réglementation des valeurs en ETM dans le tournesol destiné à l'alimentation humaine.

Tableau 1.6 : Valeurs seuils de concentrations en ETM dans les sols agricoles, le blé et le tournesol [111,112]

		Arsenic	Cadmium	Cuivre	Plomb	Zinc
Sol	Valeur seuil avant épandage des boues : Arrêté du 8 janvier 1998 (mg kg ⁻¹ sol sec)	Non définie	2	100	100	300
	Valeurs limites en vigueur en UE* : Directive n° 86-278 (mg kg ⁻¹ sol sec)	Non définie	1-3	50-140	50-300	150-300
Blé	Valeur seuil selon la Directive 32/2002/CE pour l'alimentation animale (mg kg ⁻¹ masse humide (12% d'humidité))	2	1	Non définie	10	Non définie
	Valeur seuil selon la Directive 1881/2006/CE pour l'alimentation humaine (mg kg ⁻¹ masse humide)	Non définie	0,2	Non définie	0,2	Non définie
Tournesol	Valeur seuil selon la Directive 32/2002/CE pour l'alimentation animale (mg kg ⁻¹ masse humide (12% d'humidité))	2	1	Non définie	10	Non définie
	Valeur seuil selon la Directive 1881/2006/CE pour l'alimentation humaine (mg kg ⁻¹ masse humide)	Non définie				

* Ces valeurs ont été fixées pour des sols dont le pH est compris entre 6 et 7

Compte tenu des réglementations en vigueur, l'agriculture doit alors produire des végétaux dont la concentration en ETM dans les grains est inférieure à ces réglementations. De plus, le contexte est très propice à un durcissement de la réglementation concernant la teneur en éléments traces des produits agricoles à destination de l'alimentation humaine et animale, aussi bien au niveau national qu'europpéen. Certains pays ont cartographié les teneurs en éléments traces dans certains végétaux cibles, comme le blé en Grande-Bretagne : C'est le cas par exemple du blé, pour lequel il a été démontré que 2 à 4 % des lots de blé dépassent une valeur seuil de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ dans certaines régions [113]. En France, il n'existe qu'une seule étude sur du blé qui a analysé les distributions spatiales en éléments trace dans différents sols et qui montre que 10 % des lots de blé dépassent la valeur seuil de $0,2 \text{ mg(Cd) kg}^{-1}$ sans qu'aucune explication simple ne puisse être trouvée [114].

La nécessité de surveiller la qualité des sols agricoles français et de leur culture a donné lieu à la création de différents programmes de surveillance dont le RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols) et le RMT - QUASAPROVE (Réseau Mixte technologique de la Qualité Sanitaire des Productions Végétales de Grandes Cultures).

Le réseau RMQS [87,115] repose sur le suivi de 2200 sites répartis uniformément sur le territoire français, selon une maille carrée de 16 km de côté. Il est le seul réseau de sites couvrant l'ensemble de la surface de la France. Il est largement utilisé pour évaluer la contamination en ETM et les caractéristiques physico-chimiques des sols français. Ces données permettent d'évaluer et de suivre la qualité des sols français, réaliser des cartes afin de localiser les zones présentant de fortes concentrations en éléments trace, de détecter l'évolution du sol à court et long termes et de préparer une banque d'échantillon en stockant les différents échantillons de sol.

Parallèlement, le RMT Quasaprove a pour objectif d'améliorer la situation sanitaire en pré- et post-récolte des grandes productions végétales françaises dont les céréales et les oléagineux [116]. Les travaux du RMT portent sur l'origine, le devenir et la maîtrise des contaminants et organismes indésirables qui font peser des risques sur la qualité sanitaire, à toutes les étapes de la chaîne alimentaire : les mycotoxines, les éléments trace métalliques, les résidus de produits phytosanitaires, les insectes (cause d'infestation des denrées stockées), la microflore fongique phytopathogène en pré- et post-récolte, les autres contaminants potentiels (polluants organiques persistants) ou contaminants émergents [117]. Parmi les actions réalisées dans le cadre de ce RMT, notons celles visant à prévoir, notamment par un diagnostic directement réalisé sur les

végétaux cultivés, le danger que la présence des ETM peut représenter pour les plantes, ainsi que celles visant à appréhender la biodisponibilité des ETM du sol.

1.3 Approches analytiques

Dans le contexte précédemment évoqué, l'application d'un protocole d'échantillonnage de végétaux paraît être un prérequis indispensable à l'évaluation des concentrations globales des ETM dans leurs parties consommées, à l'échelle du champ. C'est également la première étape du processus analytique, et celle qui va conditionner la qualité et la fiabilité de l'ensemble de la chaîne de mesure et des informations obtenues. C'est pourquoi, dans un premier temps, un intérêt particulier a été donné au recensement et à la comparaison de protocoles existants dans la littérature. Complémentairement, la détermination des concentrations en éléments biodisponibles présents dans le sol où les végétaux sont cultivés représente un défi méthodologique et analytique qu'il est important de pouvoir relever pour disposer d'outils d'évaluation des transferts sol-plante. Dans un second temps, nous avons donc choisi de focaliser l'approche analytique sur cette détermination.

1.3.1 Les protocoles d'échantillonnage à la parcelle

1.3.1.1 Définition

Les différentes zones mises en place lors d'un échantillonnage sont définies et qualifiées selon un vocabulaire précis (figure 1.11).

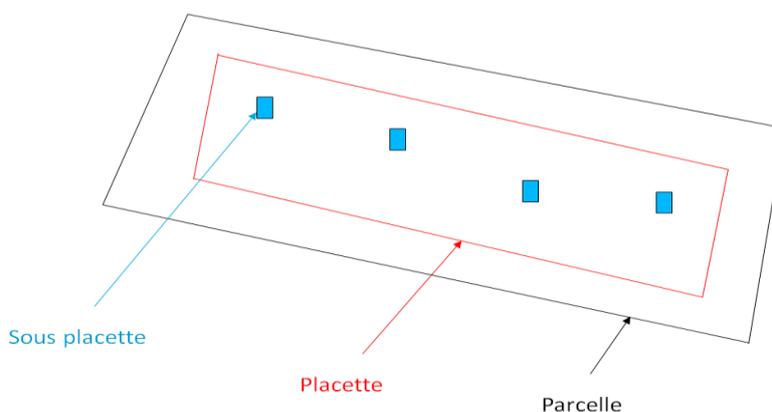


Figure 1.11 : Découpage de la parcelle en vue d'un échantillonnage de sol et/ou de plantes

Par définition, une parcelle est une entité continue présentant généralement une même nature de culture et un traitement homogène pour une saison donnée [118–120]. La placette est la surface de la grille d'échantillonnage dans laquelle l'étude est effectuée. Pour que l'échantillonnage soit représentatif de la contamination des ETM dans la parcelle, la placette doit couvrir le maximum de surface de la parcelle. Enfin, la sous placette correspond à la zone de la placette dans laquelle chaque point de prélèvement est situé.

Compte tenu du risque de contamination en ETM dans les sols agricoles et dans les plantes, des contrôles sont régulièrement effectués. Pour cela, des prélèvements de sols et de plantes sont réalisés afin d'en évaluer la qualité. En France, un large nombre de protocole d'échantillonnage existe. Ils sont définis par des instituts et dépendent de l'information recherchée et de l'échelle considérée (parcelle, ville, région, pays) [121,122]. Une liste non exhaustive de ces protocoles est présentée dans le tableau 1.7.

Tableau 1.7 : Comparaison de protocoles d'échantillonnage utilisés par des instituts français

Protocoles	Dimensions de la placette	Sous placettes	Surface des sous placettes	Localisation des sous placettes	Prélèvement par sous placette	Échantillon par placette	Opérations à suivre	Précautions particulières
INRA Colmar Mais	9 m x 10 m 12 rangs sur la largeur	3 sous placettes : 1 rang sur 7 m de longueur	15,75 m ² équivalent à 17,5 % de la placette	Rang 3, rang 7 et rang 10	Épis : 1 sac Grains : 2 kg Rafles : 5 Tiges : 5	Grains : 6 kg Rafles : 15 Tiges : 15	Pesée, comptage, battage des épis Pesée, homogénéisation des grains puis séchage à 50 °C. Pesée des tiges et rafles puis séchage et broyage au SM 2000	/
INRA Feucherolles 2005 Mais	10,4 m x 48,5 m	5 sous placettes sur les 6 rangs centraux : 2 rangs sur 2,5 m de longueur	20 m ² équivalent à 4 % de la placette	1ère placette à 10 m des limites de la sous placette dans le sens de la longueur et 3.2 m dans le sens de la largeur. Distance entre sous placettes : 4 m sur la longueur et un rang sur la largeur.	Épis : / Grains : / Rafles : / Tiges : 6	Grains : 1 kg Rafles : / Tiges : 5	Pesée des épis puis battage et pesée des grains Séchage à 50°C des grains puis récupération et séchage des rafles. Récolte des tiges puis pesée puis séchage à 50 °C	/
ARVALIS Institut du végétal Céréales	Pas de taille fixe de placette	16 sous placettes réparties aléatoirement	/	Aléatoire	Épis : 100 Grains : / Rafles : / Tiges : /	Épis : 1600 Tiges : /	Prélèvement des épis puis séchage à l'étuve à 60 °C ou conditionneur puis conditionnement dans sacs plastiques Battage, pesée des grains puis broyage	Palier à la variabilité verticale Éviter les tournières et passage de roues Tiges coupées au ciseau sous le rachis

Tableau 1.7 : Comparaison de protocoles d'échantillonnage utilisés par des instituts français
(suite)

Protocoles	Dimensions de la placette	Sous placettes	Surface des sous placettes	Localisation des sous placettes	Prélèvement par sous placette	Échantillon par placette	Opérations à suivre	Précautions particulières
RMT Quasaprove Protocole issu du RMQS Céréales et oléagineux	20 m x 20 m	25 sous placettes de 2 m sur 2 m	100 m ² équivalent à 25 % de la placette	Une sous placette sur deux et un rang sur deux	1 individu	25 individus	/	Gants, couteaux céramiques, glacière, poches plastiques
INRA Colmar Blé et orge	9 m x 10 m 18 rangs sur la largeur	4 sous placettes : 3 rangs sur 1.5 m de longueur	2,7 m ² 3%	Première et quatrième sous placettes situées à 1 m de chaque limite de la placette.	Épis : / Grains : / Tiges : /	Grains : / Tiges : /	Coupe du blé, pesée des gerbes Battage, pesée et homogénéisation des grains. Récupération des résidus de récolte, séchage à 50 °C et broyage au SM 2000 puis homogénéisation	Assembler le blé par gerbe pour chaque sous placette
INRA Feucherolles 2009 Blé	10 m x 45 m 80 rangs de blé sur la largeur	10 sous placettes : 4 rangs sur 0.5 m	2,5 m ² 0,6 %	Les sous placettes 1 et 10 se situent à 10 m de la limite de la placette selon le sens de la longueur et la placette 6 se situe à 25 m de cette limite. Les sous placettes 1, 5, 6 et 10 sont à 2,5 m du bord de la placette. L'écartement entre les sous placettes est de 1 m et la distance entre deux sous placettes dans le sens de la longueur est de 3 m.	Épis : / Grains : / Tiges : /	Grains : / Tiges : /	Comptage des épis et séparation des tiges. Pesée des épis et des tiges après séchage à 50 °C pendant 5 jours Battage des épis, séchage des grains à 50 °C pendant 3 jours.	Blé coupé à 5 cm du sol

Ces protocoles présentent les modalités de prélèvement (nombre de plantes à prélever, localisation des placettes et sous placettes...) ainsi que la préparation des échantillons au laboratoire (séchage, broyage). Certains protocoles tels que « INRA Colmar Maïs », « INRA Feucherolles 2005 Maïs », « INRA Colmar Blé » ou encore « INRA Feucherolles 2009 Blé » proposent des paramètres de prélèvement basés sur des placettes données de dimensions fixes correspondant aux tailles de la parcelle. D'autres au contraire, comme le protocole du RMQS adapté par le « RMT Quasaprove » proposent des placettes indépendantes de la taille de la parcelle et donnant un nombre défini de sous placettes et de plantes à prélever identiques pour chaque campagne de prélèvement. Le protocole de prélèvement de céréales d'« ARVALIS Institut du végétal » propose des placettes de prélèvement de dimensions non fixées et une répartition aléatoire des plantes à prélever. L'objectif de ces protocoles est rarement d'obtenir une carte de répartition spatiale des ETM mais de mesurer la contamination globale et d'évaluer la qualité moyenne des sols et/ou des végétaux. Or, en fonction des résultats obtenus pour les sols et plantes, il peut être décidé d'interdire la culture du sol. La connaissance de la variabilité des concentrations en ETM à la parcelle (hétérogénéité), conduisant éventuellement à une cartographie, permet de détecter des zones ponctuelles contaminées. Cette connaissance représente donc une aide à l'agriculture raisonnée et à la gestion des parcelles, en permettant par exemple d'ajuster les quantités d'intrants nécessaires (pesticides, fertilisants), de gérer au mieux les changements d'occupation des sols, ou de définir les zones cultivables dans la parcelle et d'éviter ainsi l'interdiction de culture sur la totalité de la parcelle. De même, une quantité moyenne d'ETM à la parcelle légèrement inférieure à la réglementation ne garantit pas l'absence de zones contaminées.

Afin d'obtenir des données spatiales représentatives de l'échelle considérée (la parcelle par exemple), le nombre de points de prélèvement à effectuer est un paramètre important à considérer dans l'établissement du protocole. Le protocole d'échantillonnage doit aussi et avant tout rester opérationnel. En effet, une surestimation du nombre de points de prélèvement conduit à une surcharge d'échantillons, une durée d'échantillonnage plus longue, des difficultés de stockage des échantillons et un coût d'analyse important [123]. La disposition des points d'échantillonnage est un autre paramètre important. Les erreurs liées à l'échantillonnage de sol ou végétaux présentant des hétérogénéités peuvent être réduites en augmentant le nombre de point mais également en choisissant un plan d'échantillonnage adapté à l'information recherchée [124]. Il existe différents types d'échantillonnage permettant estimer de façon la plus juste possible l'information recherchée selon l'échelle considérée [125].

1.3.1.2 Les principaux types d'échantillonnage

Dans une parcelle, il y a un nombre infiniment grand de possibilités de répartir la vingtaine de points couramment préconisée pour prélever le sol et/ou les plantes. Chaque échantillon doit être identifié de manière unique et localisé précisément sur la zone d'étude (coordonnées géographiques, profondeur et date de prélèvement). Il existe plusieurs types de prélèvement utilisés lors des campagnes d'échantillonnage de sol et/ou de végétaux parmi lesquels, l'échantillonnage ciblé, l'échantillonnage aléatoire, l'échantillonnage systématique et l'échantillonnage aléatoire stratifié [124,126,127] (figure 1.12). Ces approches peuvent également être combinées pour améliorer la qualité de l'information recueillie lors de l'échantillonnage.

En théorie, pour des données non structurées spatialement et réparties normalement, les sondages peuvent être distribués au sein de la parcelle selon n'importe quel plan d'échantillonnage. Dans la pratique, il a été démontré que les ETM ne sont pas toujours distribués normalement. De ce fait, non seulement la surface réelle à échantillonner (placette) doit être suffisamment grande pour pouvoir être représentative de la parcelle, mais également le type d'échantillonnage doit pouvoir assurer la représentativité à cette échelle et générer des données statistiquement exploitables.

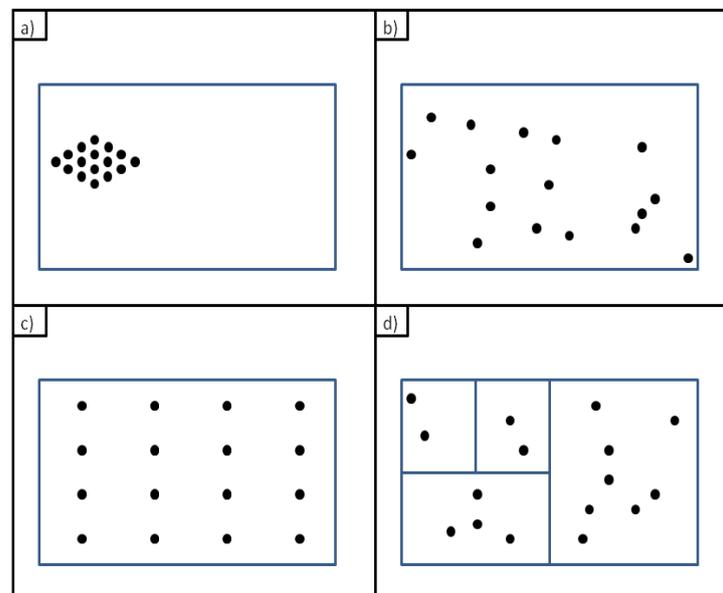


Figure 1.12 : Les différents plans d'échantillonnage : a) Ciblé ; b) aléatoire simple ;
c) Systématique ; d) aléatoire stratifié

L'échantillonnage **ciblé** (figure 1.12 a)) consiste à prélever des échantillons à un endroit précis correspondant à une zone à surveiller du fait d'une possible contamination ponctuelle ou d'un intérêt particulier dans cette zone. Le choix de la position des points d'échantillonnage se fonde uniquement sur un jugement d'expert. Cette approche a comme caractéristique de faire ressortir les plus forts niveaux de contamination sur un terrain donné et non pas la contamination moyenne du terrain. Il est impossible d'effectuer des traitements statistiques à l'échelle de la parcelle à partir de ces données. Il est donc à proscrire si l'on veut une représentativité à la parcelle.

L'échantillonnage **aléatoire simple** (figure 1.12 b)) se résume à prélever des échantillons à des endroits choisis au hasard sur la zone d'étude. Cette méthode n'introduit pas de biais de sélection dans le choix des échantillons puisque chaque point a la même probabilité d'être tiré au sort. Elle est utilisée pour étudier une contamination supposée homogène. Les coordonnées des points de prélèvements sont générées aléatoirement et reportées sur la zone d'étude. La mise en œuvre et l'interprétation des résultats d'analyse peuvent s'avérer laborieuses selon le tirage des points de prélèvement.

L'échantillonnage **systématique** (figure 1.12 c)) revient à prélever régulièrement des échantillons en utilisant comme repère une grille appliquée sur le sol. La grille peut être de forme variée : rectangulaire, triangulaire ou hexagonale. Selon les informations et la précision que l'on souhaite obtenir, par exemple une valeur moyenne ou une représentation de la distribution spatiale des concentrations en éléments trace, le nombre de points rapportés à la surface de la zone d'étude conditionne le pas de la grille. La détermination de la dimension des mailles est un élément de décision important dans l'élaboration d'un plan d'échantillonnage systématique. Par exemple, lors d'une campagne de caractérisation préliminaire, le maillage est généralement plus lâche que lors d'une caractérisation exhaustive, où une plus grande précision dans la localisation des espèces suivies est requise. Dans certains cas, la géostatistique peut permettre le calcul de la dimension optimale des mailles. La géostatistique est définie comme une méthode statistique pour l'analyse de données linéaires, corrélées dans l'espace. Pour permettre de calculer la dimension des mailles, cette méthode exige qu'elle soit incorporée au début d'un projet de caractérisation et qu'un nombre important d'analyses préliminaires soient effectuées pour vérifier la variabilité des échantillons.

L'échantillonnage **aléatoire stratifié** (figure 1.12 d)) consiste à prélever des échantillons selon une structure régulière. Il existe différentes configurations de maillage mais celle faite à partir d'un maillage carré est la plus courante. Le point de départ et l'orientation du maillage peuvent être choisis au hasard ou en tenant compte des renseignements disponibles (géométrie, obstacles, sens de migration soupçonnée d'une éventuelle contamination, ...). Cette méthode permet une couverture uniforme du terrain et elle est simple à réaliser. De plus, elle facilite la cartographie des données et l'interprétation des résultats d'analyse en permettant, par exemple, de tracer des profils longitudinaux et transversaux des niveaux de concentrations.

Ces approches peuvent également être combinées pour améliorer la qualité de l'information recueillie lors de l'échantillonnage. En effet, certaines zones de la parcelle peuvent nécessiter un pas d'échantillonnage plus resserré selon la variabilité des concentrations des éléments étudiés. Dans cette situation, il peut être intéressant par exemple d'associer l'échantillonnage ciblé sur une zone présentant de fortes hétérogénéités localisées avec un échantillonnage aléatoire stratifié (ou systématique) pour couvrir l'ensemble de la parcelle d'étude.

Le recours aux plans d'échantillonnage tels que ceux décrits dans cette partie s'avère être une des façons permettant de réaliser un diagnostic de contamination avant la récolte. Cependant, à l'échelle de la parcelle, aucun des protocoles décrits précédemment n'est universel, chacun étant appliqué par un institut particulier, pour un groupe de contaminants définis, ou une parcelle particulière [121,122]. De plus, les opérations de prélèvement des échantillons ayant été reconnues comme contribuant significativement à la qualité de mesure de la concentration en ETM et de l'analyse des données, on comprend dès lors mieux l'intérêt de disposer d'un protocole d'échantillonnage générique notamment en termes de végétaux cultivés et de filières concernées [124,128].

1.3.2 Investigation de la solution de sol

Comme il l'a été précédemment constaté, la détermination de la concentration totale ne permet pas de prédire le devenir des éléments dans l'environnement et en particulier leur transfert vers la plante. Il s'avère donc nécessaire d'appréhender leur bioaccessibilité et/ou biodisponibilité. A cette fin, les études doivent alors être focalisées sur la solution de sol, admise comme étant en contact direct avec les racines des plantes, avec deux objectifs :

- échantillonner cette solution de sol ;
- caractériser la distribution physico-chimique des ETM de façon à pouvoir déterminer les informations recherchées.

1.3.2.1 Echantillonnage

Il existe plusieurs techniques de collecte de la solution de sol dont les plus connues ont recours aux bougies poreuses, à la centrifugation ou à la lixiviation en batch [129–131]. Chacune de ces méthodes conduit à des informations différentes. Par exemple, les bougies poreuses ne permettent d'atteindre que la fraction des éléments susceptibles de passer à travers le fritté (0,45 μm). La centrifugation élimine toutes les particules (et les éléments associés) de taille et de densité telles qu'elles sédimentent sous l'effet de la force centrifuge. Un faible rapport liquide/solide (typiquement égal à 2) lors de la lixiviation en batch conduit à une forte concentration en colloïdes et donc à une concentration élémentaire plus grande, plutôt typique des eaux interstitielles ; un rapport plus grand (par exemple 10) conduit à un lixiviat dont la concentration élémentaire est plus faible et qui est représentatif d'un épisode pluvieux. La technique employée doit donc être choisie en fonction de ces éléments de connaissance [129]. La récupération de la solution de sol par lixiviation en batch est probablement l'une de celles les plus utilisées. Nous avons donc choisi d'y avoir recours, ce choix offrant également potentiellement la possibilité de comparer les résultats obtenus avec ceux d'autres études. De plus, c'est une technique simple à mettre en œuvre et répétable. Enfin, elle demande peu de moyens et moins de maintenance que les autres. Il existe cependant peu de renseignements dans la littérature au sujet des protocoles de lixiviation. Les normes et textes officiels ne concernent essentiellement que la lixiviation des déchets [132]. Néanmoins, la norme française NF ISO 1772 (2008) rassemble les recommandations de préparation des lixiviats [133] (cf. Chapitre 2 : Matériels et méthodes).

D'un point de vue pratique, la lixiviation en batch consiste à extraire, par voie liquide, des analytes fixés sur une surface solide [134,135]. Elle peut intervenir de façon naturelle sur le terrain par exposition du matériau à l'infiltration naturelle (précipitations) et conduit alors à la mobilisation notamment des ETM. Voilà pourquoi elle est considérée comme un processus intéressant de collecte de la solution de sol, simulant au laboratoire un phénomène intervenant sur le terrain. Elle se résume alors à mélanger le sol avec une solution d'extraction.

La solution de sol, ainsi représentée par le lixiviat, se divise en trois fractions qu'il est important de considérer dans la suite de l'analyse : la fraction particulaire, la fraction colloïdale et la fraction dissoute. Les limites entre les différentes fractions ont été fixées en fonction de la taille des entités les constituants [136] (tableau 1.8).

Tableau 1.8 : Séparation des fractions particulaire, colloïdale, dissoute

Fraction	Taille
Particulaire	> 1 μm
Colloïdale	Entre 1 nm et 1 μm
Dissoute	< 1 nm

Dans la fraction particulaire, les ETM sont adsorbés à la surface des particules (organiques et minérales) ou précipités. Dans les fractions dissoute et colloïdale, les ETM sont présents sous forme d'ions libres ou sous forme de complexes plus ou moins stables avec des ligands inorganiques (OH^- , CO_3^{2-} , nanoparticules d'argiles ou d'oxy-hydroxydes...) ou organiques (carbone organique dissous (COD) et colloïdal (COC)) [137]. Parmi les ligands organiques très réactifs vis à vis des ETM, les acides fulviques et humiques occupent une place privilégiée, de par leur omniprésence dans tous les compartiments environnementaux [138,139].

1.3.2.2 Les méthodes de fractionnement

Afin de pouvoir tenir compte des 3 fractions présentes dans la solution du sol, il est nécessaire de l'appréhender selon une démarche analytique dite de fractionnement. Cette démarche considère la taille (dissous, colloïdal, particulaire) et/ou l'état de liaison (libre, labile, non labile) des espèces chimiques étudiées, dans le cas présent les ETM. L'objectif analytique est alors la détermination de la distribution physico-chimique des ETM, prérequis indispensable à la détermination de leur bioaccessibilité et/ou biodisponibilité.

Les différentes méthodes utilisées pour appréhender le fractionnement d'un élément sont dites opérationnelles, c'est-à-dire que les informations obtenues dépendent des conditions opératoires appliquées. Ces méthodes sont de type :

- physique : Ce sont typiquement des méthodes apportant des informations sur la taille des entités contenant l'élément considéré. Elles peuvent également apporter des informations sur la composition chimique des phases porteuses de l'élément considéré, ainsi que sur leur structure (cristalline, amorphe, agrégée...) [140,141].

- ou chimique et physico-chimique : Elles fournissent les informations relatives à la forme (libre, labile ou non labile) de l'élément, à sa capacité à être mobilisé (libéré de la phase solide dans la phase aqueuse), aux sites de sorption (nature chimique). Comme les méthodes physiques, certaines peuvent également apporter des informations sur la composition chimique des phases porteuses de l'élément considéré, et sur la réactivité relative à l'élément [130,142–144].

Dans les eaux, et dans la solution de sol plus particulièrement, l'objectif des méthodes de fractionnement est de différencier les groupes d'espèces labiles et non labiles présentes dans la fraction dissoute, afin d'évaluer la bioaccessibilité et la biodisponibilité des ETM. La spéciation de l'élément n'est alors pas connue et non nécessaire par rapport à l'objectif. De plus, elle pourrait s'avérer délicate à déterminer pour un grand nombre d'ETM, et l'effort analytique serait trop important par rapport à la pertinence de cette détermination. A l'heure actuelle, les principales méthodes utilisées sont la « Diffusive Gradient in Thin Film » (DGT) et l'électrochimie (seuls les cations libres (M^{n+}) et les complexes labiles (ML) donnent un signal) [145–147]. Elles sont comparativement présentées dans le tableau 1.9.

Tableau 1.9 : Comparaison des méthodes de fractionnement les plus courantes

	Avantages	Inconvénients
Diffusive Gradient in Thin Film (DGT)	<ul style="list-style-type: none"> - Permet une étude <i>in situ</i> - Evite les effets de matrice - Permet l'extraction des analytes contenus dans la solution de sol 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessité d'un sol humide - Performances limitées lors de pH extrêmes - Variation de la force ionique, température et pH peuvent affecter les résultats
Electrochimie	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité élevée - Analyse directe 	<ul style="list-style-type: none"> - Analyse uniquement des solutions - Possibilité d'interférences à l'électrode

La technique par DGT repose sur les propriétés de diffusion des espèces libres ou faiblement complexées à des ligands depuis le sol [148]. Son principal avantage est la possibilité de mise en œuvre *in situ*. La DGT est constituée d'une résine échangeuse d'ions qui joue le rôle de puits pour les ETM. Elle est séparée du sol par un gel de diffusion dans lequel l'ion libre et les complexes se déplacent par diffusion [148]. L'affinité de la résine pour les ETM est suffisamment forte pour induire une concentration quasiment nulle à la surface résine/gel et, en conséquence, un gradient de diffusion dans le gel et dans le sol à la surface du système DGT - sol [149]. La concentration en ETM dans la résine se calcule en utilisant l'équation :

$$C_{DGT} = \frac{m \times \Delta_g}{D_g \times A \times t}$$

avec, m , la masse (g) d'ETM considérés adsorbés sur la résine, Δ_g , l'épaisseur (m) du gel de diffusion, D_g , le coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) de l'ETM considéré dans le gel de diffusion, A , la surface (m^2) de contact DGT - sol et t , le temps (s) de contact DGT - sol.

Après un temps d'exposition sélectionné, la DGT est retirée du sol et l'élément fixé sur la résine est élué (acide fort) puis analysé. La concentration obtenue correspond à la fraction labile des ETM initialement présents dans le sol.

Les méthodes électrochimiques conduisent à la concentration des ETM électrolytiques. Ces méthodes ne nécessitent aucun prétraitement des échantillons de sol, ce qui n'est pas le cas d'autres techniques analytiques [147]. Ayant été l'objet de notre étude, elles sont plus particulièrement abordées dans les paragraphes suivants.

1.3.3 Intérêt de l'électrochimie analytique

Parce qu'elles sont basées sur les relations existantes entre des informations chimiques (concentration, complexation, ...) fondamentales pour décrire l'état d'un système et des paramètres physiques facilement mesurables (intensité, potentiel, ...), les techniques électrochimiques sont très largement employées dans des domaines d'application variés tels que le suivi environnemental ou les analyses en milieu biologique [150].

1.3.3.1 Principe

L'électrochimie englobe des méthodes qualitatives et quantitatives qui permettent de différencier les espèces labiles et non labiles à conditions qu'elles soient électroactives⁴ [151]. Les processus électrochimiques mis en jeu ont lieu à l'interface électrode/solution et les espèces ainsi détectées sont définies comme électrolytiques, souvent associées aux formes biodisponibles [152]. Les méthodes électrochimiques semblent donc adaptées pour évaluer un éventuel risque de contamination de la plante par les ETM contenus dans la solution de sol.

1.3.3.2 Méthodes électrochimiques

Il existe de nombreuses techniques électrochimiques. Leur distinction se fait selon la variable suivie lors de l'analyse, généralement le temps, l'intensité ou le potentiel. Les procédés employés sont principalement potentiométriques ou potentiostatiques. Parmi les techniques potentiométriques, la chronopotentiométrie est la plus citée pour le dosage des ETM [153]. Elle est décrite dans la littérature comme une technique étant peu affectée par les phénomènes de passivation liés à la présence de matière organique en solution [154]. Elle est cependant moins sensible que les techniques potentiostatiques les plus performantes dont les techniques

⁴ Une espèce est dite électroactive lorsqu'elle subit un changement d'oxydation ou de réduction par l'intermédiaire d'un transfert de charge

voltammétriques [146,155]. Ces dernières permettent la détection multi-élémentaires des ETM jusqu'à des teneurs de l'ordre de quelques ng L^{-1} [156–158].

Les techniques voltammétriques consistent à appliquer une variation de potentiel à l'électrode de travail et à enregistrer le courant résultant de la réaction d'oxydation ou de réduction des espèces électroactives. La technique voltammétrique la plus répandue est la voltammétrie de redissolution anodique (ASV, Anodic Stripping Voltammetry) [146]. Le principe de cette technique repose sur la concentration des espèces électroactives à l'électrode sous l'influence d'un potentiel réducteur, puis à la libération en solution des différentes espèces réduites par un balayage des potentiels vers des valeurs plus positives. Les réactions d'oxydation lors de cette redissolution anodique créent un courant relié directement à la concentration en espèces électroactives.

Cette technique est relativement sensible mais les limites de détection peuvent être considérablement abaissées lorsque ces techniques voltammétriques sont pulsées. Elles consistent à surimposer des impulsions de potentiels à intervalle de temps réguliers à une rampe de potentiels particulières [159]. La Square Wave Anodic Stripping Voltammetry (SWASV) est souvent employée pour sa sensibilité supérieure aux autres techniques ($< \mu\text{g L}^{-1}$) [150,160]. C'est une méthode impulsionnelle pour laquelle le potentiel varie en fonction du temps selon une progression par paliers successifs superposés à une succession d'impulsions de même durée et de signe opposés. La hauteur et/ou la surface des pics obtenus est(sont) alors proportionnelle(s) à la concentration en analyte labile.

1.3.3.3 Electrodes

Les électrodes de travail, sièges des réactions électrochimiques souhaitées, sont de différents types et peuvent être modifiées en surface selon l'application choisie [161–164]. Au sein du LCABIE, des électrodes sérigraphiées à base de carbone sont développées depuis plusieurs années pour la détection des ETM en milieu aqueux [164,165]. La sérigraphie est une technique qui permet d'obtenir rapidement et à bas coût un grand nombre d'électrodes ayant une géométrie préalablement déterminée. Ces électrodes peuvent facilement être modifiées en surface et permettent d'obtenir une répétabilité analytique satisfaisante [164,166,167].

Le choix du métal déposé pour la modification de l'électrode dépend du composé d'intérêt à analyser. En effet, chaque électrode possède un domaine d'électroactivité qui lui est propre. Le domaine d'électroactivité représente la gamme de potentiel pour laquelle la réduction et l'oxydation du composé d'intérêt est observable. En milieu aqueux, la limite cathodique est fixée par la réduction de l'eau et la limite anodique par l'oxydation du métal déposé ou du solvant (eau).

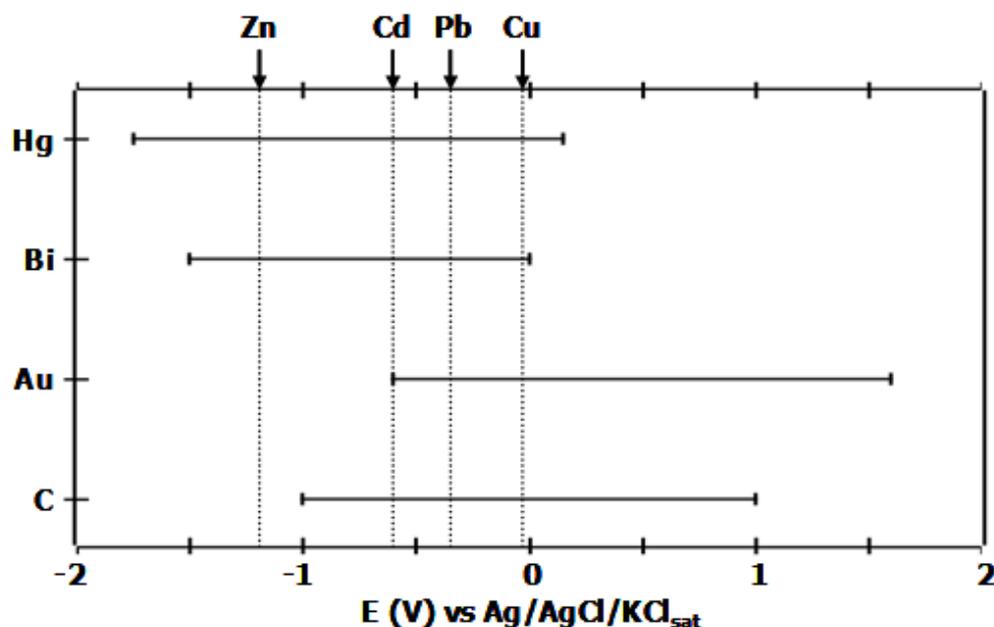


Figure 1.13 : Domaines d'électroactivité de différents matériaux d'électrode en milieu aqueux, adapté de [168]

La figure 1.13 illustre la possibilité d'effectuer les analyses multi-élémentaires des ETM en utilisant une électrode modifiée en mercure (Hg), en bismuth (Bi), en or (Au) ou en carbone (C). Cependant, chacun de ses matériaux n'offre pas les mêmes performances analytiques. Les électrodes de mercure se distinguent des autres matériaux par leur capacité à détecter les éléments métalliques présents à l'état de trace dans des milieux de pH et de composition très différents [169,170]. L'emploi d'une électrode de bismuth est envisageable mais n'offre pas la même sensibilité que le mercure. De plus, elle nécessite un pH inférieur à 5 ($\text{pH} < \text{au pH}$ de la solution de sol (lixiviat)) afin d'éviter l'oxydation du bismuth en Bi_2O_3 , forme non électroactive [161]. L'emploi du bismuth impliquerait alors une modification préalable du lixiviat avant analyse et donc une modification de la spéciation des ETM en solution.

L'emploi d'une électrode d'or permet d'atteindre des limites de détection satisfaisante ($< \mu\text{g L}^{-1}$) pour le cadmium et le plomb mais la faible résolution des pics rend le traitement des données difficile [162]. Enfin, l'emploi d'une électrode de carbone nécessite une acidification préalable du milieu [163,171]. Cependant, une solution de pH inférieur à 2 peut entraîner une détérioration de l'électrode [172].

Ainsi l'emploi d'électrodes sérigraphiées à base de carbone modifiées par du mercure semble être particulièrement adaptés à la réalisation d'analyses multi-élémentaires des ETM dans des solutions de sols ou des lixiviats.

Chapitre 2: Matériels et méthodes

Ce chapitre présente les différentes informations concernant les méthodes utilisées : la préparation des échantillons de sol et de plantes, les analyses de caractérisation physico-chimique (pH, capacité d'échange cationique, carbone organique, etc...), les méthodes de quantification des ETM en total ainsi que leurs fractionnements chimiques par électrochimie. Les méthodes utilisées pour les analyses statistiques sont également décrites.

Dans un premier temps, le site d'étude retenu pour le prélèvement des différents échantillons de sol et de végétaux est présenté.

2.1 Site d'étude

Le choix du site d'étude s'est porté sur deux parcelles appartenant à l'Unité Expérimentale d'Agronomie (UE 0802) de l'INRA d'Auzeville-Tolosane. Ce site présente plusieurs avantages :

- être proche des sites d'analyse des partenaires-animateurs du projet ;
- être facilement accessible ;
- disposer de plusieurs parcelles cultivées en blé et tournesol, végétaux cibles de l'étude ;
- être particulièrement bien documenté et équipé.

2.1.1 Choix des parcelles

Deux parcelles, nommées C6 et CL, ont été sélectionnées sur le site d'étude. Elles sont situées à Auzeville-Tolosane, à environ 10 kilomètres au sud-est de Toulouse (Midi-Pyrénées) et localisées sur la figure 2.1. Les parcelles sont positionnées entre le canal du Midi et l'autoroute des deux mers (A61). La région toulousaine offre un climat océanique tempéré. Les saisons estivales sont sèches et douces tandis que l'hiver est relativement froid et humide. Au cours de la période entre 1947 et 2011, la moyenne des températures minimales et maximales valaient 8,7 et 17,8 °C respectivement et le cumul des précipitations annuelles 629 mm [173].

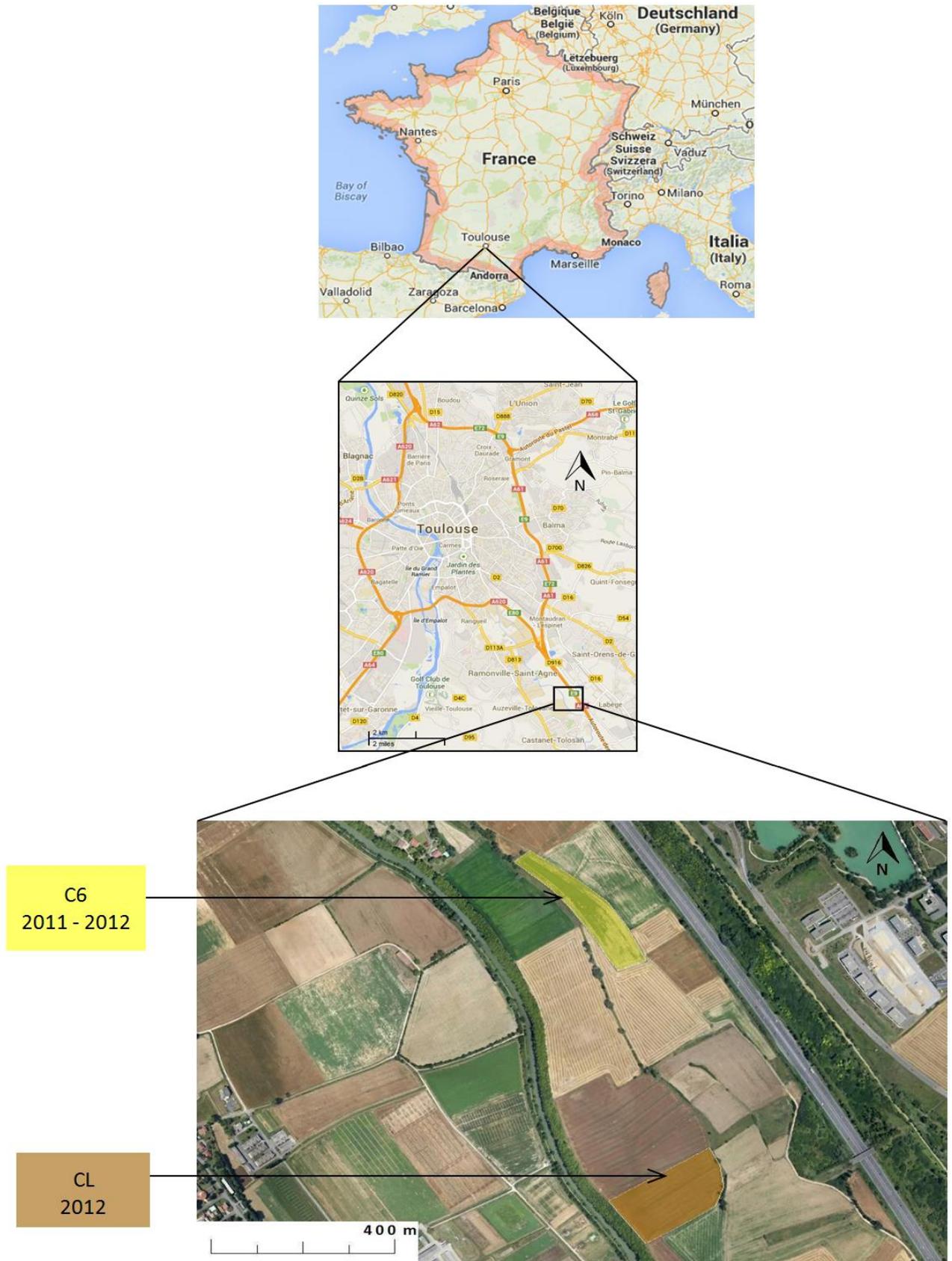


Figure 2.1 : Localisation du site et des parcelles d'étude situés à Auzerville-Tolosane, France

L'historique des cultures de chacune des deux parcelles est connu. Les cultures semées sur chaque parcelle changent chaque année. Elles sont présentées dans le tableau 2.1 pour la période 2008 - 2013.

Tableau 2.1 : Cultures semées sur les parcelles d'étude

Code parcelle		Année					
		2008	2009	2010	2011	2012	2013
Culture	C6	Blé dur	Orge	Chanvre	Blé dur	Tournesol	Blé dur
	CL	Tournesol	Sorgho	Tournesol	Tournesol	Blé dur	Tournesol

De même, l'historique des différents traitements et amendements apportés sur les deux parcelles durant cette même période est connu et conservé par l'unité. Afin de valider le choix des parcelles et de procéder dans le même temps à une vérification des outils d'analyse (niveaux de concentration compatibles avec la limite de quantification analytique), un échantillonnage de blé au stade tallage et du sol correspondant a été réalisé au printemps 2011 sur la parcelle C6.

2.1.2 Equipement de prélèvement

Les outils de prélèvement (sol et plantes) utilisés ont été directement fournis sur site par l'unité. De plus, les cartes des parcelles ont été préparées par l'unité et les points de prélèvement ont été placés aléatoirement au LCABIE selon le protocole développé au moyen d'un outil de générateur de coordonnées aléatoires via Microsoft Excel. Les cartes, pourvues des points de prélèvement et de leurs coordonnées respectives, ont été renvoyées à l'UE 0802 et enregistrées dans un GPS Trimble R6 GNSS avec précision Real Time Kinematic (RTK) (société TOPO+, Châteaubriant, France). Les sondages de sol ont été réalisés au moyen d'une tarière Edelman, de diamètre 7 cm pour une hauteur de 120 cm et (société SDEC, Reignac sur Indre, France). La hauteur de la tête de tarière (permettant le sondage) est de 20 cm. Ainsi, au niveau de chaque point de prélèvement, deux sondages successifs ont été effectués afin de réaliser un prélèvement de sol sur l'horizon de 0 - 30 cm. Pour cela, un premier sondage a été effectué jusqu'à la profondeur maximale autorisée par la tête de tarière puis le second a été réalisé jusqu'à atteindre la mi-tête de tarière. Les sols issus de ces deux sondages successifs ont été regroupés pour constituer un échantillon de sol unique correspond à un point de prélèvement.

Avant chaque prélèvement, la tête de tarière a été nettoyée sur sa partie supérieure et latérale afin d'éviter toute contamination d'un échantillon de sol à un autre.

Les épis/capitules ont été prélevés sur champ au moyen d'un couteau en céramique.

2.1.3 Stratégie d'échantillonnage

Dans chaque parcelle, une placette de prélèvement a été mise en place. La placette a été découpée en sous placettes, chaque sous placette contenant un point de prélèvement.

2.1.3.1 Echantillonnage

Les échantillons de végétaux et de sol ont été prélevés selon deux protocoles, en accord avec les différents partenaires du RMT et du projet CASDAR :

- La grille de prélèvement issue du protocole du Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS) [174] : ce protocole se veut être représentatif des végétaux et des sols correspondants aux plantes prélevées à l'échelle de la placette de dimensions fixées (et non pas de la parcelle ≡ échantillonnage ciblé).

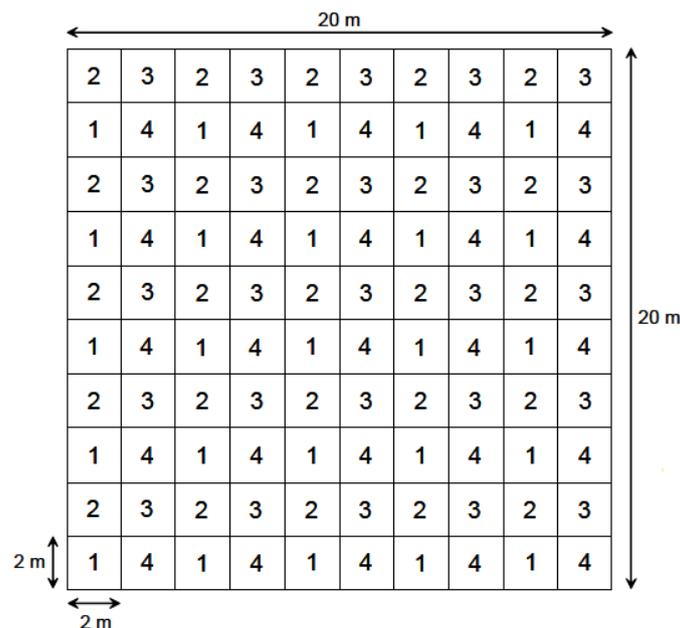


Figure 2.2 : Placette de prélèvement systématique issue du RMQS

Comme illustré sur la figure 2.2, la placette couvre une surface de 20 m x 20 m et est divisée en 100 sous placettes de 4 m² chacune (2 m × 2 m). Les prélèvements ont été réalisés en suivant un plan d'échantillonnage systématique. Lors de la première campagne de mesure, les prélèvements ont été réalisés au niveau des 25 sous placettes portant le numéro 1. Lors des campagnes ultérieures, ils ont été et/ou seront réalisés respectivement dans les sous placettes portant les numéros 2, puis 3 et puis 4.

Lors de chaque campagne, 8 épis ont été prélevés dans chacune des 25 sous placettes correspondantes. 6 de ces épis ont permis la réalisation de 3 échantillons composites permettant d'évaluer la contamination moyenne en ETM au sein de la placette. Les 2 épis restants pour chaque sous placette ont été utilisées pour former un échantillon représentatif de chaque point de prélèvement.

- Le Protocole d'Echantillonnage Aléatoire Stratifié (PEAS) : Il s'agit de celui que nous avons défini, puis évalué dans ce travail de thèse par des outils statistiques permettant de vérifier sa représentativité à l'échelle d'une parcelle. L'échantillonnage couvre la totalité de la surface de la parcelle selon un plan dont le choix est expliqué et détaillé dans la partie résultats. Les échantillons ont été prélevés, traités et analysés afin d'obtenir une information moyenne et une information spatiale concernant la concentration en ETM (Annexe 1). Le nombre de grains/épis à prélever par point de prélèvement permettant d'en assurer sa représentativité a également été étudié. L'étude est présentée dans le chapitre 3.

2.1.3.2 Conditionnement

Chaque échantillon de sol prélevé a été conditionné au champ dans des sachets en polyéthylène. Les végétaux ont été prélevés et placés dans des sacs plastiques (un sac par point de prélèvement). L'ensemble des sachets et des sacs issus de l'échantillonnage des sols et des plantes a été regroupé dans deux cartons respectifs puis placé dans une voiture climatisée à 20 °C. Le carton contenant les plantes a été directement acheminé à l'USRAVE à Bordeaux et celui des sols au LCABIE à Pau (64). Le traitement de ces lots d'échantillons a entièrement été réalisé dans chacun des deux laboratoires.

2.1.3.3 Calendrier

Des prélèvements de végétaux et de sol correspondant ont été effectués en juin 2011 sur la parcelle C6 contenant du blé dur. En 2012, les prélèvements ont été effectués sur la même parcelle C6 cultivée en tournesol et sur la parcelle CL cultivée en blé dur. Ces prélèvements ont été effectués au stade pré-récolte (2 jours avant la récolte). Le calendrier des prélèvements est présenté dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Calendrier des campagnes de prélèvements sur les parcelles C6 et CL

Date	Parcelle	Culture	Stade	Prélèvement
Mars 2011	C6	Blé	Tallage	25 plantules ⁵
Juillet 2011	C6	Blé	Pré-récolte	900 épis
Juillet 2012	CL	Blé	Pré-récolte	700 épis
Aout 2012	C6	Tournesol	Pré-récolte	43 capitules

Les premières campagnes de prélèvement ont fait l'objet de collectes très abondantes d'épis de blé et de capitules de tournesol afin d'effectuer des tests de représentativité dans le but de réduire la prise d'échantillon à la parcelle et la prise d'essai au laboratoire pour les prélèvements futurs.

2.2 Préparation des échantillons

Toutes les opérations effectuées au laboratoire ont été réalisées selon les bonnes pratiques de laboratoire [175]:

Les analyses ETM, les préparations des solutions ainsi que toutes les dilutions ont été effectuées en utilisant de l'eau ultrapure (système MilliQ, Millipore).

Tout le matériel utilisé a été préalablement rincé à l'eau distillée puis disposé dans des bains à ultrasons pendant 3 h. Il a ensuite été placé dans des bains d'acide nitrique à 10 % pendant 24 h puis rincé abondamment à l'eau distillée puis à l'eau MilliQ.

⁵ Plantule ou jeune pousse : Jeune plante qui apparaît après la germination de la graine (stade précoce)

2.2.1 Séchage et broyage

Dès leur acheminement au laboratoire, les échantillons de grains et de sols ont été séchés à l'étuve pendant 48 h à une température de 50 °C. Des suivis ont permis de vérifier que les masses des échantillons étaient constantes avant leur retrait de l'étuve. Une fois séchés, les échantillons ont été broyés. Cette étape de broyage est importante car elle permet d'atteindre une granulométrie facilitant l'homogénéisation de l'échantillon ainsi que d'obtenir une prise d'essai représentative de l'ensemble de l'échantillon initial. De même, cette granulométrie favorise l'action des acides sur l'échantillon lors des étapes de dissolution ou de digestion (permettant de faire passer l'échantillon en solution). Plusieurs types de broyeurs existent dans la littérature, chacun d'entre eux étant plus adapté selon la nature de l'échantillon, la quantité d'échantillon à broyer et la nature des contaminants étudiés. En effet, pour être optimale, l'étape de broyage doit être rapide, efficace et non contaminant.

Concernant les sols, le broyeur utilisé a été un vibro-broyeur de laboratoire modèle MM200 (figure 2.3 a)) (Fisher Bioblock Scientific, Belgium). Il est constitué d'oxyde de zirconium (bols et billes) et est conçu pour broyer très finement de petits volumes d'échantillons de l'ordre de 5 mL. Il permet de broyer rapidement deux échantillons à la fois. De plus, il s'agit d'un mode de broyage en système fermé qui permet de récupérer quantitativement les échantillons.

Les grains ont été broyés avec un broyeur à couteaux de type M20 (moulin à café) (figure 2.3 b)) provenant de IKA. Ce type de broyeur est plus adapté pour des échantillons plus petits, secs, durs et cassants. La cuve et le couvercle sont constitués d'acier et les couteaux sont en carbure de tungstène (WC1) [176].



Figure 2.3 : Photographie des types de broyeurs utilisés (a) MM200 pour les sols (b) M20 pour les grains

Les échantillons de sol et de végétaux, préalablement séchés et broyés, ont été conservés à température ambiante, dans des flacons en polyéthylène hermétiques, à l'abri de la lumière directe.

2.2.2 Produits chimiques et matériaux de référence

2.2.2.1 Au LCABIE :

Des solutions standards d'arsenic, de cadmium, de cuivre, de plomb et de zinc, concentrées à $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (pureté > 99 %) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), ont été utilisées pour effectuer les étalonnages. Les solutions d'indium et de bismuth, concentrées à $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (pureté > 99 %) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) ont été utilisées en tant qu'étalons internes. Les échantillons de sol ont été digérés par un mélange d'acide nitrique HNO_3 (70 %), d'acide fluorhydrique HF (60 %) et de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (30 %) (Atlantic laboratory, Bruges, Belgium). Les dilutions et les lixiviations ont été effectuées avec de l'eau dé-ionisée, de résistivité égale à $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, produite par un système MilliQ (Millipore system, USA). Un sol de référence certifiée loam soil ERM-CC141 (The Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Retieseweg, B-2440, Geel, Belgium) a été utilisé pour les analyses d'éléments trace métalliques (ETM) dans les sols. Enfin, afin de valider les analyses effectuées sur les solutions de sols, un échantillon de référence certifiée d'eau de rivière SRM 1643e (National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, MD, USA) a été utilisé.

2.2.2.2 A l'USRAVE :

De l'acide nitrique HNO_3 (65 %) et de l'acide fluorhydrique (48 %) (Bayker Analyzed, Devanter, Hollande) ont été utilisés lors des minéralisations. Les solutions d'étalonnage des appareils ont été préparées par pesée à partir de Titrisols (Merck S.A., Fontenay sous bois, France). L'eau utilisée pour la préparation des solutions étalons et dilutions d'échantillons a été de l'eau bi-permutée distillée de résistance contrôlée et supérieure à $0,6 \text{ M}\Omega$. Un échantillon de maïs de référence certifiée V463 (Unité de Service et de Recherche en Analyses Végétales et Environnementales (USRAVE), Bordeaux, France) a été utilisé pour les analyses d'ETM dans les végétaux [176].

2.2.3 Minéralisation

Une minéralisation efficace doit être complète et ne doit pas entraîner de pertes par adsorption sur les flacons de minéralisation contenant l'échantillon à minéraliser ni de pertes par volatilisation. De plus, elle ne doit engendrer aucune contamination de l'échantillon.

2.2.3.1 Minéralisation des sols

Afin d'évaluer les quantités totales en ETM dans les sols, une minéralisation des sols a été effectuée en milieu acide et oxydant dans un four à micro-ondes en système fermé (Ethos Touch Control, Milestone) permettant de digérer 10 échantillons de sol simultanément par cycle de minéralisation.

0,250 g de sol a été digéré dans un milieu acide et oxydant composé de 6 mL d'acide nitrique HNO_3 , 2 mL d'acide fluorhydrique HF et 2 mL de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Une solution de blanc de minéralisation a été préparée dans les mêmes proportions, sans ajout de sol, puis digérée dans les mêmes conditions que les échantillons. L'acide nitrique, étant donné son fort pouvoir oxydant, permet la minéralisation de l'élément et la dissociation de tout complexe ou toute particule inorganique. L'acide fluorhydrique permet de libérer l'élément combiné à la silice et le peroxyde oxygène permet de libérer l'élément combiné à la matière organique.

Le cycle de minéralisation s'est déroulé en deux étapes : La première étape consiste à une augmentation linéaire de la température de 0 °C à 200 °C pendant 20 minutes avec une puissance constante de 1000 W. La deuxième étape consiste à une stabilisation de température à 200 °C pendant 20 minutes avec une puissance de 1000 W. Afin de minimiser les risques de contamination, un cycle de lavage de la vaisselle relative au micro-onde (matras), constituée en PolyTetraFluoroEthylene (PTFE), a été effectué. Pour cela, un mélange de 5 mL d'acide nitrique et 5 mL d'eau dé-ionisée (eau MilliQ) a été introduit dans les matras et le cycle de lavage a été lancé. Il consiste à une augmentation linéaire de la température de 0 °C à 200 °C pendant 10 minutes avec une puissance constante de 1000 W puis à une stabilisation de température à 200 °C pendant 10 minutes avec une puissance de 1000 W. Les minéralisats et les blancs de minéralisation ont été conservés dans une armoire à acide ventilée à température ambiante.

2.2.3.2 Minéralisation des grains

La minéralisation des échantillons de grains a été effectuée par voie sèche à l'USRAVE. 1 g d'échantillon de grains secs et broyés a été mis à calciner dans un four à 480 °C pendant 5 h. Les cendres ont ensuite été recueillies et dissoutes en plusieurs étapes dans de l'acide nitrique (HNO₃) concentré. La solution obtenue a été filtrée sur papier filtre. Les cendres du filtre ont été mises à calciner dans le four à une température de 550 °C pendant 2 h. Elles ont ensuite été recueillies et dissoutes dans de l'acide fluorhydrique (HF). Après filtration, la solution obtenue a été recueillie dans une fiole jaugée de 100 mL contenant le premier minéralisant. La solution minéralisée globale a enfin été complétée à 100 mL avec de l'eau distillée [176].

2.3 Caractérisation physico-chimique des sols

La caractérisation physico-chimique des sols a été effectuée préalablement à toute analyse d'ETM. Elle a été réalisée par le Laboratoire d'Analyses des Sols d'Arras (LAS d'Arras) conformément aux méthodes standardisées françaises (AFNOR, 1999 ; ISO, 1999) listées ci-après :

- Le fractionnement granulométrique a été effectué sur les échantillons de sol sec après décarbonatation selon la norme NF X 31-107 ;

- Le pH du sol a été mesuré après mise en suspension de l'échantillon de sol sec et broyé dans de l'eau avec un rapport 1/5 (v/v) (NF ISO 10390) ;

- La Capacité d'Echange Cationique (CEC) du sol a été déterminée par échange de cations dans une solution de chlorure de cobaltihexammine. La quantité de cobaltihexammine restant en solution a été dosée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 475 nm et a permis de calculer la quantité de cobaltihexammine fixée sur l'échantillon (i.e. la CEC) (NF ISO 23470) ;

- Le taux de carbone organique a été déterminé par combustion sèche du sol à 1000 °C. La méthode repose sur la transformation du carbone total en dioxyde de carbone CO₂ après décarbonatation ou sans décarbonatation mais après un dosage préalable des carbonates. La quantité de gaz carbonique formée a été déterminée par un catharomètre après séparation chromatographique (NF ISO 10694, Méthode Dumas) ;

- La teneur en azote (organique et minéral) a été mesurée par combustion sèche du sol à 1000 °C au moyen d'un catharomètre après séparation chromatographique (NF ISO 13878) ;

- Le phosphore assimilable a été déterminé par dosage spectrométrique du phosphore soluble dans une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (NF ISO 11263, Méthode Olsen).

2.4 Détermination de la concentration totale en ETM

2.4.1 Principe de fonctionnement des instruments utilisés

2.4.1.1 Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif : ICP-MS

L'ICP-MS est une méthode basée sur l'ionisation des atomes contenus dans un échantillon par un plasma d'argon (figure 2.4). Un plasma est un état de la matière constitué d'ions et d'électrons. Dans un premier temps, l'échantillon, préalablement mis en solution, est prélevé via un fin tube capillaire couplé à une pompe péristaltique. Il est ensuite entraîné vers le nébuliseur dans lequel il est transformé en aérosol, composé de fines gouttelettes, au moyen d'un flux d'argon. L'aérosol est désolvaté, vaporisé, dissocié, atomisé et ionisé dans le plasma. Les ions formés sont ensuite introduits dans le spectromètre de masse quadripolaire par l'intermédiaire d'une interface. Cette interface a pour but de prélever les ions formés dans l'axe du canal du plasma et de passer de la pression atmosphérique à une faible pression compatible avec le fonctionnement du spectromètre de masse ($< 10^{-3}$ Pa). L'interface est constituée de deux cônes percés en Nickel pur entre lesquels un vide primaire est effectué (10^{-2} Pa) et permettant d'évacuer la chaleur produite par le plasma. Les ions sont ensuite focalisés vers le spectromètre quadripolaire par l'intermédiaire d'un système de lentilles ioniques. Le quadripôle est constitué de quatre barreaux disposés longitudinalement et reliés électriquement par paires opposées. Un courant alternatif est alors appliqué et permet une séparation des analytes en fonction de leur rapport masse/charge (M/Z). Enfin, un collecteur multicanaux équipé d'un préamplificateur enregistre le signal en nombre d'impulsion des ions (nombre de coups). Pour un ion de rapport M/Z donné, correspondant à un isotope particulier, le nombre de coups est mesuré et enregistré grâce à un logiciel de traitement informatique [177,178].

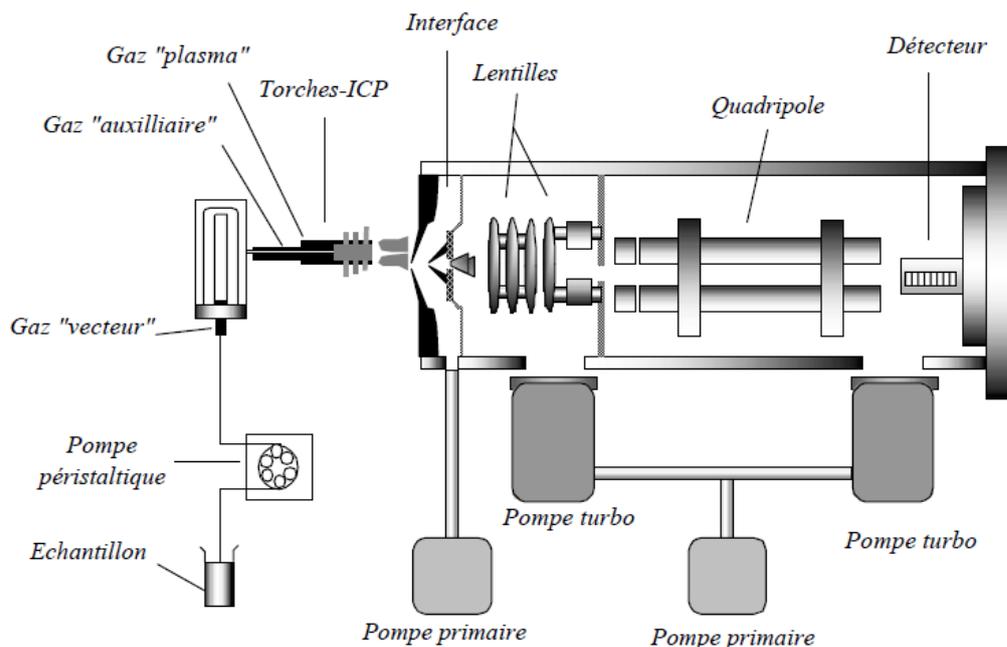


Figure 2.4 : Schéma type d'un ICP-MS [177]

2.4.1.2 Spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif : ICP-AES

L'ICP-AES est une méthode basée sur l'excitation des atomes contenus dans l'échantillon dans/par un plasma d'argon. Le retour à l'état fondamental, ou dans un état de moindre excitation des atomes de l'échantillon se fait via l'émission de photons dans l'UV/Visible, avec une longueur d'onde propre à l'atome considéré. Un système optique dispersif (monochromateur) permet de disperser les radiations émises par un réseau (figure 2.5). La comptabilisation du nombre de désexcitation radiative à une longueur d'onde spécifique de l'élément à doser par un photomultiplicateur permet d'accéder, après calibrage de l'appareil, à la concentration de l'espèce dans l'échantillon [179].

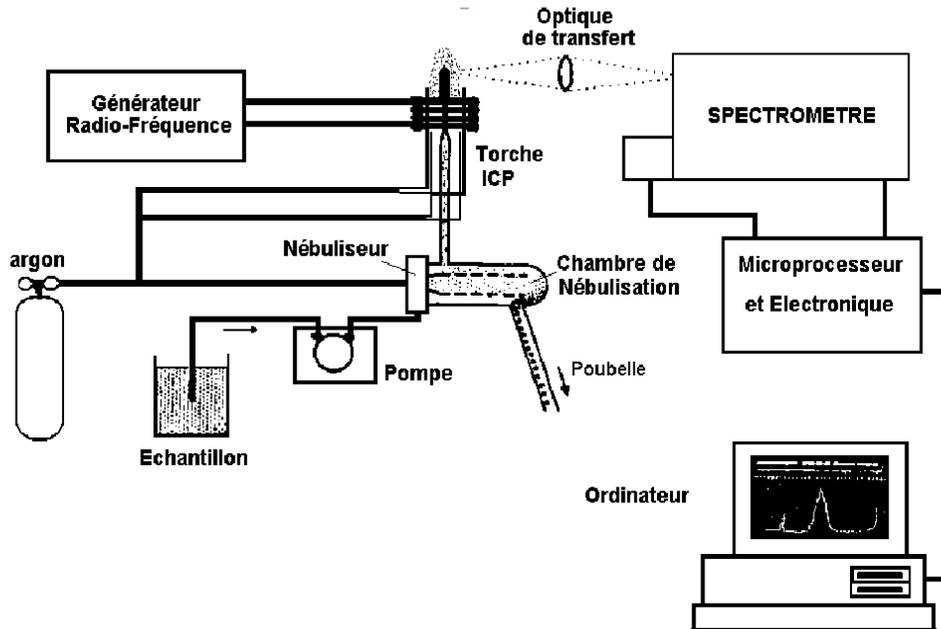


Figure 2.5 : Schéma type d'un ICP-AES [179]

Dans le cas particulier d'une analyse d'éléments en total par ICP-MS ou ICP-AES d'échantillons contenant de l'acide fluorhydrique, des précautions sont nécessaires afin de ne pas altérer la torche et la chambre de nébulisation, tous deux constitués de quartz et pouvant de ce fait être attaqués par HF. Pour éviter ce phénomène, ils ont été remplacés par un autre matériau, inerte vis-à-vis des analytes et d'HF. Ainsi, un kit HF, constitué d'une torche et d'une chambre de nébulisation en Teflon-PerFluoroAlkoxy (PFA) a été utilisé.

2.4.2 Préparation des échantillons et procédure d'étalonnage

2.4.2.1 Analyse des échantillons de sol minéralisés

Les minéralisats et les blancs ont été dilués d'un facteur 50 par ajout d'eau MilliQ et filtrés à 0,45 µm avant analyse. Deux étalons internes, le bismuth (^{209}Bi) et l'indium (^{115}In), ont été ajoutés en quantités connues aux minéralisats et aux blancs dilués afin de corriger toute dérive instrumentale au cours de la série de mesure. L'arsenic (^{75}As), le cadmium (^{112}Cd et ^{114}Cd), le cuivre (^{63}Cu et ^{65}Cu), le plomb (^{204}Pb et ^{206}Pb) et le zinc (^{64}Zn et ^{66}Zn) ont été quantifiés par ajouts dosés afin de s'affranchir de potentiels effets de matrices induits par la complexité de la matrice sol.

2.4.2.2 Analyse en concentration totale des échantillons des solutions de sol (lixiviats)

Des manipulations préliminaires ont été effectuées afin de vérifier la pertinence du choix de la stratégie du mode d'étalonnage par ajouts dosés avec ajouts d'étalons internes ou par étalonnage externe avec ajouts d'étalons internes. Dans un premier temps, des échantillons de lixiviats ont été minéralisés dans les mêmes conditions que les sols. Les analyses ont été effectuées par ICP-MS en réalisant un étalonnage par ajouts dosés avec ajouts des étalons internes (bismuth et indium). Dans un deuxième temps, les échantillons de lixiviats ont été dilués 10 fois avant d'être acidifiés à 2 % par ajouts de HNO_3 concentré et directement analysés par étalonnage externe avec ajouts des étalons internes. Aucune différence significative des résultats n'a été observée entre ses deux modes d'étalonnage. Le mode d'étalonnage externe avec ajouts d'étalons internes a été retenu. Ainsi, les étalons internes de bismuth et d'indium ont été introduits en quantités connues dans les lixiviats dilués 10 fois et acidifiés à 2 % puis l'analyse a été effectuée.

2.4.3 Paramètres des instruments

L'ICP-MS utilisé au LCABIE est le modèle 7500ce de chez Agilent Technologies, Tokyo, Japon. Lors des analyses, des interférences isobariques dues à la faible résolution de l'ICP-MS quadripolaire, sont susceptibles d'intervenir. Elles peuvent être dues à un ion élémentaire ou un ion polyatomique ayant un même rapport M/Z que l'élément étudié. Ces interférences sont causés par le plasma d'argon, le solvant, l'air environnant le plasma, les acides, les oxydes stables ou encore les ions doublement chargés. Pour pallier à ce problème, plusieurs isotopes sont sélectionnés pour l'analyse d'un même élément. De plus, une cellule de réaction est utilisée. Il s'agit d'une chambre située dans l'interface, après les cônes percés et les lentilles ioniques et avant le quadripôle. Elle est pressurisée avec un gaz de réaction, dans le cas présent du dihydrogène H₂. Ainsi, des réactions ont lieu entre le gaz de réaction et les interférents sous forme de transfert de charge, transfert de proton ou des réactions d'attachement. L'ensemble des paramètres retenus pour l'ICP-MS sont présentés dans le tableau 2.3. Ils ont été optimisés en analysant une solution de réglage dite « tuning solution » :

Tableau 2.3 : Paramètres ICP-MS sélectionnés pour les analyses

Puissance Radio fréquence (W)	1500
Torche	Teflon-perfluoroalkoxy (PFA) / Kit HF
Chambre de nébulisation Scott	Teflon-perfluoroalkoxy (PFA) / Kit HF
Nébuliseur	Meinhard
Cônes échantillonneur	Ni
Débit gaz plasma (Ar) (L min ⁻¹)	15
Débit gaz porteur (Ar) (L min ⁻¹)	1
Débit gaz auxiliaire (Ar) (L min ⁻¹)	0,15
Gaz de réaction (mL min ⁻¹)	3 (Hydrogène)
Isotopes	⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁵ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ¹¹² Cd, ¹¹⁴ Cd, ¹¹⁵ In, ²⁰⁴ Pb, ²⁰⁶ Pb, ²⁰⁹ Bi
Tuning solution	1 µg L ⁻¹ Li, Y, Tl, Ce dans HNO ₃ 2 %

Concernant les échantillons de grains analysés à l'USRAVE, les concentrations totales en cuivre et en zinc ont été déterminées par ICP-AES et celles en arsenic, cadmium et plomb par ICP-MS.

Au LCABIE, les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été déterminées pour les analyses ICP de minéralisats et de solutions de sol selon la norme de l'« International Union of Pure and Applied Chemistry » (IUPAC) [180].

A l'USRAVE, elles ont été calculées selon la même norme mais ont ensuite été vérifiées par des analyses successives de solutions étalons de concentration décroissante.

Elles sont présentées dans le tableau 2.4.

Ainsi,

$LD = 3\sigma / P$ pour la limite de détection

$LQ = 10\sigma / P$ pour la limite de quantification

Avec σ l'écart type du signal du blanc et P la pente de la droite d'étalonnage.

Tableau 2.4 : Performances des méthodes analytiques ICP ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Métal		Arsenic	Cadmium	Cuivre	Plomb	Zinc	
Minéralisat	USRAVE	LD	0.08	0.03	2.4	0.3	2
		LQ	0.25	0.10	8.0	0.8	7
	LCABIE	LD	1.7	0.022	1.0	0.22	0.9
		LQ	5.6	0.074	3.4	0.73	3
Lixiviat	LCABIE	LD	0.008	0.005	0.015	0.0053	0.11
		LQ	0.028	0.016	0.049	0.0177	0.35

2.5 Analyse de fractionnement des ETM par voltammétrie de redissolution anodique (ASV)

2.5.1 Instrumentation

Le montage électrochimique est constitué d'une cellule en verre dans laquelle 10 mL d'échantillon à analyser est introduit. Trois électrodes ont été plongées dans l'échantillon, une électrode de travail et une contre électrode (dite aussi « électrode auxiliaire ») sérigraphiées à base de carbone préparées au laboratoire et une électrode de référence Ag(s)/AgCl(s)/KCl 3 mol L⁻¹ (Model DRIREF-5SH, Wolrd Precision Instruments Ltd) (figure 2.6).

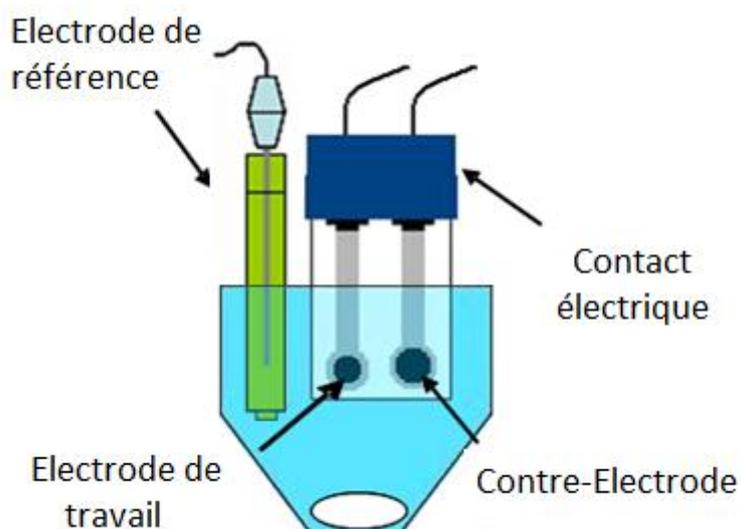


Figure 2.6 : Cellule électrochimique utilisée pour les analyses

Les électrodes ont été reliées à un potentiostat Autolab PGSTAT12 (Metrohm, Eco Chemie, The Netherlands) contrôlé par un ordinateur équipé du logiciel GPES 4.9. Le potentiostat est un générateur de courant continu dont la tension de sortie (qui est appliquée entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire) est commandée par un processus de régulation, de façon à maintenir constante la tension qui s'établit entre l'électrode de travail et l'électrode de référence [164].

2.5.2 Préparation de la solution de sol

La lixiviation de sol a été préparée par batch selon la NF ISO 18772 [133]. Pour chaque échantillon de sol, un rapport de lixiviation Lixiviant/Sol (L/S) égal à 10 a été sélectionné. Ainsi, 8 g de sol préalablement broyé et séché et 80 g d'eau MilliQ ont été introduit dans un tube de centrifugation en polypropylène préalablement décontaminé par de l'acide nitrique 10 %, rincé à l'eau distillée puis à l'eau MilliQ et séché. Les tubes ont ensuite été bouchés et fixés sur un agitateur rotatif (STR4 STUART) (Bibby Scientific, United Kingdom) et une agitation de 10 tours par minute a été lancée pendant 24 h. Une fois l'agitation terminée, les tubes ont été extraits de l'agitateur et ont été laissés décantés pendant 30 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 3500 rpm via une centrifugeuse (Jouan C412). Enfin, les surnageants (lixiviats) ont été extraits, filtrés à 0,45 µm et stockés à l'obscurité à 4 °C jusqu'à analyse. Les conditions de lixiviation sont résumées dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5 : Conditions expérimentales de lixiviation de sol

Paramètres	Conditions sélectionnées pour la lixiviation
Etat du sol	Sol séché, broyé
Température	20 °C (salle thermostatée)
Mode de contact entre le sol et le lixiviant	Dynamique (agitation rotative)
Rapport de lixiviation L/S	10
Lixiviant	Eau MilliQ
Durée d'agitation	24 heures
Centrifugation	3500 rpm
Récupération des surnageants	Récupération à la pipette
Filtration	0,45 µm

Les filtrations à 0,45 µm dans les lixiviats ont été réalisées à l'aide de filtres seringues avec membrane en acétate de cellulose et des seringues sans aiguille (BD Discardit II, VWR international, Belgium)

Concernant les lixiviats, la fraction dissoute à analyser par ICP-MS a été conservée à 4 °C, en milieu acide (HNO₃ 2 %) et à l'obscurité dans un flacon 10 ml en polypropylène jusqu'à analyse. Les lixiviats à analyser par ASV étaient frais et n'ont pas été conservés.

2.5.3 Préparation des électrodes

2.5.3.1 Procédé de sérigraphie

L'électrode de travail et la contre électrode ont été préparées à partir de plaques de support isolant sur lesquelles de l'encre puis un support isolant visqueux ont été appliqués par sérigraphie (figure 2.7). La sérigraphie est une technique consistant à utiliser un écran constitué d'un maillage de géométrie voulue et laissant passer l'encre à l'aide d'une raclette. Elle permet d'imprimer sur de nombreuses matières dont le plastique et a les avantages d'être rapide, peu couteuse, et reproductible. Les outils utilisés pour la sérigraphie doivent rester les mêmes pour la préparation d'un jeu d'électrodes afin de ne pas perturber la reproductibilité des électrodes. En effet, les caractéristiques de l'écran (pas de maille en mesh, vide de la maille, épaisseur de la toile), de la nature du support isolant et les dimensions de la raclette influencent le rendu du dépôt.

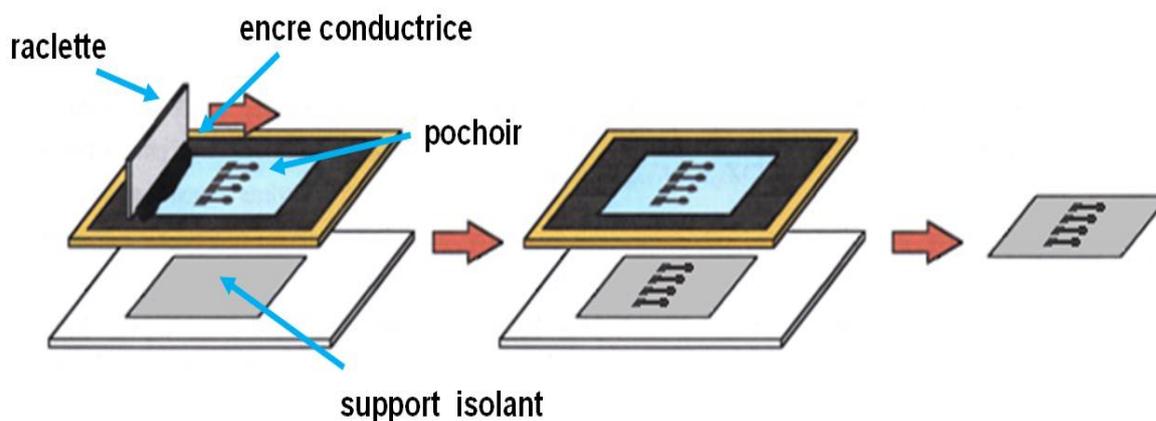


Figure 2.7 : Principe de la sérigraphie

Dans une première étape, l'encre conductrice Electrodag PF-407 A à base de carbone (Acheson Colloids, Washington, USA) a été appliquée par sérigraphie sur une plaque de polystyrène choc (Sericol, France). Dans une deuxième étape, une couche d'isolant, obtenu par dissolution d'une plaque de polystyrène choc dans du mésitylène (pureté > 99 % ; Fluka,

USA), a été appliquée sur les électrodes de carbone afin de délimiter précisément la surface de travail de l'électrode tout en conservant une surface permettant le contact électrique avec le potentiostat.

Les électrodes ont été préparées par jeux de 6 paires, l'une d'entre elles correspondant à l'électrode de travail et l'autre à la contre électrode (figure 2.8). A ce stade, la préparation de la contre électrode est achevée.

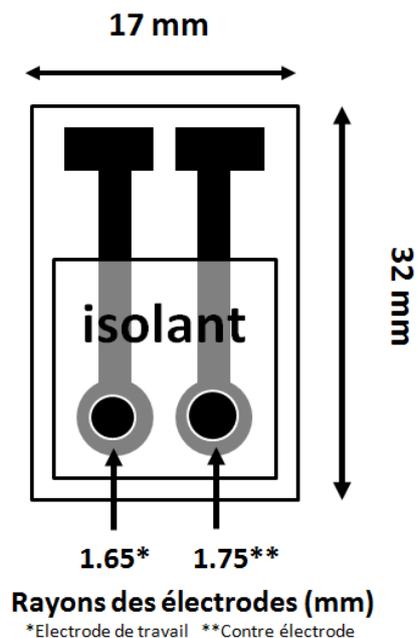


Figure 2.8 : Paire d'électrodes préparées par sérigraphie

2.5.3.2 Electrodeposition du mercure

Concernant l'électrode de travail, la surface en carbone a été modifiée par dépôt d'un film de mercure. Pour cela, l'électrodeposition du mercure a été effectuée sous agitation en plongeant l'électrode de travail sérigraphiée dans une solution de tampon acétate concentrée à $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,5) (Fluka, USA) et contenant 170 mg L^{-1} d'ions mercurique Hg^{2+} . Cinq balayages successifs en potentiel de $-0,1 \text{ V}$ to $0,8 \text{ V}$ effectués en voltammétrie cyclique à une vitesse de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ permettent de préparer la surface de l'électrode. Ensuite, un dépôt de $5 \text{ }\mu\text{g}$ de mercure, correspondant à une charge de 5 mC , est effectué sous agitation à un potentiel constant de $-0,1 \text{ V}$. Les propriétés de la solution tampon permettent de se placer dans des conditions de pH et de conductivité optimales adaptées au matériel et méthodes électrochimiques utilisés [164].

2.5.4 Procédure d'étalonnage et d'analyse

La méthode électrochimique adoptée, a été optimisée et validée pour l'analyse du cuivre et du plomb dans une solution de sol de référence certifiée minéralisé. La robustesse de la méthode a été vérifiée par l'analyse de différentes solutions de sol minéralisé présentant des concentrations en cuivre et en plomb variables et par la vérification des concentrations obtenues par électrochimie avec celles obtenues par ICP-MS.

2.5.4.1 Analyse du cuivre et du plomb dans les minéralisats de sol

Les solutions brutes de sol et de blanc minéralisés ont été diluées 15 fois dans du tampon acétate afin de diminuer les concentrations en ETM et en acides. La cellule électrochimique étant en verre, le HF contenu dans les solutions de minéralisation a été complexé par de l'acide borique (> 99,99 %) (Prolabo, Paris, France). Ensuite, les solutions de sol et de blanc minéralisés ont été filtrées à 0,45 µm. Les solutions ainsi préparées ont été nommées MB pour la solution de blanc minéralisé et MS pour la solution de sol minéralisé. L'étalonnage a été effectué par ajouts dosés. La technique électrochimique utilisée pour ces analyses est la SWASV, dont les étapes sont illustrées dans la figure 2.9.

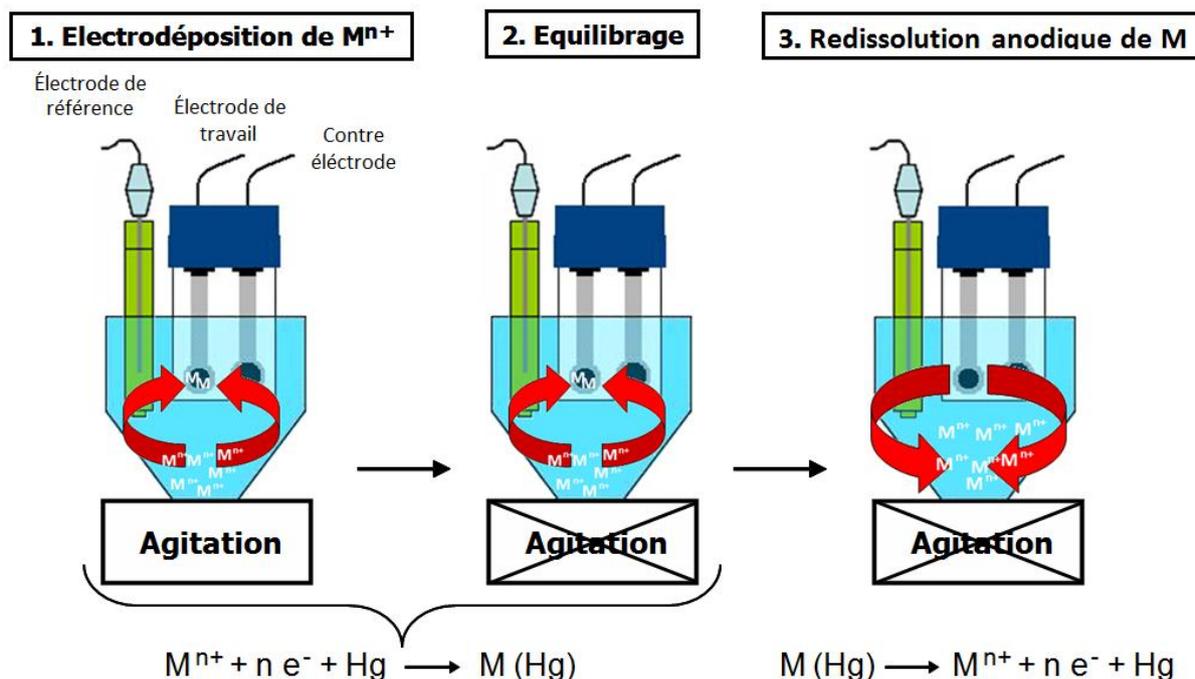
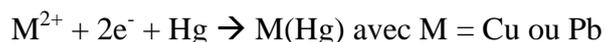


Figure 2.9 : Etapes d'une mesure de la concentration en ETM par ASV

Pour chaque analyse, le cuivre et le plomb ont été réduits sous un potentiel réducteur de $-0,8$ V pendant 60 s sous agitation. Cette première étape, dite « étape de préconcentration », permet de concentrer les analytes sur la surface de l'électrode de travail sous forme d'amalgame avec le mercure précédemment déposé selon la réaction :



Ensuite, une étape d'équilibrage est réalisée pendant 30 s sans agitation sous un potentiel constant de $-0,8$ V. L'arrêt de l'agitation permet de passer d'un régime de transfert de masse de type convection-diffusion à un régime de diffusion pure. La réduction se poursuit cependant.

Enfin, un balayage de potentiel pulsé s'étendant de $-0,8$ V à $+0,1$ V a été appliqué dans le sens des potentiels croissants et le voltammogramme a été enregistré. Cette variation de potentiel provoque la redissolution anodique des composés selon l'équation :



La surface du pic a été retenue comme réponse analytique. De plus, chaque analyse a été répliquée trois fois afin d'évaluer la répétabilité et la justesse de la mesure. Dans cette configuration, pour un milieu analytique de MB, les limites de détection et de quantification ont été calculées à hauteur de $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ et $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivement pour le cuivre et de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ et $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivement pour le plomb.

2.5.4.2 Analyse du cuivre et du plomb électrolabiles dans les lixiviats

Pour les analyses de fractionnement, aucune dilution n'a été appliquée sur les échantillons de lixiviat. Du nitrate de potassium (KNO_3) a été ajouté dans les lixiviats afin d'augmenter la conductivité de la solution. Cet ajout est nécessaire afin d'obtenir un passage du courant suffisant dans la solution permettant une sensibilité optimale. Néanmoins, l'ajout de KNO_3 ne doit en aucun cas impacter la spéciation du cuivre et du plomb dans la solution. Ainsi, des études de spéciation ont été simulées. Visual Minteq est un logiciel de modélisation d'équilibre chimique qui permet d'obtenir des modèles thermodynamiques pour l'étude de la spéciation des ETM dans les milieux aquatiques naturels ou reconstitués en laboratoire. Pour cela, les paramètres de la solution étudiée tels que le pH, la conductivité, la force ionique et les concentrations totales dissoutes des différentes espèces présentent dans le milieu doivent être renseignés. Le pH des solutions a été mesuré au laboratoire par un pH-mètre (WTW, MultiLab 540) et la conductivité par un conductimètre (CDM210, Fischer Scientific, Belgium). Les paramètres analytiques utilisés sont les mêmes que ceux décrit précédemment. Dans ces conditions, les limites de détection et de quantification ont été calculées à hauteur $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ et $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivement pour le cuivre et de $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ et $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivement pour le plomb.

2.6 Analyses statistiques des données

Ces analyses ont été réalisées pour évaluer les caractéristiques du protocole d'échantillonnage mis au point. Elles ont été réalisées sur les jeux de données de concentrations en ETM dans les sols et dans les grains issus d'une parcelle. L'ensemble des tests statistiques a été effectué avec le logiciel XLSTAT Version 2013.4.07, qui est une application du logiciel Microsoft Excel.

2.6.1 Traitement des valeurs inférieures aux limites de quantification

Avant la réalisation des analyses statistiques, les valeurs des concentrations en ETM des échantillons de sol et/ou de grains inférieures à la limite de quantification ont été converties en résultats numériques, lorsque moins de 30% des valeurs du jeu de données étaient inférieures à la LQ [181]. Pour cela, les valeurs ont été remplacées par le résultat de l'équation :

$$\frac{1}{2} \times LQ \times (1 + a)$$

Avec **LQ**, la limite de quantification de l'élément considéré et **a**, l'incertitude analytique de la variable étudiée en %.

2.6.2 Statistiques descriptives des données et recherche de corrélations

Dans un premier temps, les valeurs moyennes, médianes, maximales et minimales relatives à l'ensemble des concentrations en ETM dans le sol et dans les grains ont été calculées. La normalité de la distribution des données a également été évaluée (test de Shapiro–Wilk [182]) afin de pouvoir paramétrer de façon adaptée les analyses statistiques et géostatistiques réalisées par la suite.

L'homogénéité des données a été vérifiée par des analyses de variance (ANOVA) après vérification de la normalité de la distribution et de l'homogénéité des variances. Les séries de données présentant des distributions non normales ou des variances hétérogènes ont été analysées par des tests non paramétriques (analyse de Kruskal-Wallis).

Des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées afin de vérifier l'indépendance et/ou la dépendance des différentes concentrations en ETM dans le sol et les grains. De manière générale, l'ACP consiste à évaluer simultanément les corrélations entre plusieurs variables x_i connues par leurs jeux de n données, chaque coefficient de corrélation étant considéré comme un estimateur de l'intensité du lien entre 2 variables. Dans le cas présent, les p variables étudiées sont les concentrations en ETM, mesurées aux $p/6$ différents points d'échantillonnage (en chaque point 3 concentrations élémentaires ont été mesurées dans le sol et dans les grains (cadmium, cuivre et zinc), soit 6 variables par point). L'approche mathématique suivie pour accéder aux corrélations est la suivante. L'hypothèse étant que les p variables peuvent être plus ou moins corrélées, elles sont transformées en p variables F_i ($i= 1$ à p) non corrélées et appelées composantes principales. Pour cela, les $p.n$ données sont centrées ($x_{ci} = x_i - \langle x_i \rangle$, avec $\langle x_i \rangle$ la moyenne de la $i^{\text{ème}}$ variable x) puis placées dans une matrice X à partir de laquelle la matrice de variance-covariance (V) est calculée selon :

$$V = \frac{1}{n} (X^t \cdot X)$$

Avec X^t matrice transposée de X .

Puis la matrice V est diagonalisée. Les p vecteurs propres obtenus correspondent aux coefficients des combinaisons linéaires des p variables x_i exprimées selon chaque axe F_i :

$$F_i = p_{i1} x_{ci1} + p_{i2} x_{ci2} + \dots + p_{ip} x_{cip}$$

Les p valeurs propres obtenues (diagonale de la matrice des valeurs propres) correspondent à la variance de chaque donnée x_{ij} selon chaque axe F_i .

Enfin, dans l'espace à p dimensions défini précédemment par les variables F_i qui en constituent les axes orthogonaux (indépendants), les p variables de concentrations (x_i) peuvent être représentées graphiquement. Afin d'en faciliter la lecture, cette représentation graphique est faite en choisissant les axes les plus représentatifs, c'est-à-dire les axes où les variables x_i sont le plus distribuées (coefficients p_{ij} les plus grands). Une série de graphiques (un au minimum !) à deux dimensions (composantes F_i présentées deux par deux) peut ainsi être générée. Chaque graphique s'appelle « cercle des corrélations » et permet de visualiser l'ensemble des corrélations entre variables x_i , représentées par des vecteurs (figure 2.10).

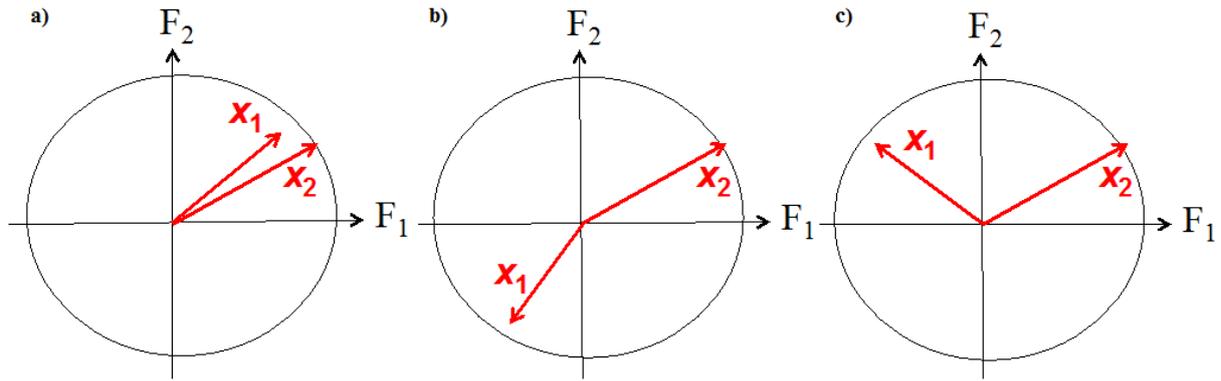


Figure 2.10 : Représentation schématique de cercles de corrélations types (voir texte ci-dessous)

Ainsi, plus un vecteur est grand, plus il est représenté (a une composante forte) dans les deux axes F_i . Lorsque deux vecteurs sont proches, les deux variables correspondantes sont fortement corrélées positivement (figure 2.10 a)) Lorsque deux vecteurs sont opposés (figure 2.10 b)), les deux variables qu'ils représentent sont fortement corrélées négativement. Lorsqu'ils sont orthogonaux (figure 2.10 c)), les deux variables correspondantes sont indépendantes.

Les statistiques pouvant être utilisées pour calculer les corrélations sont celles de Pearson et celles de Spearman. La première s'adresse aux variables dont la distribution est normale. La seconde ne fait aucune hypothèse de distribution des données à analyser. Elle peut donc être utilisée pour tout type de distribution [183,184]. De ce fait, les coefficients de corrélations ont été calculés selon la loi de Spearman.

2.6.3 Analyses géostatistiques

Les analyses géostatistiques ont été effectuées au travers de variogrammes obtenus avec le logiciel Variowin 2.0., pour chaque ETM dans le sol et dans les grains à partir de leurs concentrations déterminées individuellement sur chacun des points de prélèvement à la parcelle. Le principe du variogramme repose sur l'idée que, dans la nature, deux observations situées l'une proche de l'autre devraient se ressembler davantage que deux observations éloignées. Le variogramme permet alors de mesurer la variabilité (ou hétérogénéité) spatiale globale (c'est-à-dire aléatoire et expliquée) des données pour différentes classes de distance interpoint et ainsi de quantifier la distribution de la variabilité moyenne entre deux points voisins par une fonction mathématique. Lorsque la variabilité entre deux valeurs (de concentration) pour deux points voisins est plus faible que celle entre deux points éloignés, les

données sont dites autocorrélées (ou expliquées ou pouvant être reliées par un modèle mathématique). Le variogramme expérimental est calculé pour différentes classes de distances interpoint selon l'équation suivante :

$$\gamma(h) = \frac{1}{2N(h)} \sum_{i=1}^n [Z(x_i) - Z(x_i + h)]^2$$

Où $Z(x)$ représente la valeur de la variable Z à la position x_i et $Z(x_i+h)$ la valeur de la variable Z à une position séparée de x_i d'une distance h (distance interpoint). N est le nombre de couples de points séparés d'une distance h [185].

La covariance permet d'estimer la ressemblance entre les valeurs alors que le variogramme évalue la dissemblance entre les valeurs en fonction de l'éloignement. Les variogrammes ont été définis de façon multi-directionnelle, c'est-à-dire en considérant la totalité des points de prélèvement de la parcelle indifféremment de leur direction, ce qui permet de représenter la totalité de l'information simplement, sur un graphique à deux dimensions.

Le variogramme expérimental ne peut pas être défini partout, notamment aux distances h pour lesquelles il n'y a pas eu d'échantillonnage. Dans le domaine d'informations, il est ajusté par une fonction mathématique permettant de le modéliser, c'est-à-dire de transformer de l'information ponctuelle (relative aux points de mesure) en information continue (variance fonction de la distance interpoint). Le variogramme modélisé permet d'obtenir les informations suivantes :

- l'effet de pépite, exprimé par C_0 : elle correspond à l'ordonnée à l'origine. La valeur de la variance à l'origine est due à la variabilité aux pas d'échantillonnage infiniment petits, à l'erreur du protocole et à l'incertitude analytique. Lorsque l'ordonnée à l'origine est significativement différente de zéro, et s'il s'avère que la cause principale en est la variabilité des concentrations, cela signifie qu'il existe une variabilité significative à très faible échelle (strictement en un même point). Le comportement à l'origine du variogramme reflète donc le degré de régularité spatiale de la variable étudiée. Il peut permettre de déceler des anomalies au champ ;

- le palier, repéré par $C + C_0$: la correspondance avec l'axe des distances permet de quantifier la portée. Lorsque les données deviennent non-autocorrélées, la variance interpoint tend vers une asymptote (le palier) correspondant à la plus grande distance d'autocorrélation interpoint. Dans ce cas, la portée est définie comme la distance où est atteint 95% du palier.

- la portée, représentée par a : elle correspond à la distance maximale d'autocorrélation entre deux points, c'est-à-dire la distance maximale au delà de laquelle les points sont indépendants et la variance ne peut plus être expliquée (figure 2.11).

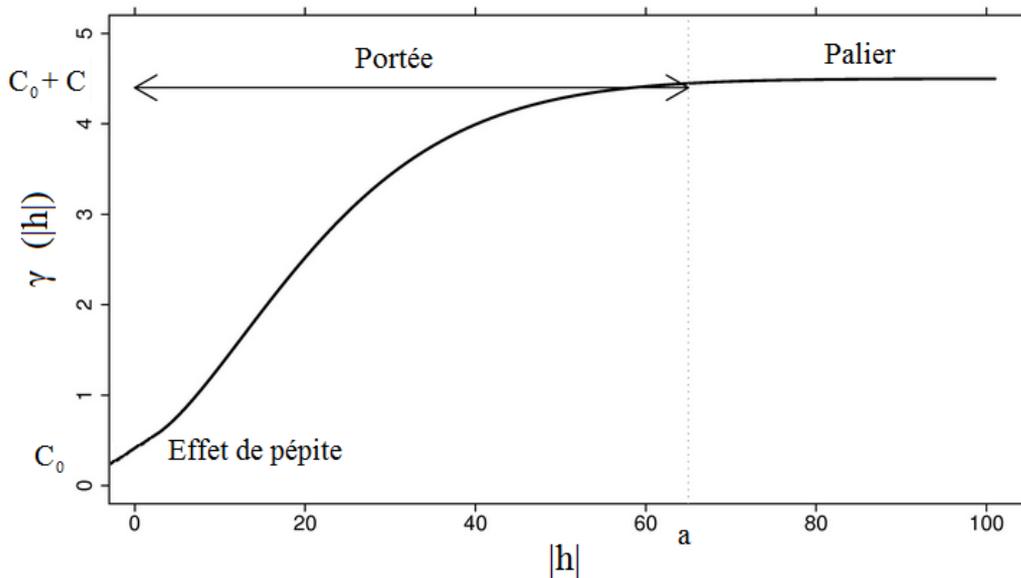
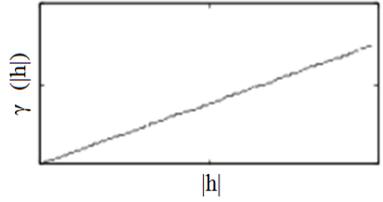
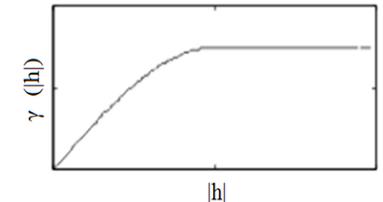
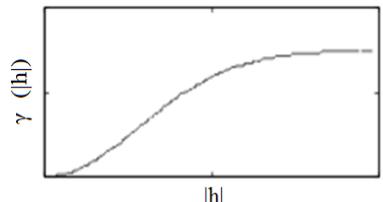
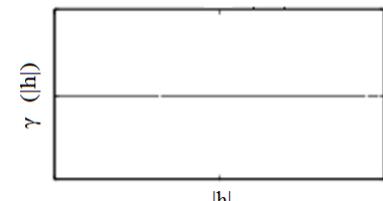


Figure 2.11 : Exemple de variogramme type

L'abscisse $|h|$ représente la distance en mètres entre les points d'échantillonnage, et l'ordonnée $\gamma(|h|)$ la variance en $(\text{mg kg}^{-1})^2$ des échantillons selon leurs interdistances spatiales.

Il existe plusieurs fonctions mathématiques pour modéliser spatialement les variances et obtenir le variogramme parmi lesquelles les modèles puissance, sphérique, gaussien et plat sont les plus communs (tableau 2.6). Le modèle linéaire est un cas particulier du variogramme puissance avec une valeur de puissance égale à 1.

Tableau 2.6 : Type de modèles de variogramme courant

Modèle	Fonction mathématique	Représentation
Linéaire	$\gamma(h) = \begin{cases} C_0 + \frac{C}{a} h & \text{pour } a \geq h \geq 0 \\ C_0 + C & \text{pour } h > a \end{cases}$	
Sphérique	$\gamma(h) = \begin{cases} C_0 + C \left(\frac{3h}{2a} - \frac{h^3}{2a^3} \right) & \text{pour } a \geq h \geq 0 \\ C_0 + C & \text{pour } h > a \end{cases}$	
Gaussien	$\gamma(h) = \begin{cases} C_0 + C \left(1 - \exp\left(-\frac{3h^2}{a^2}\right) \right) & \text{pour } a \geq h \geq 0 \\ C_0 + C & \text{pour } h > a \end{cases}$	
Plat	$\gamma(h) = \begin{cases} 0 & \text{si } h = 0 \\ C_0 & \text{si } h > 0 \end{cases}$	

Ainsi, trois cas peuvent se présenter :

- Le premier cas correspond à un variogramme linéaire. L'interprétation de ce variogramme non borné est délicate. En effet, soit il peut s'agir d'un variogramme pour lequel la portée n'est pas atteinte, soit il peut révéler l'existence d'une tendance à grande échelle, soit il peut correspondre à un variogramme à variance infinie. Le choix entre ces trois interprétations n'est pas toujours possible et dépend de l'échelle d'observation.
- Le deuxième cas correspond à un variogramme borné (sphérique ou Gaussien), qui montre une augmentation de la variance de la variable jusqu'à la portée. Dans ce cas, le pas d'échantillonnage permet d'appréhender la variabilité à la parcelle et d'envisager une spatialisation.
- Le troisième cas correspond à un variogramme plat, dit aussi pépétique pur. Il représente un phénomène ne manifestant aucune autocorrélation spatiale visible à l'échelle de l'échantillonnage avec le pas d'échantillonnage utilisé. Ce type de modèle s'explique par l'existence d'une structure spatiale masquée par les erreurs expérimentales ou alors inférieure en taille au plus petit intervalle d'observation.

Les variogrammes donnent donc des informations sur les distributions spatiales des données (dans notre cas les concentrations ETM) entre les points et permettent une interpolation lorsque les données présentent une autocorrélation observable et significative à l'échelle d'étude (variogramme borné). Dans ce cas, des cartes de distribution spatiale des ETM peuvent être réalisées. Pour la présente étude, elles ont été établies à l'aide du logiciel ArcGIS - Esri France.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec un intervalle de confiance de 95 %.

Chapitre 3: Développement d'un protocole d'échantillonnage

3.1 Introduction

Selon le cahier des charges du programme CASDAR «Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et Rural» visant à proposer un guide d'échantillonnage à la parcelle, l'objectif de ce chapitre a été de développer, d'évaluer et de valider un protocole d'échantillonnage utilisable pour les parties consommées (grains) du blé et du tournesol avant la récolte. Il s'agit donc *in fine* de pouvoir décrire de façon simple et précise le processus de prélèvement des plantes (et/ou de leurs grains) en plusieurs points sur l'ensemble de la parcelle. Afin de pouvoir disposer d'un protocole opérationnel, la démarche doit, dans un premier temps, prendre en compte toutes les opérations visant à réduire au maximum la collecte tout en assurant la représentativité à la parcelle. Dans un second temps, il est nécessaire de proposer un protocole réaliste, acceptable pour les professionnels (agriculteurs et analystes) qui en seront les futurs utilisateurs.

Ce chapitre est donc structuré en deux parties, traitant de l'échantillonnage successivement à l'échelle du point de prélèvement et à l'échelle de la parcelle. Les deux parcelles C6 et CL décrites dans le chapitre précédent ont été considérées comme des parcelles tests, les cultures suivantes y ayant été réalisées :

- en 2011, blé dur sur la parcelle C6,
- en 2012, tournesol sur la parcelle C6, blé dur sur la parcelle CL.

L'ensemble des actions réalisées depuis le champ jusqu'au laboratoire l'ont été avec la participation active des personnels de l'unité expérimentale d'agronomie de l'INRA de Toulouse (UE 0802) et de l'unité d'analyse du végétal USRAVE de l'INRA de Bordeaux.

Pour l'ensemble des travaux réalisés dans cette partie, les concentrations en ETM ont été déterminées en conditions d'analyse de routine, compte tenu de la future utilisation du protocole d'échantillonnage. En particulier les incertitudes analytiques ont été prises égales à 10 et 20 % des concentrations mesurées respectivement pour le zinc et les autres ETM étudiés, en accord avec les spécifications de l'USRAVE, laboratoire chargé au niveau national de l'ensemble des analyses d'éléments minéraux dans les végétaux. Ces valeurs d'incertitude conditionnent naturellement les résultats des tests statistiques réalisés et donc l'évaluation du protocole dans un intervalle de confiance bilatéral de 95 %.

Les concentrations en arsenic et en plomb dans les grains de blé et de tournesol étant inférieures aux limites de quantification au niveau des différents points de prélèvement, ces deux éléments n'ont pas fait l'objet de cette partie d'étude.

3.2 Echantillonnage au point de prélèvement

L'appréhension de la suite d'opérations à réaliser au champ en chaque point de prélèvement dépend du végétal, et en particulier de sa taille et de son volume. Ainsi, il a été décidé :

- pour le tournesol, de ne considérer que trois plantes par point de prélèvement, avec éventuellement un nombre particulier (ou minimum) de grains à prélever sur le capitule de chacune, pour l'analyse ;
- pour le blé, de prélever un bouquet de plantes par point de prélèvement, en considérant par la suite l'épi entier pour l'analyse puisque l'ensemble des grains peuvent être aisément analysés étant donné leur faible quantité.

3.2.1 Tournesol

Les capitules de tournesol comportant un nombre important de grains (de l'ordre de la centaine voir du millier), l'emplacement des grains prélevés dans le capitule et le nombre de grains représentatif de l'ensemble du capitule ont donc été étudiés. Les tests ont été effectués sur trois plantes prélevées aléatoirement sur la parcelle.

L'influence du positionnement des grains sur le capitule a été appréhendée en fonction des différentes zones présentées dans la figure 3.1.

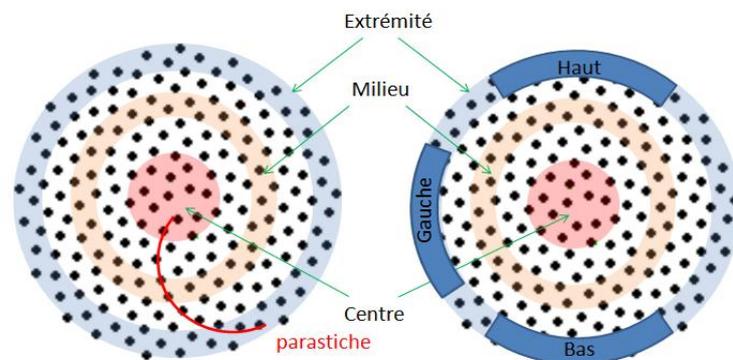


Figure 3.1 : Positionnement des grains de tournesol échantillonnés

Ainsi, les capitules de 2 plantes de tournesol ont été chacun divisé en trois parties de manière concentrique suivant une parastiche (extrémité, milieu, centre) et les grains respectifs (parties colorées sur figure 3.1) ont été analysés. Parallèlement, les grains situés à l'extrémité du capitule d'une troisième plante ont été étudiés dans le but d'évaluer l'effet de la position de grains situés à une même distance du centre (haut, gauche, bas). Pour chacune des prises d'essais, les concentrations en ETM ont été déterminées. Les concentrations moyennes obtenues sont présentées dans la figure 3.2. Elles sont en accord avec les valeurs moyennes de la littérature (cf. tableau 1.5) sauf pour le zinc où elles sont plus élevées. Ceci peut venir soit du sol ou des pratiques culturales.

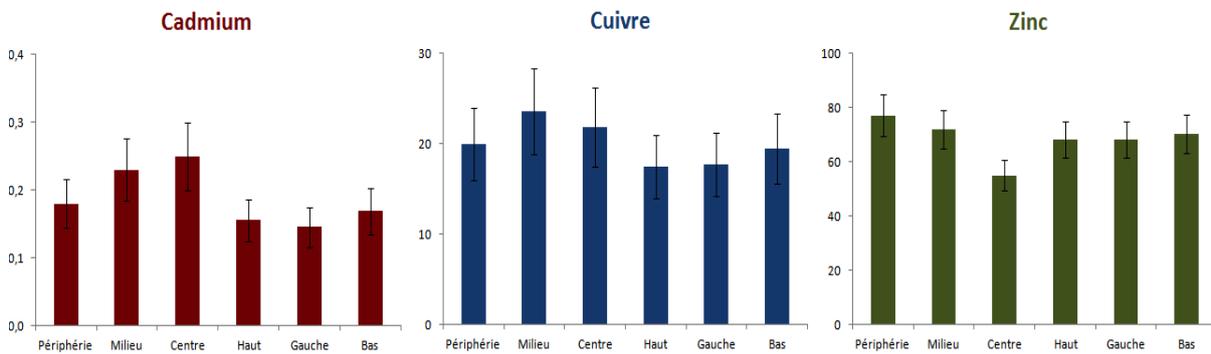


Figure 3.2 : Concentrations en ETM dans les grains de tournesol en fonction de la zone de prélèvement dans le capitule

Complémentairement, des tests d'homogénéité ont été réalisés pour vérifier l'égalité statistique de ces données. Les résultats indiquent que le positionnement des grains, d'une part selon leur distance au centre du capitule, d'autre part selon le haut, la gauche ou le bas de la circonférence, n'a pas influence sur les niveaux des concentrations en ETM. La distribution spatiale des ETM dans les capitules apparaît donc aléatoire.

L'influence du nombre de grains a ensuite été étudiée. Des lots constitués de 5, 10, 20, 30 et 40 grains ont alors été constitués aléatoirement, indépendamment pour 3 capitules différents. Les analyses ont été réalisées une seule fois sur chacun des 3 lots de grains comportant le même nombre de grains. Les résultats sont présentés dans la figure 3.3 (ligne 1). Il s'avère que 10 grains suffisent à assurer la représentativité d'un capitule. Enfin, des lots de 1, 2 et 3 plantes ont été constitués au niveau de 3 points de prélèvement différents. Les concentrations obtenues sont reportées dans la figure 3.3 (ligne 2). Aucune différence significative n'a été observée pour les concentrations en ETM, ce qui est confirmé par les tests d'homogénéité.

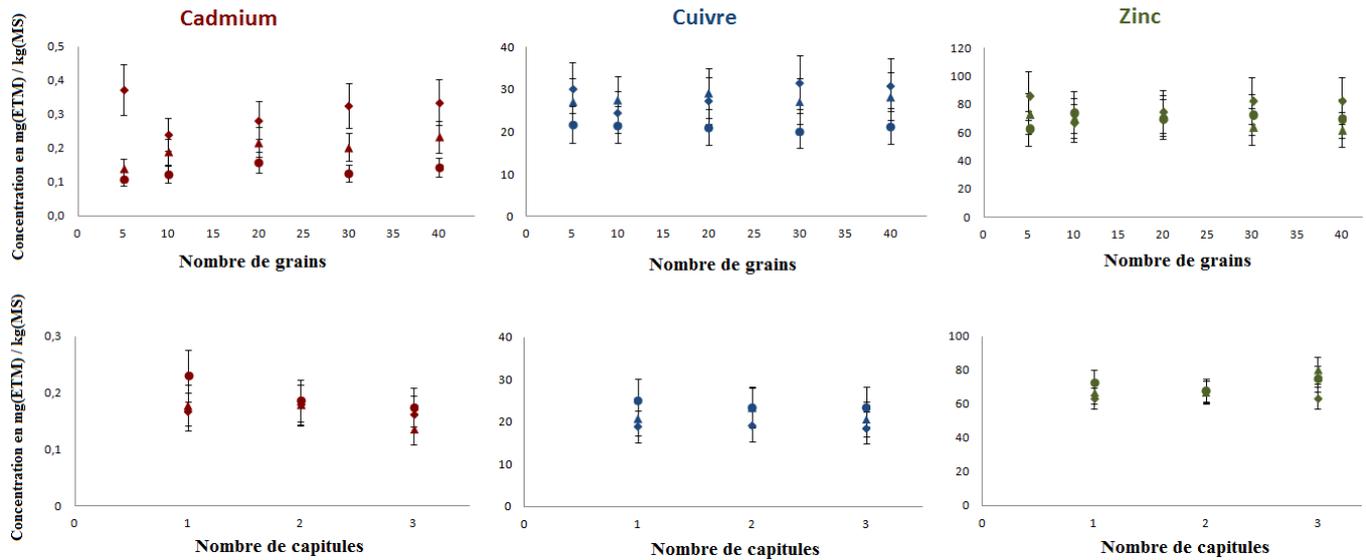


Figure 3.3 : Concentrations en ETM dans les grains de tournesol en fonction du nombre de :
 ligne 1) grains prélevés et ligne 2) capitules considérés

Au bilan, il est donc suffisant de prélever 10 grains aléatoirement sur le capitule d'une seule plante pour être représentatif des parties consommables de 3 plantes de tournesol et donc représentatif de chaque point de prélèvement d'une parcelle.

3.2.2 Blé

Une plante de blé pouvant contenir plusieurs épis, nous parlerons ici d'épis (chaque épi étant prélevé de façon aléatoire sur une plante située au niveau du point de prélèvement).

Du fait qu'il est facile et habituel (pour les laboratoires en charge de ce type d'analyse en routine) de prendre l'ensemble des grains d'un épi pour l'analyse, la démarche visant à réduire la prise d'essai a donc concerné uniquement le nombre d'épis par point de prélèvement. Cette démarche a alors été la suivante : à partir d'un point choisi aléatoirement dans la parcelle, un bouquet de 120 épis a été prélevé puis des lots de 1, 2, 5, 10 et 20 plantes ont été constitués. Ce test a été réalisé sur les deux parcelles.

Les analyses des ETM ont été effectuées en triplicat. La figure 3.4 présente les concentrations moyennes obtenues selon le nombre d'épis par lot, pour chaque élément.

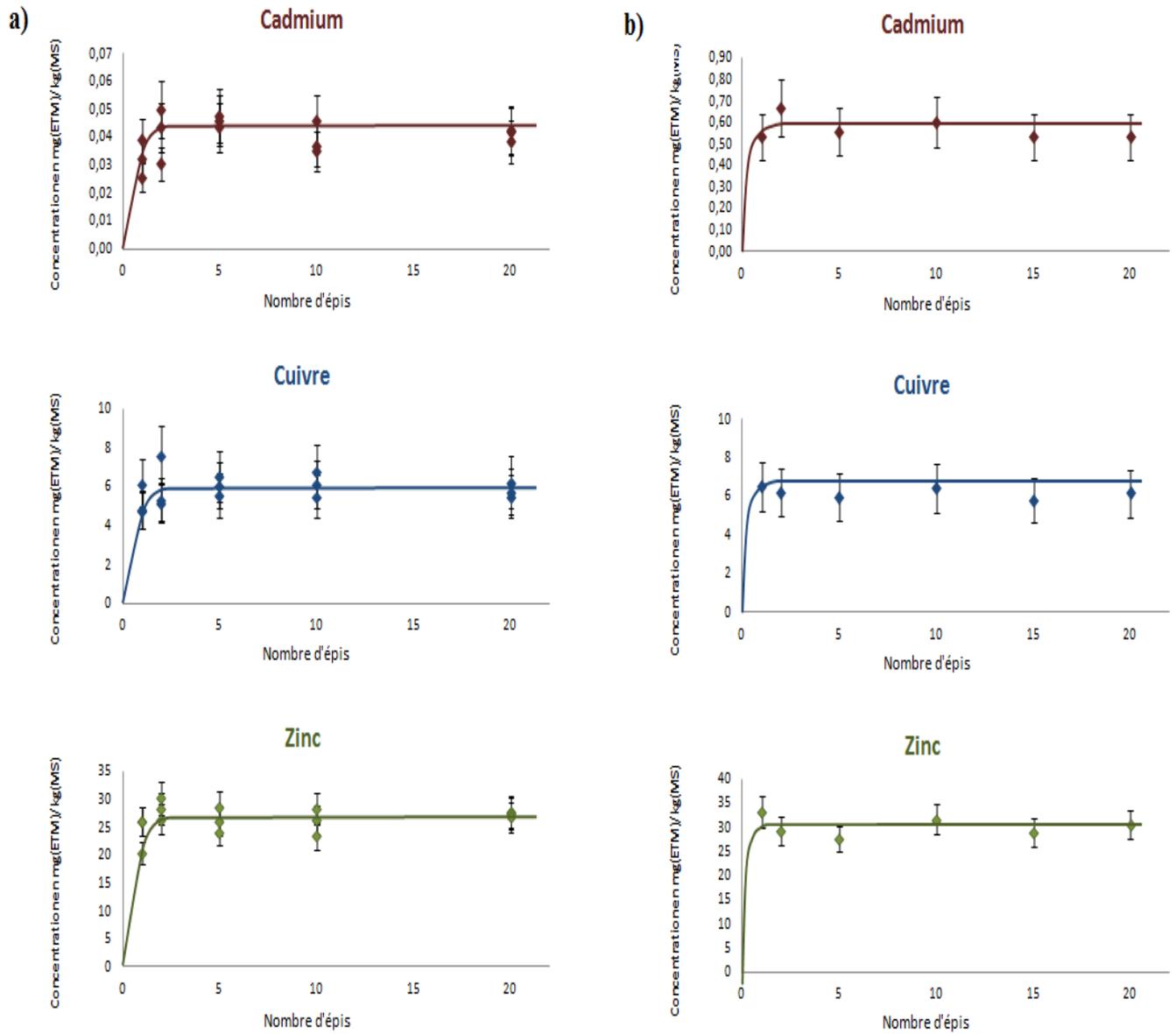


Figure 3.4 : Comparaison des concentrations moyennes en ETM selon le nombre d'épis de blé considérés par point de prélèvement a) Parcelle C6 - campagne de prélèvement 2011
b) Parcelle CL - campagne de prélèvement 2012

Les résultats obtenus pour les lots constitués d'un seul épi (visualisés au point 1 des différentes courbes de la figure 3.4, confirmés par tests statistiques d'homogénéité), permettent tout d'abord de montrer qu'il n'existe pas de variabilité significative des concentrations entre épis à l'échelle du point de prélèvement. En considérant ensuite l'ensemble des lots de tailles variables, il s'avère que la représentativité du point de prélèvement est obtenue par l'échantillonnage de 2 épis au minimum. L'augmentation de ce nombre ne conduit à aucune variation significative des concentrations en ETM. Ces mêmes résultats ont été obtenus pour les deux parcelles. Afin de valider de façon globale le prélèvement de 2 épis par point d'échantillonnage avant l'évaluation du PEAS à l'échelle de la parcelle, les concentrations obtenues pour des bouquets de 2 et 20 épis sur les 25 points d'échantillonnage d'une même parcelle (CL) ont été comparés. Pour chaque bouquet, un échantillon moyen a été confectionné à partir des épis collectés. Les concentrations moyennes obtenues pour ces 2 fois 25 échantillons sont présentées figure 3.5.

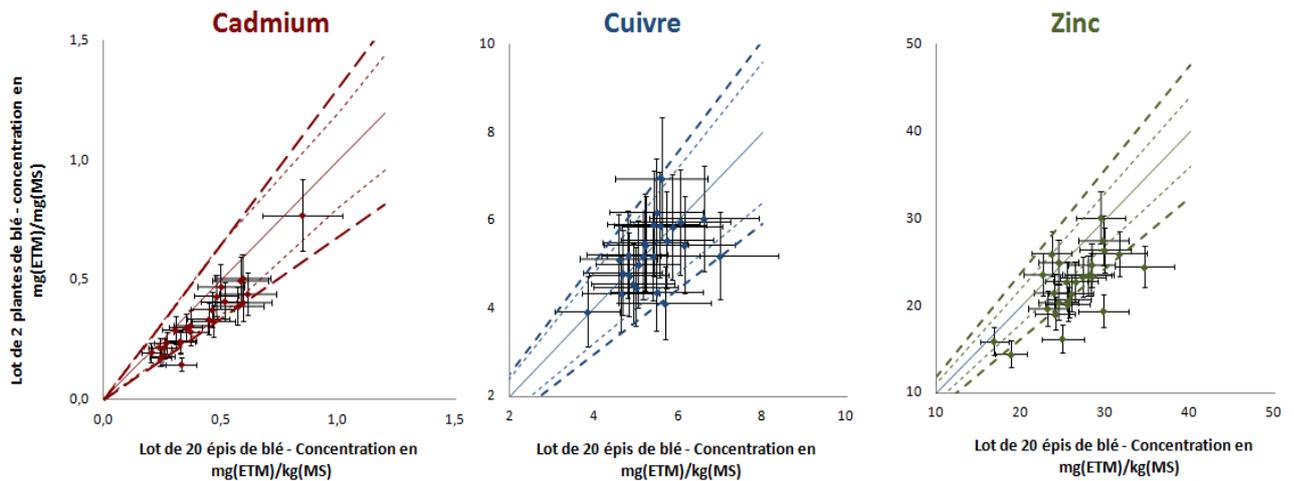


Figure 3.5 : Comparaison des concentrations moyennes obtenues à partir de 2 et 20 plantes prélevées en un même point, pour 25 points de prélèvement sur une même parcelle (CL - campagne de prélèvement 2012) (voir texte ci-dessous)

Pour chaque ETM, le trait continu de pente $y = 1$ représente le « cas idéal » pour lequel la représentativité du point de prélèvement est autant assurée par un échantillon constitué d'un lot de 2 épis que par un lot de 20 épis (égalité des valeurs de concentrations). Les traits fins discontinus (- - - - -) représentent les incertitudes analytiques des concentrations en ETM. Ils permettent de définir une zone d'homogénéité des concentrations (où les concentrations sont statistiquement égales entre les échantillons de 2 et 20 épis prélevés). Les traits épais discontinus (- - -) représentent les seuils anormaux maximum et minimum, au delà et en deçà desquels les valeurs sont considérées comme anormales⁶ (ou aberrantes). L'incertitude associée à chaque concentration a également été reportée pour chacun des points figurant dans les trois graphiques. Concernant le cadmium et le cuivre, tous les points entrent dans la zone d'homogénéité. Concernant le zinc, trois points s'avèrent être aberrants, et 22 sont dans la zone d'homogénéité. Ceci signifie donc qu'aucune différence significative des concentrations en cadmium, en cuivre et en zinc n'apparaît entre un échantillon constitué par un lot de 2 plantes ou par un lot de 20 plantes.

Au vu des résultats obtenus, il a donc été décidé de prélever 2 épis de blé au lieu de 20 par point de prélèvement. D'un point de vue pratique, sur 25 points à la parcelle, cela correspond à 50 épis à prélever au lieu de 500 ! Cette réduction permet d'assurer la représentativité de l'ensemble des points de prélèvement considérés de façon individuelle. Elle permet également de faciliter le prélèvement au champ, d'alléger le transport des échantillons et enfin de faciliter le traitement des échantillons au laboratoire (Annexe 1).

⁶ Seuil anormalique minimum = Valeur idéale diminuée de $((Q1 - 1.5 \times IQR) + Q2)$

Seuil anormalique maximum = Valeur idéale augmentée de $((Q3 + 1.5 \times IQR) - Q2)$

Avec Q1 le premier quartile, Q2 la médiane, Q3 le troisième quartile et IQR l'étendue interquartile [186]

3.3 Echantillonnage à la parcelle

3.3.1 Démarche préliminaire

Le protocole que nous devons proposer, évaluer et valider doit permettre un diagnostic pré-récolte de « l'état sanitaire » des plantes cultivées vis à vis de la concentration en éléments trace dans leurs parties consommables, à l'échelle de la parcelle. Il doit intégrer une considération spatiale afin de s'assurer de la représentativité des résultats. Ceci impose une double contrainte :

- les concentrations moyennes en ETM doivent être représentatives de l'ensemble de parcelle (c'est-à-dire de la totalité de sa surface) ;
- la variabilité des concentrations à l'échelle de la parcelle doit pouvoir être évaluée.

Compte tenu des ces impératifs, et comme nous l'avons vu précédemment, parmi les différents types de protocoles d'échantillonnage d'une parcelle, nous avons choisi celui permettant un échantillonnage aléatoire stratifié. Ce type d'échantillonnage engendre une contrainte opérationnelle car il oblige le préleveur à se déplacer sur la totalité de la surface de la parcelle. Cependant, il couvre l'ensemble de la parcelle et accorde autant de poids aux différentes zones définies, ce qui permet d'assurer des résultats représentatifs de l'ensemble de la parcelle.

Considérant le type d'échantillonnage, le protocole développé a donc été baptisé « Protocole d'Echantillonnage Aléatoire Stratifié », PEAS. Pour plus de simplicité, cette terminologie englobera toute la procédure d'échantillonnage, depuis la prise d'essai sur les végétaux collectés en un point de prélèvement jusqu'à la parcelle.

A l'échelle de la parcelle, la démarche de développement d'un protocole repose en premier lieu sur le choix préalable du nombre de points d'échantillonnage et de leurs emplacements. En ce qui concerne le nombre de points, nous avons choisi de le fixer à 25. En effet, ce nombre représente :

- le maximum acceptable d'un point de vue opérationnel (en vue d'une future utilisation par les professionnels);
- le minimum requis pour une analyse géostatistique nécessaire à l'appréhension spatiale de la variabilité des concentrations.

Il est de plus identique à celui utilisé pour le protocole du RMQS, protocole nationalement reconnu et accepté.

L'emplacement de ces 25 points a ensuite été déterminé de façon à ce que d'une part, la grille de prélèvement couvre l'ensemble de la parcelle et d'autre part, les points de prélèvement présentent des interdistances les plus variées possibles. En ce sens, une première grille de prélèvement contenant 20 points générés de façon aléatoire stratifiée et couvrant l'ensemble de la surface de la placette a été définie. Ensuite, une seconde grille de prélèvement contenant 4 points générés eux aussi de façon aléatoire stratifiée a été superposée à la première et enfin un dernier point a été placé aléatoirement sur la placette afin d'obtenir des distances inter-points plus resserrées.

Les différents points de prélèvement ont alors été positionnés sur la parcelle à étudier (figure 3.6) selon la méthodologie suivante :

1/ Les bordures de la parcelle sont redéfinies à 5 mètres au minimum à l'intérieur de la bordure réelle afin d'éviter des prélèvements trop près des bords. Ceci permet d'exclure les tournières, qui correspondent aux espaces réservés pour faire tourner la charrue à sillon, celle-ci pouvant entraîner des végétaux présents aux bords de la parcelle, ou une double dose de semis ou de pulvérisation lors de traitements des cultures. Le retrait des bordures permet également d'éviter toute perturbation extérieure non représentative de la parcelle (végétations extérieures à la parcelle, feuilles des arbres ou des haies qui tombent, ...). La parcelle (corrigée de la bordure) est nommée placette ;

2/ Dans un premier temps, la placette est découpée en 20 sous placettes (division régulière par 5 sur la longueur et par 4 sur la largeur) et les points de prélèvement (type A) sont placés de la manière suivante :

- 4 points de prélèvement sont systématiquement placés au niveau de chaque coin de la placette ;
- 1 point de prélèvement est placé aléatoirement dans chacune des 16 sous placettes restantes ;

3/ La placette est ensuite découpée en 4 « grandes sous placettes » et 1 point est placé aléatoirement dans chacune d'entre elles (type B) ;

4/ Un dernier point est sélectionné aléatoirement dans toute la placette (type C).

Ce protocole mêle ainsi à la fois des paramètres définis mais également un positionnement aléatoire des points, dans chaque sous placette et dans la placette. Ceci permet d'obtenir le jeu de points de prélèvement permettant au mieux d'assurer les critères de représentativité de la surface de la parcelle et de variabilité inter-points.

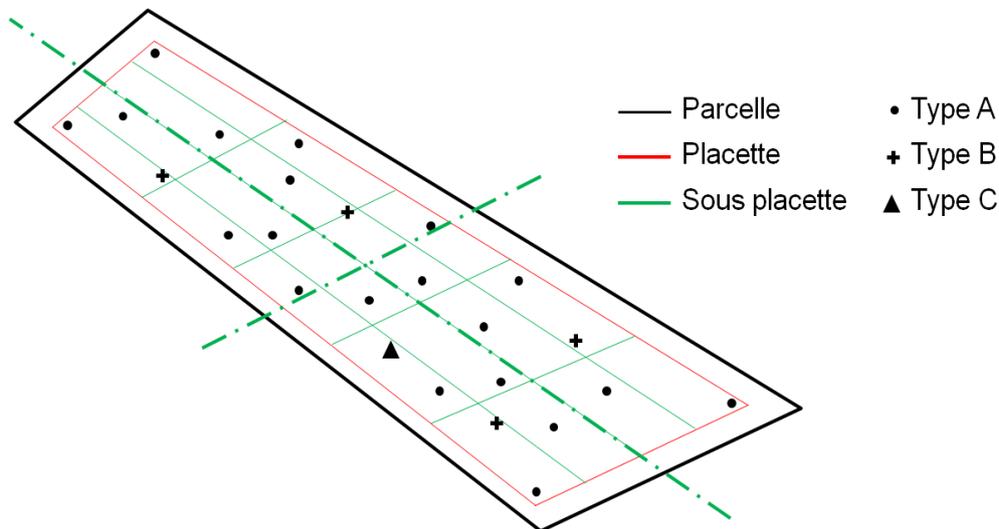


Figure 3.6: Etablissement au champ du PEAS

Le PEAS a également été appliqué aux deux parcelles d'étude précédemment décrites (figure 3.7).

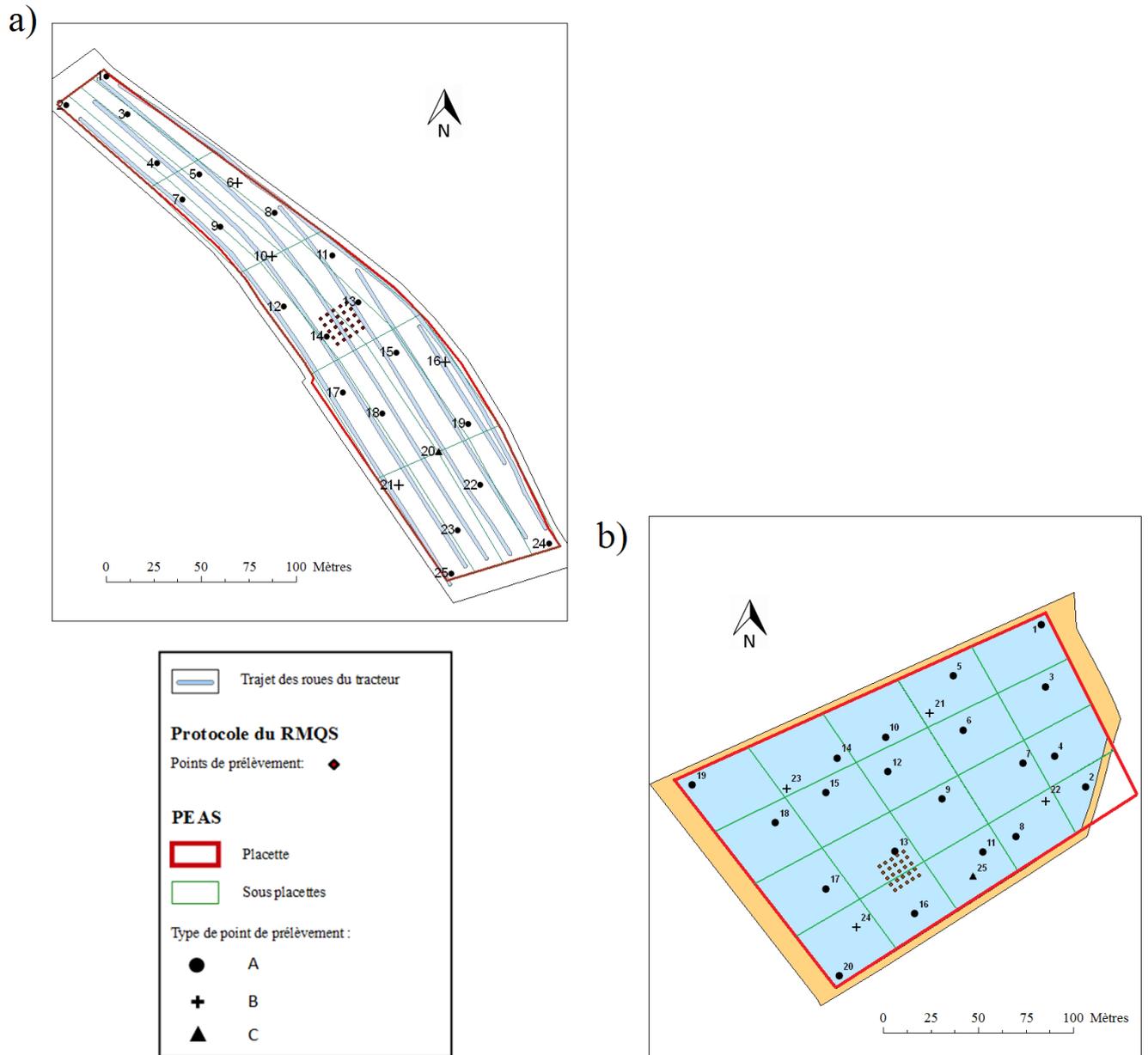


Figure 3.7 : Application du PEAS a) à la parcelle C6 b) à la parcelle CL

De plus, 25 prélèvements supplémentaires effectués suivant une grille systématique issue du protocole du RMQS, ont été ajoutés aux prélèvements précédents afin d'obtenir des informations concernant la variabilité des ETM aux faibles pas d'échantillonnage. Certains de ces points ont également été utilisés pour vérifier les prédictions de distribution spatiale des ETM établies par le PEAS. L'application du protocole du RMQS aux parcelles C6 et CL a également permis de tester le protocole employé jusqu'à présent dans le cadre du RMT QUASAPROVE.

3.3.2 Evaluation du protocole

La démarche d'évaluation a été menée en deux temps. Le protocole a d'abord été appliqué à la parcelle C6 cultivée en blé dur, pour une étude exhaustive de la représentativité moyenne et de la variabilité spatiale des concentrations à l'échelle de parcelle. Puis, sa robustesse a été appréhendée, en particulier en l'appliquant à un type de culture différent et à une parcelle (géométrie, nature du sol) différente (Annexe 2). Les prélèvements de plantes ont été effectués selon les protocoles d'échantillonnage définis précédemment. Les concentrations en ETM ont été déterminées pour chacun des échantillons issus des 25 points.

3.3.2.1 Caractérisation statistique des jeux de concentrations

Cette caractérisation permet tout d'abord de vérifier la pertinence des jeux de données au regard de considérations environnementales. Elle constitue surtout un prérequis indispensable au choix des statistiques les plus pertinentes à utiliser ultérieurement pour l'évaluation du protocole. Elle permet également de vérifier que le protocole respecte l'indépendance et/ou la dépendance des jeux de données générés par l'analyse des ETM sur un même ensemble d'échantillons (c'est-à-dire qu'il n'engendre pas de biais).

Tout d'abord les valeurs moyennes, médianes, maximales et minimales relatives à l'ensemble des concentrations ont été calculées et sont reportées dans le tableau 3.1. Complémentairement la normalité des distributions statistiques des concentrations en ETM dans les sols et dans les grains a été étudiée en utilisant le test de Shapiro–Wilk et les résultats sont également reportés dans ce tableau.

Tableau 3.1 : Concentrations en ETM dans le sol et dans les grains en mg kg⁻¹ de matière sèche et type de distribution

PEAS	Cadmium	Cuivre	Zinc
Sol			
Minimum	0,19 ± 0,04	7,3 ± 0,4	18 ± 4
Maximum	0,47 ± 0,05	40,2 ± 0,4	76 ± 4
Moyenne	0,28 ± 0,03	16,9 ± 0,5	48 ± 2
Médiane	0,26 ± 0,02	14,7 ± 0,3	42 ± 2
Etendue relative (%)	60 ± 5	82 ± 5	76 ± 5
Distribution statistique	Non normal	Lognormal	Normal
Grains de blé dur			
Minimum	0,037 ± 0,007	6 ± 2	26 ± 3
Maximum	0,11 ± 0,03	8 ± 2	39 ± 4
Moyenne	0,07 ± 0,02	7 ± 2	30 ± 3
Médiane	0,06 ± 0,02	7 ± 2	31 ± 4
Etendue relative (%)	66 ± 5	25 ± 5	33 ± 5
Distribution statistique	Lognormal	Normal	Lognormal

D'un point de vue des transferts sol-plante, l'ensemble des concentrations obtenues dans les sols et dans les grains sont inférieures aux réglementations en vigueur. Les échantillons ne sont donc pas contaminés et ne présentent aucun risque pour la qualité sanitaire en ce qui concerne les teneurs en ETM. Les valeurs des facteurs de transfert (FT) sol-grains calculées à partir de ces concentrations sont respectivement de 0,12 - 0,48 pour le cadmium, 0,16 - 0,82 pour le cuivre et 0,41 - 1,41 pour le zinc. Elles sont du même ordre de grandeur, mais en moyenne plus importantes que celles pouvant être calculées à partir des données dans la littérature : 0,10 pour le cadmium, 0,27 pour le cuivre et 0,34 pour le zinc [55,97,107].

Les distributions des ETM suivent généralement une loi normale ou lognormale, ce qui signifie que les concentrations sont centrées sur la moyenne et la médiane dans le cas d'une distribution normale, ou sur la médiane seulement dans le cas d'une distribution lognormale. Ceci traduit l'absence d'anomalie de concentrations dans les différents échantillons. La distribution non normale du cadmium dans les sols révèle la présence d'anomalies dans le jeu de données, mettant en avant la présence d'hétérogénéités marquées. Le cadmium présente une hétérogénéité semblable dans le sol et dans les grains. Par contre, l'hétérogénéité du cuivre et du zinc est 2 à 3 fois plus grande dans le sol que dans les grains. L'historique cultural dont nous avons pu disposer ne permet pas de trouver une explication aux hétérogénéités (en concentrations totales) parfois fortes révélées lors de cette étude.

Les jeux de données sol et grains semblent donc en première approche indépendants. Une analyse en composantes principales (ACP) a été complémentaiement réalisée pour appréhender de façon statistique et globale leurs dépendances (corrélations)/indépendances. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3.8.

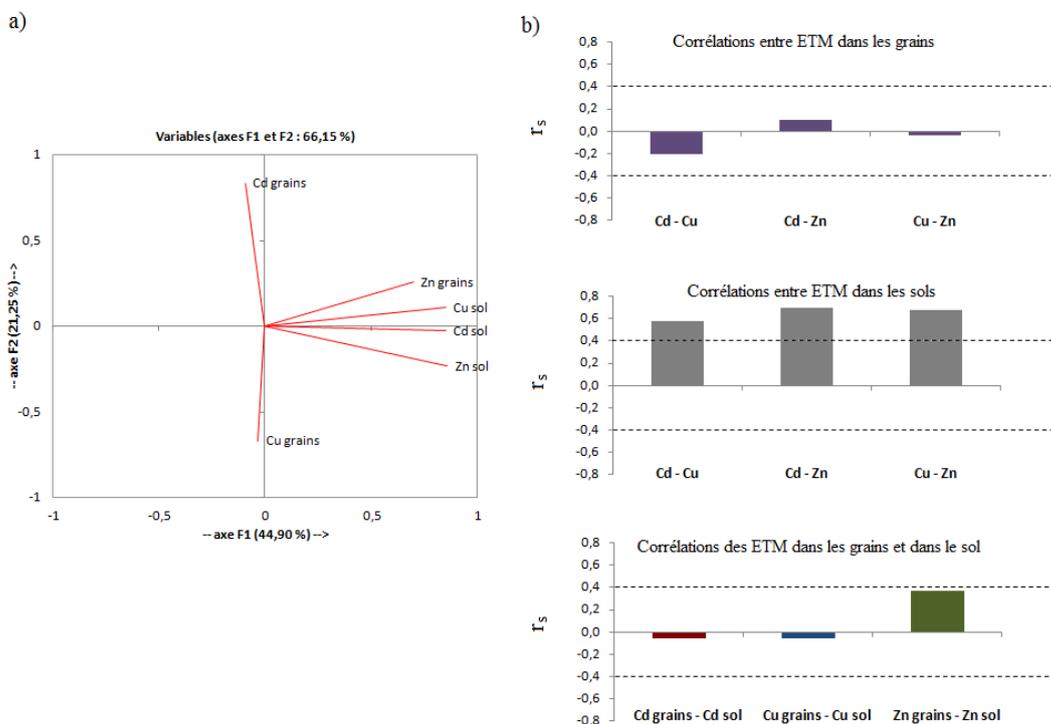


Figure 3.8 : Analyse en composantes principales des concentrations en ETM dans le sol et dans les grains : a) cercle des corrélations et par b) histogrammes de corrélation.

(Nombre de données : $6 \times 25 = 150$)

Sur le cercle des corrélations, les différentes concentrations ont été représentées selon les composantes principales les plus significatives (axe 1, 45 % et axe 2, 21 %) c'est-à-dire les composantes qui expliquent le plus les variations de concentrations observées entre jeux de données. Ceci permet de visualiser au mieux les correspondances. Une corrélation significative apparaît ainsi entre les concentrations en ETM présents dans le sol. Cela peut être expliqué par le fond géochimique qui apporterait cadmium, cuivre et zinc de façon similaire. Le cercle de corrélations permet également de confirmer que de façon générale, il n'y a pas de corrélation significative entre les concentrations totales en un élément dans le sol et dans les grains de blé. Il met enfin en évidence l'absence de corrélation entre les concentrations dans les grains entre-elles. La représentation des histogrammes de corrélation permet de compléter la visualisation des correspondances entre facteurs considérés de façon plus quantitative. Les seuils de significativité des corrélations ($r_s = 0,398$) sont représentés sur chaque graphique par des traits discontinus. Ces histogrammes permettent de confirmer l'absence de corrélation d'une part entre la concentration d'un ETM dans le sol et celle dans les grains, et d'autre part, entre les concentrations de chaque ETM dans les grains. Ceci montre que le PEAS n'induit pas de dépendance et/ou d'indépendance systématique entre jeux de données, et que de ce point de vue, il est non biaisé.

3.3.2.2 Représentativité du protocole à la parcelle

L'objet de cette partie est de vérifier que le nombre de points issus du PEAS ainsi que leurs localisations permettent d'obtenir :

- une valeur moyenne de la concentration en ETM dans les grains représentative de la parcelle ;
- une évaluation de la variabilité spatiale des concentrations.

Dans un premier temps, des échantillons composites de grains ont été constitués en triplicat au laboratoire et ont été analysés. Les concentrations en ETM obtenues ont été moyennées (tableau 3.2) et comparées à la moyenne des concentrations obtenues sur la totalité des points de prélèvement.

Tableau 3.2 : Comparaison de la moyenne des concentrations en ETM dans les grains (mg kg^{-1}) avec les concentrations en ETM dans les échantillons composites de grains

	Cadmium	Cuivre	Zinc
Moyenne des composites	$0,065 \pm 0,004$	7 ± 1	$33,0 \pm 0,4$
Moyenne des 25 points du PEAS	$0,07 \pm 0,01$	7 ± 2	30 ± 3

La moyenne des concentrations en ETM sur chaque point de prélèvement est significativement identique à celle des composites. Le nombre et la disposition des points de prélèvement du PEAS permettent donc une évaluation représentative de la concentration moyenne des ETM contenus dans les grains à l'échelle de la parcelle.

Dans un second temps, une étude variographique a été effectuée, afin de vérifier que le nombre de points, leurs dispositions et les distances inter-points permettent d'appréhender la variabilité des concentrations en ETM sur la parcelle. Les variogrammes ont été construits en prenant en compte le type (normal, log-normal) des distributions statistiques des concentrations (tableau 3.1). Ils sont présentés dans la figure 3.9.

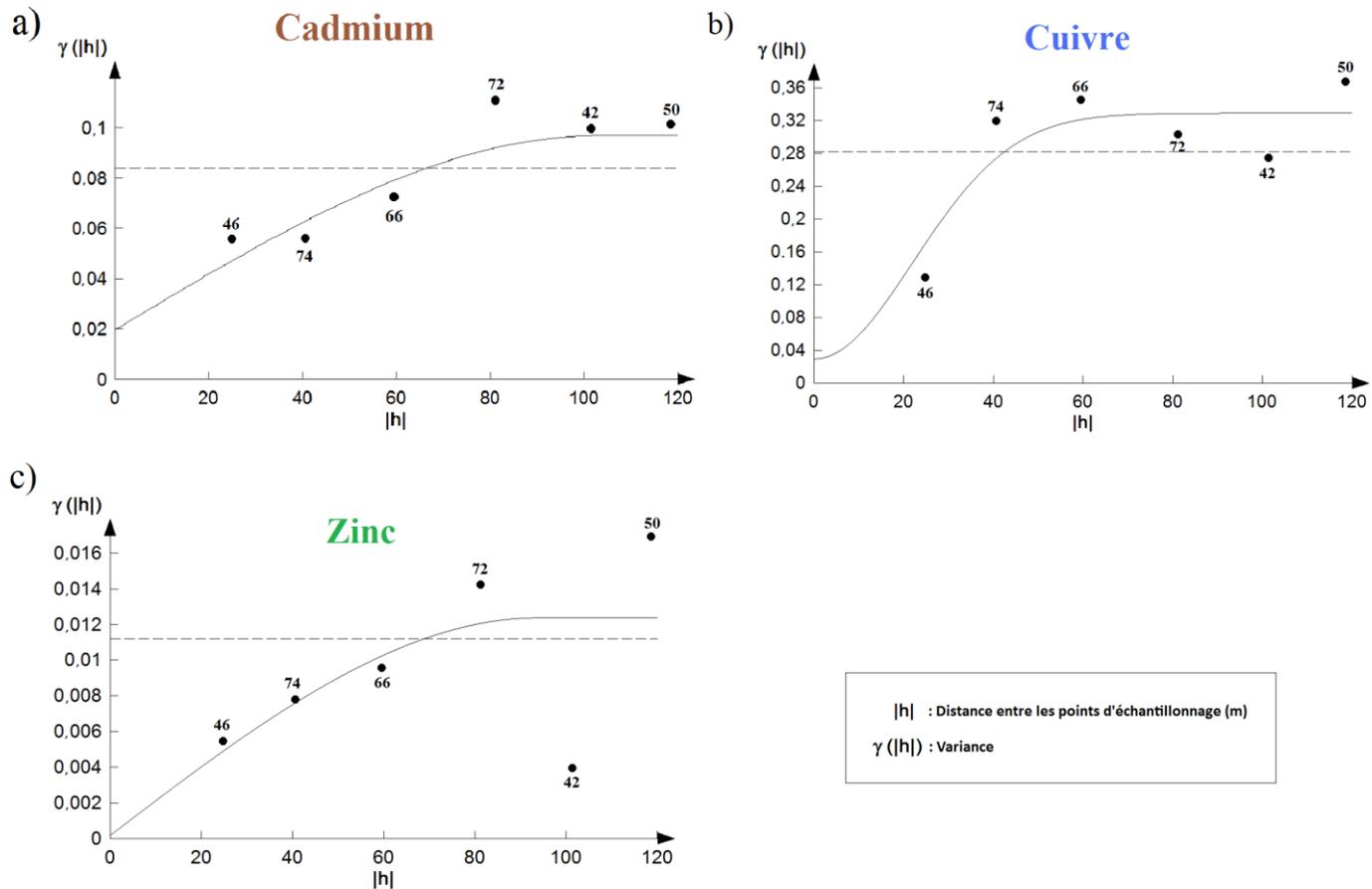


Figure 3.9 : Variogrammes typiques des concentrations dans les grains obtenus pour a) le cadmium, b) le cuivre et c) le zinc

Les variogrammes représentés sont multi-directionnels. Ils ont été ajustés selon un modèle sphérique pour le cadmium et le zinc et un modèle Gaussien « quasi sphérique » pour le cuivre, en fonction de la variabilité au sein de chaque jeu de concentrations. Le nombre associé à chaque point représente le nombre de couples séparés d'une interdistance de classe de 20 m. Cette inter-distance a été fixée de façon à avoir un nombre de couples suffisamment grand pour obtenir une variance de concentrations inter-points significative. Plus ce nombre est important et plus le point représenté a un poids statistique important dans la modélisation du variogramme. Complémentairement, les gradients de concentrations entre deux points peuvent être évalués en accordant un poids statistique aux points voisins plus ou moins importants selon leur éloignement. Généralement, un variogramme expérimental n'est pas fiable pour des distances supérieures à la moitié du diamètre de la parcelle car le nombre de couples de points n'est alors plus suffisant et augmente artificiellement la variance de la

valeur γ (h) estimée. C'est pourquoi dans notre cas la distance maximale d'interprétation est limitée à 120 m, distance inférieure à celle de la diagonale de la parcelle (340 m) [187]. Enfin, le trait discontinu horizontal sur la figure 3.9 représente la variance totale des échantillons.

Dans le cas présent, la variance totale ($0,53 \text{ mg kg}^{-1}$) s'avère être inférieure à la variance analytique (2 mg kg^{-1}) pour le cuivre. Le variogramme présenté n'est donc pas significatif et la parcelle présente des concentrations homogènes en cuivre. En ce qui concerne le cadmium et le zinc, aucun effet de pépite significatif n'est observé sur les variogrammes, les variances étant inférieures aux variances analytiques (20 % pour le cadmium et 10 % pour le zinc). Les portées sont atteintes pour des interdistances de $(103 \pm 3) \text{ m}$ et $(94 \pm 4) \text{ m}$ pour ces deux éléments. Ces portées s'avèrent être supérieures au pas d'échantillonnage utilisé par le PEAS pour cette parcelle (20 mètres au minimum). Ceci permet d'envisager une spatialisation des données fournies par le protocole. Les cartographies des distributions spatiales des ETM à l'échelle de la parcelle ont alors été réalisées et sont présentées figure 3.10.

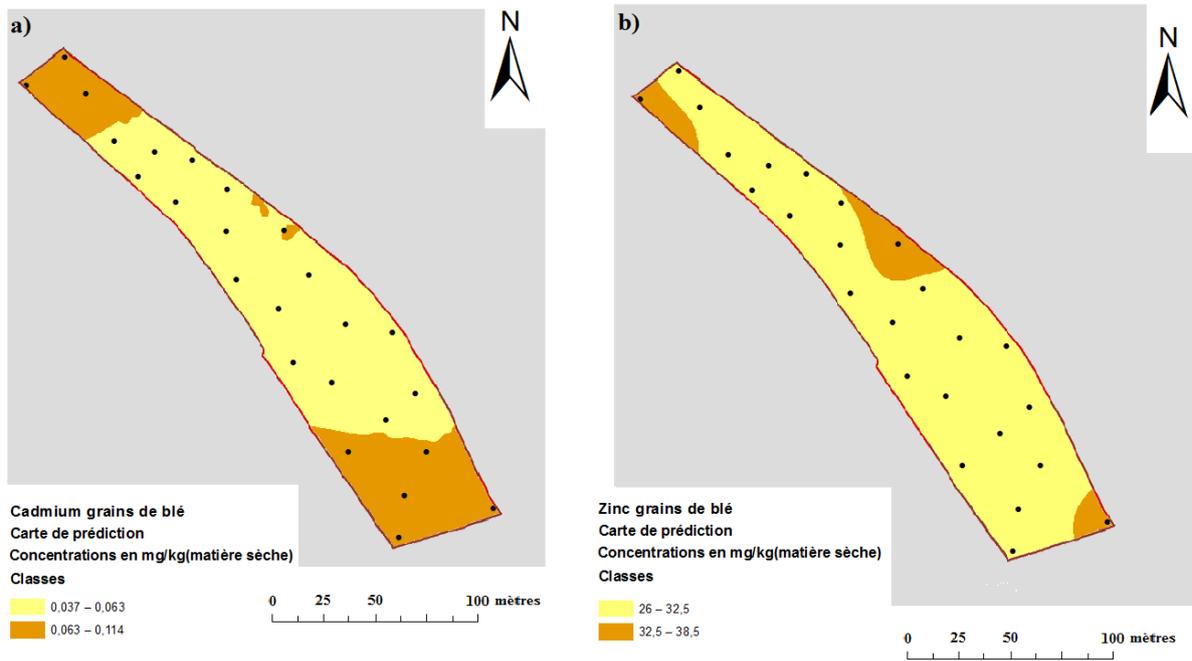


Figure 3.10 : Cartographie des distributions spatiales des ETM dans les grains de blé,
a) Cadmium b) Zinc

Les classes de concentrations ont été établies de façon à englober $2 \times$ l'incertitude analytique (%), ce qui permet d'éviter la visualisation d'hétérogénéités non significatives.

D'un point de vue statistique, les modèles préétablis pour réaliser ces cartographies ont été évalués en prenant en compte la précision de l'ajustement (coefficient de détermination R^2), la signification globale du modèle (F_{obs}) et une analyse des résidus. Globalement les R^2 sont respectivement supérieurs à 0,81 et les F_{obs} (> 21) sont supérieurs à la valeur test de $\approx 4,5$. L'histogramme des résidus (non montré) présente des variations aléatoires, typiques d'absence de biais. Complémentairement, les valeurs de concentrations en ETM obtenues expérimentalement à partir de prélèvement hors PEAS et les valeurs obtenues via le modèle et la spatialisation ont été comparées. Elles se sont avérées être statistiquement identiques. L'ensemble de cette procédure a permis de valider ces deux modèles et la spatialisation réalisée pour le cadmium et le zinc.

Au delà de l'intérêt à transformer de la connaissance ponctuelle (25 points d'échantillonnage) en connaissance continue, et complémentairement aux variogrammes, les cartes permettent de mettre en évidence en les visualisant les éventuelles hétérogénéités de concentrations. Dans le cas présent, elles révèlent des distributions spatiales du cadmium et du zinc assez semblables entre elles. Les parties nord - ouest et sud - est de la parcelle s'avèrent plus concentrées, mais la distribution moyenne est homogène dans la partie centrale qui représente aussi la majeure partie (en termes de surface) de la parcelle. Les concentrations correspondantes dans cette zone sont respectivement de $(0,05 \pm 0,01) \text{ mg kg}^{-1}$ et $(29 \pm 3) \text{ mg kg}^{-1}$ pour le cadmium et le zinc. Le cuivre quant à lui est homogène sur l'ensemble de la parcelle avec une valeur moyenne de concentration de $(7 \pm 2) \text{ mg kg}^{-1}$.

Au bilan à ce stade de l'étude, la démarche suivie, combinant une évaluation des concentrations moyennes et une étude variographique, permet de montrer que le PEAS, pour la parcelle considérée, satisfait au cahier des charges, à savoir qu'il permet i) d'obtenir une valeur moyenne des 25 points de concentration identique à celle d'échantillons composites représentatifs de la parcelle, ii) d'établir une information fiable quant à la variabilité des concentrations à la parcelle, y compris pour des variabilités relativement faibles mais significatives. De plus, lorsque cette variabilité est supérieure au pas d'échantillonnage minimum, une spatialisation visualisée par des cartes de concentration a pu être réalisée et statistiquement validée. Le processus d'évaluation peut donc être poursuivi.

3.3.2.3 Résolution du protocole

Dans sa phase d'évaluation initiale, il s'avère intéressant d'étudier le PEAS aux faibles pas d'échantillonnage (échelle dite locale) afin de chercher la valeur minimale de représentativité spatiale, que nous avons qualifiée de « résolution ». En d'autres termes, ceci permet de définir les limites spatiales d'utilisation du PEAS pour un élément donné, dans une parcelle donnée. Lorsque la résolution peut être évaluée, elle permet de donner la mesure de la représentativité locale du protocole d'échantillonnage. Si la résolution ne peut être évaluée, cela indique que :

- soit le protocole est uniquement représentatif de la variabilité à l'échelle de la parcelle et non à une échelle inférieure du fait de très fortes variabilités locales ;
- soit cette notion est sans objet du fait de l'absence de variabilité de l'échelle locale à l'échelle de la parcelle.

Pour évaluer la résolution, une analyse statistique a été effectuée en considérant complémentairement au PEAS une grille systématique de 25 points de prélèvement et 20 m de coté, avec une distance inter-point minimale de 2 m (grille RMQS). Cette grille a été placée pour des raisons pratiques d'accessibilité au centre de la parcelle. Les parties consommables des plants de blé récoltés selon cette grille ont également été analysées et les valeurs de concentrations en ETM déterminées point par point. Des variogrammes ont été à nouveau réalisés et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau 3.3 et comparées avec celles obtenues par le PEAS seul. Pour faciliter les comparaisons, les effets de pépité ont été convertis en pourcentages, en divisant les valeurs obtenues en $(\text{mg kg}^{-1})^2$ par les variances totales des concentrations en ETM.

Tableau 3.3 : Comparaison des caractéristiques des variogrammes obtenus après ajout de la grille systématique

	PEAS			PEAS + grille systématique		
	Type	Effet de pépité (%)	Portée (m)	Type	Effet de pépité (%)	Portée (m)
Cadmium	Sphérique	< 20%	103 ± 3	Sphérique	29 ± 20	21 ± 4
Cuivre	Quasi sphérique	Non significatif		Quasi sphérique	Non significatif	
Zinc	Sphérique	< 10%	94 ± 4	Plat	Homogène	

Les variogrammes ont été obtenus à partir de types de modèles identiques dans les deux cas. L'ajout de la grille avec un faible pas d'échantillonnage a pour effet attendu de diminuer la distance d'autocorrélation et/ou de mettre en évidence d'éventuels effets de pépité décelables seulement à faible distance. Les modifications ainsi induites doivent permettre d'évaluer la valeur minimale (ou limite) de représentativité spatiale du protocole. La portée est effectivement significativement réduite pour le cadmium. Elle est du même ordre de grandeur que la distance minimale inter-point du PEAS. La résolution du protocole d'échantillonnage, égale à son pas d'échantillonnage minimum, s'avère donc suffisante pour décrire convenablement la variabilité locale des concentrations en cet élément. Concernant les 2 autres ETM, les variogrammes s'avèrent non significatifs. Le résultat obtenu pour le cuivre confirme que la parcelle est homogène de l'échelle locale (faible pas d'échantillonnage) à l'échelle de la parcelle. La résolution n'a donc pas dans ce cas de limite inférieure. Pour le zinc, le résultat obtenu précédemment a mis en exergue un gradient de concentration faible à l'échelle de la parcelle, environ 2 fois supérieur à l'étendue de l'incertitude expérimentale. Le variogramme établi en incluant la grille systématique permet de montrer qu'il n'existe pas de gradient de concentration aux pas d'échantillonnage plus faibles. Ceci est compréhensible car la variance totale à une échelle plus petite est nécessairement réduite. De plus, la grille a été positionnée au centre de la parcelle, dans une zone où la concentration ne varie pas sur la majorité de la surface prise en compte. Comme pour le cuivre, la résolution n'a pas de limite inférieure du fait de l'homogénéité de la concentration.

3.3.2.4 Robustesse du protocole

La robustesse d'un protocole d'échantillonnage peut être évaluée complémentirement vis à vis d'un changement :

- du positionnement des points d'échantillonnage, pour le même type de culture et la même parcelle. Il s'agit alors d'évaluer l'ergodicité du protocole, en définissant au moins une nouvelle grille de points de prélèvement ;
- du type de culture ou de géométrie de parcelle.

Dans tous les cas, la robustesse est évaluée en examinant la représentativité (moyenne et/ou spatiale) du protocole à l'échelle de la parcelle.

Pour des raisons pratiques (impossibilité de retourner au champ pour une seconde campagne d'échantillonnage sur la parcelle C6), l'ergodicité a été évaluée de façon théorique et pour la moyenne des concentrations uniquement, alors que la robustesse selon le type de culture et de parcelle a été évaluée pour la moyenne et la variabilité spatiale.

En ce qui concerne l'ergodicité, deux séries de 25 points de prélèvement ont été générées, suivant les modalités du PEAS, sur l'ensemble de la parcelle (tableau 3.4). La concentration globale à l'échelle de la parcelle a été calculée pour ces deux séries (nommées ci-après deuxième et troisième séries) en utilisant la concentration de chaque ETM issue de la modélisation. Elle a ensuite été comparée avec les résultats issus des analyses des échantillons collectés selon le PEAS lors de la campagne de prélèvement (2011, blé dur sur parcelle C6).

Tableau 3.4 : Evaluation de l'ergodicité théorique du PEAS en effectuant des nouveaux tirages de points de prélèvement PEAS

Moyenne en mg kg ⁻¹ calculée :		Cadmium	Cuivre	Zinc
A partir des concentrations		0,07 ± 0,02	7 ± 2	30 ± 3
A partir de la modélisation	Première série de points générés	0,07 ± 0,02	7 ± 2	31 ± 3
	Deuxième série de points générés	0,07 ± 0,02	6 ± 2	31 ± 3
	Troisième série de points générés	0,07 ± 0,02	6 ± 2	30 ± 3

L'homogénéité (c'est-à-dire l'égalité statistique) observée des valeurs des concentrations moyennes en ETM dans les grains de blé permet de vérifier l'ergodicité théorique du PEAS. Compte tenu de la démarche suivie, la modélisation s'avère donc robuste.

En ce qui concerne la robustesse expérimentale du PEAS, elle a été vérifiée pour une culture différente (tournesol) sur la même parcelle (C6) et pour une parcelle différente (CL) et la même culture que celle qui a servi à évaluer initialement le protocole (blé). La même démarche d'évaluation que celle décrite précédemment (paragraphe 3.3.2.2) a été suivie. Les statistiques descriptives et les résultats de l'analyse de la distribution spatiale des ETM obtenus sont résumés dans le tableau 3.5. Complémentairement, pour vérifier la représentativité des moyennes de concentrations, des échantillons composites ont été préparés et les concentrations en ETM de ces composites ont été comparées aux moyennes des concentrations ETM issus des points de prélèvement du PEAS (figure 3.11).

Complémentairement, la prédiction des distributions spatiales réalisée avec les points du PEAS a été vérifiée par comparaison des valeurs calculées via le modèle avec des valeurs expérimentales obtenues sur des points de prélèvement autres que ceux du PEAS (points de la grille du RMQS).

Tableau 3.5 : Analyses descriptives des données

PEAS	Cadmium	Cuivre	Zinc
Grains de tournesol - Parcelle C6			
Minimum	0,08 ± 0,02	17 ± 4	41 ± 5
Maximum	0,32 ± 0,07	33 ± 7	85 ± 9
Moyenne	0,19 ± 0,04	23 ± 5	63 ± 7
Médiane	0,19 ± 0,04	24 ± 5	63 ± 7
Etendue relative (%)	75 ± 5	48 ± 5	52 ± 5
Distribution	Normal	Normal	Normal
Grains de blé dur - Parcelle CL			
Minimum	0,15 ± 0,03	3,9 ± 0,8	15 ± 3
Maximum	0,8 ± 0,2	7 ± 1	30 ± 6
Moyenne	0,34 ± 0,08	5 ± 1	22 ± 4
Médiane	0,31 ± 0,07	5 ± 1	23 ± 3
Etendue relative (%)	81 ± 5	44 ± 5	50 ± 5
Distribution	Lognormal	Normal	Normal

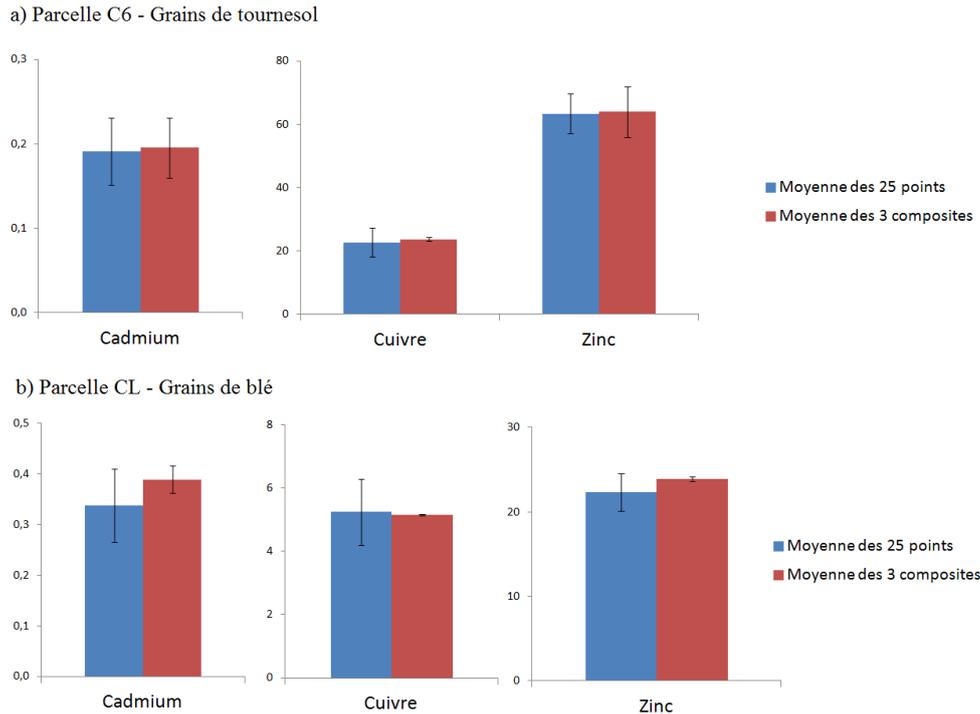


Figure 3.11 : Comparaison de la moyenne des concentrations en ETM dans les grains obtenue par le PEAS avec les concentrations en ETM dans les échantillons composites de grains pour a) le tournesol sur la parcelle C6 et b) le blé sur la parcelle CL

D'un point de vue des transferts sol-plante, les concentrations en ETM obtenues dans la parcelle C6 pour les grains de tournesol (tableau 3.5) sont supérieures à celle obtenues pour les grains de blé (tableau 3.1). Les valeurs des facteurs de transfert sol-plante calculées à partir de ces concentrations sont respectivement de 0,24 - 1,34 pour le cadmium, 0,41 - 3,82 pour le cuivre et 0,80 - 3,13 pour le zinc. Elles sont en accord avec les valeurs moyennes de FT pouvant être calculées à partir des données dans la littérature : 0,98 pour le cadmium, 1,65 pour le cuivre et 0,87 pour le zinc [55,97,107]. L'examen des étendues relatives obtenues pour les grains de blé sur les deux parcelles montre une variabilité des concentrations en ETM légèrement plus prononcée dans la seconde parcelle considérée (CL) : par exemple 81 % (CL) contre 66 % (C6) pour le cadmium. Le PEAS est donc capable de rendre compte de variabilités différentes.

D'un point de vue statistique, les distributions s'avèrent être normales ou lognormales. Aucune anomalie n'est donc constatée pour les différents jeux de concentrations qui apparaissent relativement homogènes, sans variabilité localement forte. L'égalité des concentrations obtenues à partir d'une moyenne à la parcelle et des échantillons composites permet de montrer que le nombre et la disposition des points de prélèvement générés par le PEAS permettent une évaluation représentative de la concentration moyenne des ETM contenus dans les grains à l'échelle de la parcelle, que cela soit pour une culture et/ou pour une parcelle différente(s).

Pour appréhender la variabilité spatiale, les variogrammes ont été réalisés pour les grains de blé et de tournesol dans les deux parcelles (non montrés).

En ce qui concerne le cadmium dans les grains de blé, son variogramme présente un modèle Gaussien significatif avec un fort effet de pépite significatif (variance supérieure à la variance analytique). La portée est atteinte pour une distance interpoint (105 ± 4) m supérieur au pas d'échantillonnage minimum (20 m sur les deux parcelles).

Il existe donc à l'échelle locale une variabilité supérieure à la variabilité globale sans autocorrélation possible. Dans le même temps, il existe une autocorrélation à plus grande échelle. Cette apparente contradiction montre que sur certains points il y a une forte variabilité qui n'est pas généralisée à l'échelle de la parcelle. Une cartographie s'avère donc délicate. Dans ce cas, il serait intéressant, en ayant repéré les points de fortes concentrations, de refaire un échantillonnage dans la ou les sous placettes correspondantes. Il est intéressant de noter que le PEAS parvient à mettre en évidence ces « accidents de concentration ».

Concernant le cuivre, son variogramme dans les grains de blé de la parcelle CL présente un modèle sphérique significatif, sans effet de pépite. La portée est atteinte pour une distance interpoint de ($76 + 4$) m, supérieure au pas d'échantillonnage minimum. Ceci permet donc d'envisager une spatialisation des données fournies par le PEAS, présentée dans la figure 3.12.

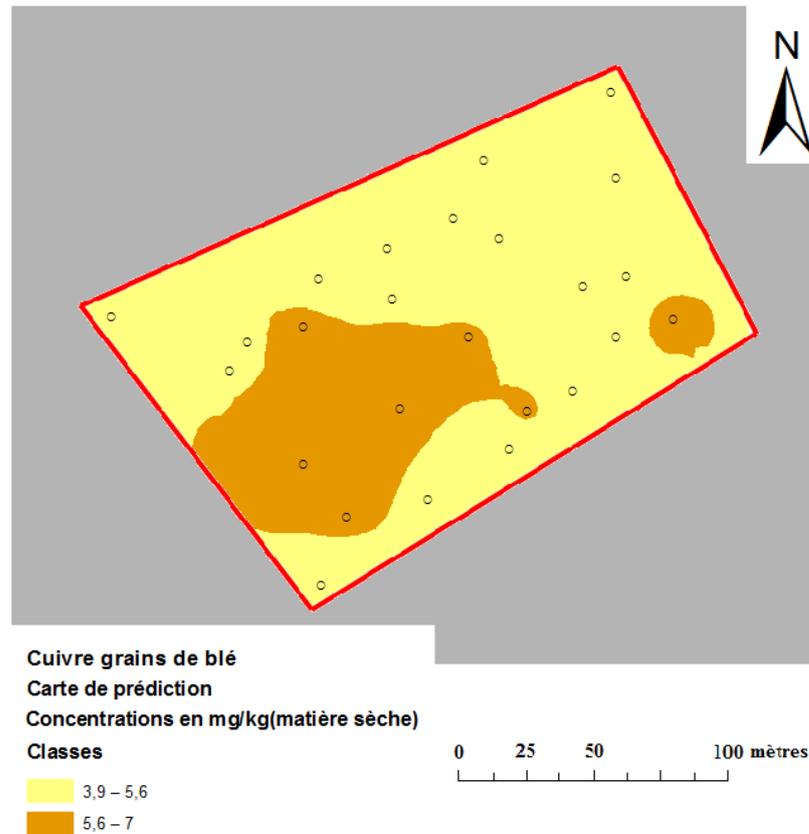


Figure 3.12 : Distribution spatiale du cuivre dans les grains de blé de la parcelle CL

Le modèle utilisé pour réaliser cette carte a été statistiquement évalué, de façon similaire à celle détaillée précédemment (paragraphe 3.3.2.2). Le modèle apparaît être précis ($R^2 = 0,89$), sans biais (histogramme des résidus montrant des variations aléatoires), et significatif ($F_{obs} = 41 > F_{tab}$). Le modèle peut donc être validé. Ainsi, la variabilité spatiale faible mais significative peut être spatialisée afin de visualiser l'hétérogénéité du cuivre dans les grains de blé à l'échelle de la parcelle CL.

Tous les autres variogrammes sont plats, les variances spatiales étant égales aux variances totales de l'échantillon. Cela signifie qu'il n'y a aucun lien (pas d'autocorrélation) apparent entre les concentrations des ETM. De plus, il existe un fort effet de pépité supérieur à la variance analytique. Les concentrations apparaissant variées de façon aléatoire d'un point à l'autre à l'échelle de la parcelle, une cartographie (interpolation) ne peut donc pas être établie. Seule une cartographie point par point peut être effectuée mais elle ne donnera aucune information sur les distributions spatiales des concentrations (gradients) en ETM entre les points.

Il est intéressant de noter que cette distribution spatiale dans cette parcelle est totalement différente que pour les mêmes ETM sur la parcelle précédente (C6) ou sur la même parcelle mais pour une culture différente. Dans le cas de la parcelle C6 (cultures différentes), cette différence pourrait être expliquée par la forte présence constatée de tournesol sauvage induisant de fait une inhomogénéité sur la nature de la culture. En ce qui concerne la même culture mais sur deux parcelles différentes, il est probable que les précédents culturaux soient responsables de la forte hétérogénéité de la parcelle CL.

Au bilan, le PEAS apparaît pouvoir donner des concentrations moyennes représentatives de la parcelle, pour deux types de cultures différentes et deux parcelles différentes. Il permet aussi de fournir des informations quant à la variabilité spatiale, informations s'avérant être cohérentes (convergentes) au regard des différents tests statistiques réalisés. Ces résultats permettent également de borner (borne inférieure) le domaine de validité du PEAS. Ainsi, s'il est bien représentatif à la parcelle, le PEAS peut également fournir, a minima pour ces plantes et parcelles, une information à cette même échelle concernant la variabilité des concentrations.

Enfin d'un point de vue environnemental, ces observations illustrent l'indépendance des distributions spatiales en ETM dans les grains de blé et de tournesol pour une même parcelle ou l'indépendance des distributions spatiales pour une même culture et une parcelle différente, soulignant donc que la biodisponibilité est propre à l'espèce végétale considérée et au milieu dans laquelle elle est cultivée.

3.4 Bilan

Le protocole d'échantillonnage aléatoire stratifié (PEAS) proposé et évalué dans ce chapitre permet tout d'abord de ne prélever au champ que la quantité d'échantillons minimale (2 épis de blé ou 10 grains de tournesol sur un seul capitule) nécessaire pour assurer la représentativité en chaque point de prélèvement. A l'échelle de la parcelle, le PEAS s'avère être un outil satisfaisant pour déterminer, avec un faible nombre de points de prélèvement, non seulement la concentration moyenne, mais également la variabilité des concentrations en ETM dans les grains à l'échelle de la parcelle. Ses conditions opératoires, choisies au départ en fonction de l'acceptabilité des professionnels à l'utiliser, permettent *in fine* de disposer d'un outil opérationnel, dont le domaine spatial d'utilisation peut être évalué et ajusté au cas par cas, c'est-à-dire pour chaque parcelle et chaque type de parcelle, et en fonction des besoins. Ainsi, en premier lieu, le PEAS permet de savoir si la parcelle est homogène (aucune variabilité significative) ou hétérogène (variabilité significative) en termes de concentrations en ETM.

Complémentairement, lorsque la variabilité des concentrations est significative à une distance supérieure ou égale au pas d'échantillonnage minimum défini par le PEAS sur une parcelle donnée, une cartographie à l'échelle de la parcelle peut être réalisée, permettant de visualiser de façon statistiquement validée les variations des concentrations intra-parcelle. Si une forte variabilité à l'échelle locale est constatée (fort effet de pépite), cette cartographie ne pourra pas être interpolée mais elle aura le mérite de pouvoir situer les zones potentiellement à problème du fait de fortes concentrations.

Ainsi, si une vision à une échelle locale s'avère nécessaire, le PEAS peut être réappliqué à cette échelle. Il suffit alors de se fixer un pas d'échantillonnage plus faible que celui initialement choisi pour échantillonner la totalité de la parcelle, de façon à obtenir une portée également plus faible, ce choix étant guidé par la portée et la variabilité locale initialement évaluées. Le PEAS s'avère donc être un protocole auto-ajustable, offrant un processus itératif de résolution suffisante à l'échelle spatiale d'étude désirée, parcelle entière (placette) ou sous-placette. Il peut donc constituer une aide à l'obtention des informations nécessaires à l'établissement d'actions correctives si une contamination à l'échelle de la parcelle ou à une échelle plus locale est décelée.

Au delà de la définition d'un protocole d'échantillonnage et de son évaluation par des outils statistiques, les travaux réalisés dans cette partie ont permis de définir une démarche statistique qui, associée à la définition spatiale (choix de l'emplacement des points de prélèvement, incluant le choix du pas d'échantillonnage minimum) du PEAS, font de cet ensemble un système expert d'échantillonnage (Annexe 3).

**Chapitre 4: Détermination du cuivre
total et électrolabile dans les sols
agricoles**

4.1 Introduction

Il n'existe pas de relation directe entre la quantité d'ETM présente dans le sol et la quantité totale de ces mêmes ETM présente dans la plante cultivée dans ce sol. L'objectif de ce chapitre est de développer et d'optimiser une méthode voltammétrique permettant d'évaluer à la fois la quantité d'ETM contenue dans un sol après minéralisation du sol mais également la quantité d'ETM biodisponible contenue dans ce même sol après une étape de lixivation.

4.2 Contexte de l'étude

4.2.1 Choix des électrodes

Récemment, une méthode d'analyse du cadmium par SWASV sur électrode de carbone sérigraphiée a été développée au laboratoire [164,188]. Cette méthode est également adaptée pour les analyses du plomb et du zinc. Cependant, les analyses menées sur le cuivre sont plus problématiques étant donnée la proximité des potentiels d'oxydation du cuivre et du mercure (figure 4.1).

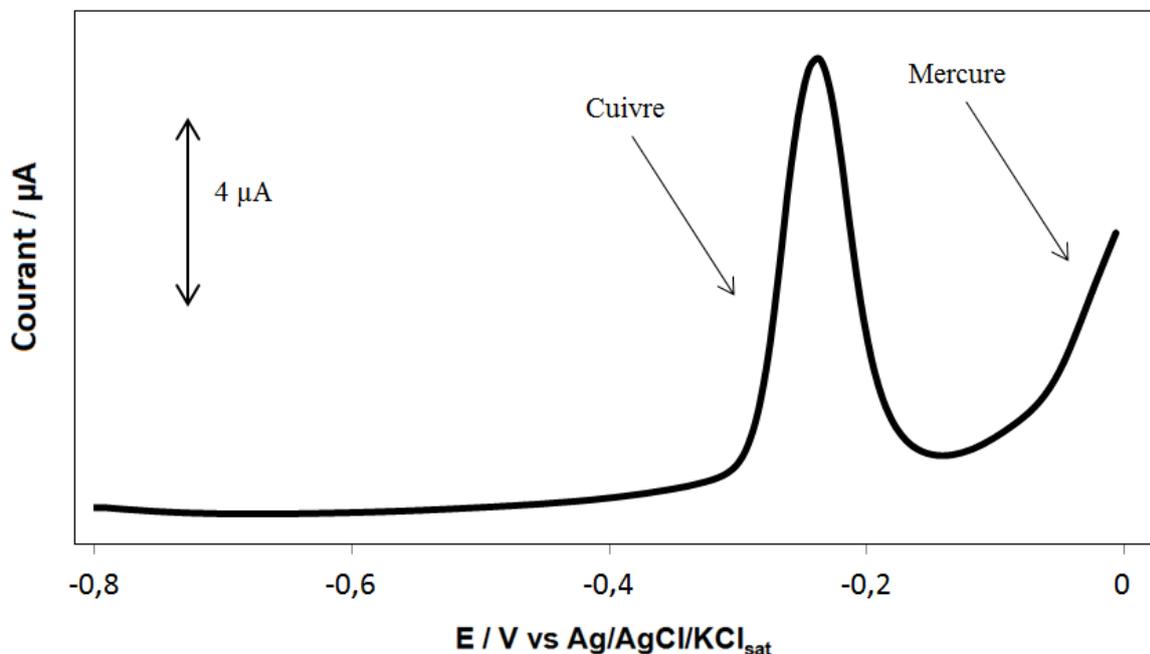


Figure 4.1 : Voltammogramme obtenu par SWASV pour une concentration en cuivre de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ dans du tampon acétate $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Paramètres: Electrodéposition : $-0,8 \text{ V}$ pendant 60 s , temps d'équilibration 30 s , fréquence 25 Hz , pas de 8 mV , amplitude du potentiel 25 mV

Dans ce contexte, l'utilisation d'électrode sérigraphiée (notée SPE, de l'anglais « Screen-Printed Electrode ») permet de palier à ce problème en changeant d'électrode entre chaque mesure, ce qui évite également les contaminations éventuelles d'une analyse à une autre (cf. paragraphe 4.2.1). D'un point de vue environnemental, les électrodes sérigraphiées emploient une quantité de mercure moindre, de l'ordre de 5 µg, par rapport aux méthodes polarographiques (gouttes de mercure). Elles offrent également une meilleure sensibilité des analyses [164,166].

De plus, les électrodes sérigraphiées permettent la miniaturisation du système par rapport aux analyses effectuées en polarographie classique et ainsi la possibilité d'un déplacement sur site. Enfin, l'universalité de la technique peut être exploitée en déposant sur plusieurs natures de supports divers matériaux (mercure, bismuth, or, ...). Elle peut ainsi permettre d'adapter et d'intégrer la technique de sérigraphie dans un procédé industriel déjà existant. Pour l'ensemble de ces raisons, les électrodes sérigraphiées ont été utilisées pour les analyses.

4.2.2 Choix des sols

Les sols étudiés sont issus des parcelles C6 et CL ayant fait l'objet de l'étude présente. Dans ce chapitre, ils sont nommés sol A et sol B respectivement. Les solutions de sol ont été préparées par lixiviation et les concentrations en cuivre électrolabile ont été déterminées après développement et optimisation de la méthode analytique.

Dans la solution de sol, le cuivre est présent sous formes d'espèces libres, labiles ou non labiles. La somme de toutes ces espèces, c'est à dire le cuivre soluble total dans la solution de sol, représente généralement moins de 1 à 2 % de cuivre total présent dans le sol [189,190]. Cette distribution a également été observée lors des expériences réalisées sur les échantillons de sols, objets de cette étude. Les échantillons de sols de vigne sont réputés pour leurs fortes concentrations en cuivre dues aux traitements des cultures par des produits à base de cuivre sous formes dissoutes [186]. Ces échantillons ont été retenus dans l'étude car ils contiennent des concentrations en cuivre élevées, susceptibles d'être suffisantes pour être détectées par la méthode employée. Ces sols, nommés C, D et E sont issus de trois parcelles de vignes situées à Bordeaux. Les caractéristiques physico-chimiques des différents sols sont présentées dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Caractéristiques physico-chimiques des sols agricoles étudiés

Sol	A	B	C	D	E
Type	Limoneux	Limoneux	Limono-sableux	Limono-sableux	Sablo-limoneux
Culture	Blé	Tournesol	Vigne	Vigne	Vigne
pH (H ₂ O)	8,46	8,47	8,01	7,94	7,38
Carbone organique (g kg ⁻¹)	6,84	7,27	5,94	8,88	7,21
Azote total (g kg ⁻¹)	0,73	0,73	0,49	0,67	0,46
Phosphore P ₂ O ₅ (g kg ⁻¹)	0,02	0,02	0,08	0,07	0,08
CEC (cmol kg ⁻¹)	11,3	11,4	8,13	9,14	6,19
Granulométrie (%) :					
Sable (> 0,05 mm)	42,1	39,4	77,0	74,5	82,7
Limon (0,002 - 0,05 mm)	38,4	42,4	9,6	9,7	6,8
Argile (< 0,002 mm)	19,5	18,2	13,4	15,8	10,5

4.3 Développement de la technique

Le potentiel d'oxydation retenu dans la méthode analytique a été choisi suffisamment supérieur à celui du cuivre de façon à l'oxyder totalement à l'électrode. En effet, avec un potentiel trop faible, le cuivre n'est pas totalement oxydé et la mesure est alors sous-estimée. D'un autre côté, le choix d'un potentiel d'oxydation trop important conduit à un risque de l'oxydation du mercure déposé à la surface de l'électrode de travail et donc à la dégradation de cette dernière. Etant donné la proximité des potentiels d'oxydation du cuivre et du mercure (figure 4.1), nous avons choisi de nous placer dans ce dernier cas. De ce fait, la fréquence de remplacement de l'électrode sérigraphiée, appauvrie en mercure au cours des analyses, est donc un paramètre nécessaire afin d'assurer une bonne répétabilité des mesures. De plus, lorsque le mercure est oxydé, il est dissous dans la solution d'analyse et risque de modifier le milieu analytique. En ce sens, la fréquence de renouvellement de la solution a également été considérée comme un paramètre important de notre méthode analytique.

4.3.1 Conditions utilisées

Dans un premier temps, l'étude s'est portée sur la fréquence de remplacement des électrodes sérigraphiées ainsi que sur le renouvellement de la solution à analyser. Pour cela, la répétabilité de mesure a été évaluée par l'estimation du coefficient de variation (RSD, de l'anglais « Relative Standard Deviation »). Le RSD a été calculé à partir des résultats obtenus lors des trois analyses de solution(s) contenant la même concentration en cuivre selon différentes conditions décrites dans les figures 4.2, 4.3, 4.4 et 4.5. Les voltammogrammes correspondant, pour lesquels le blanc a été soustrait, sont présentés dans ces figures.

Cas 1 : même solution - même électrode

L'utilisation de la même solution et la même électrode, pour trois analyses successives, conduit à un RSD de 20 % (figure 4.2). Ces conditions conduisent à l'augmentation de la surface du pic de cuivre avec les répétitions d'analyse. Ces observations démontrent une répétabilité non satisfaisante. Ce phénomène est dû à la proximité des potentiels d'oxydation du cuivre et du mercure générant une redissolution partielle du cuivre adsorbé sur l'électrode vers la solution. Ainsi, le cuivre s'accumule sur l'électrode au fur et à mesure des répétitions d'analyse et il est redissous lors de la mesure suivante.

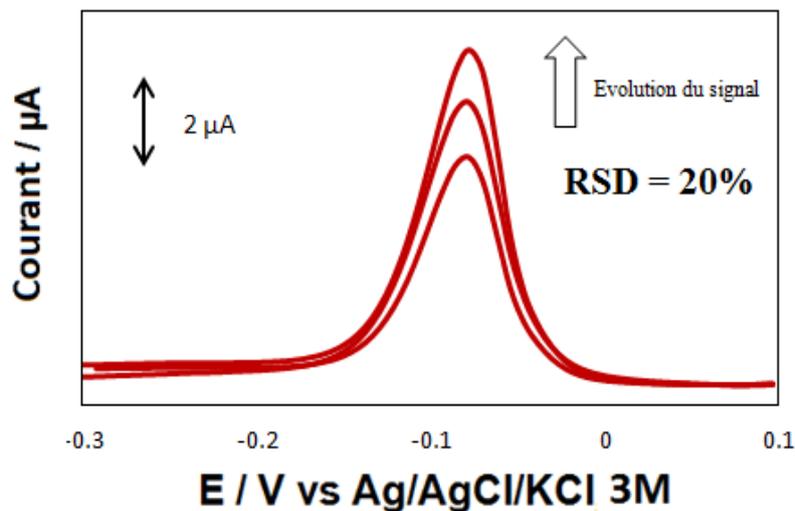


Figure 4.2 : Détermination du cuivre en utilisant la même solution⁷ et la même électrode.

Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1

⁷ Même solution signifie que les trois analyses sont effectuées dans une même solution contenant $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cuivre dans une solution de tampon acétate à $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$

Cas 2 : même solution - électrode différente

Le changement de l'électrode après chaque répétition d'analyse tout en conservant le même milieu analytique précédemment analysé conduit à un RSD qui demeure élevé (figure 4.3). Dans ces conditions, le mercure de l'électrode est redissous dans la solution durant la répétition d'analyse précédente. Il est ensuite partiellement redéposé sur la nouvelle électrode pendant l'étape de déposition du cuivre. Nous pouvons alors constater que le signal varie au fur et à mesure des répétitions conduisant à un RSD non suffisant.

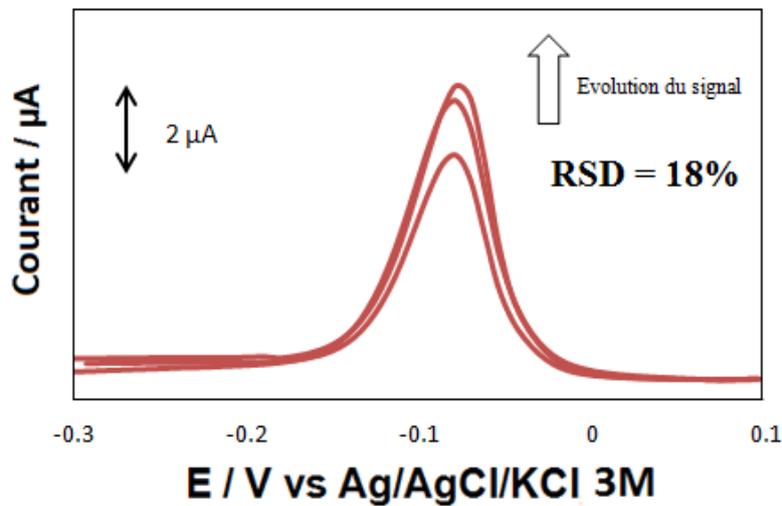


Figure 4.3 : Détermination du cuivre en utilisant la même solution et une électrode différente.

Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1

Cas 3 : solution différente - même électrode

Les mesures ont ensuite été effectuées en conservant l'électrode et en renouvelant la solution (figure 4.4) après chaque répétition d'analyse. Dans ce cas, le RSD demeure haut. Ces résultats semblent expliquer que l'accumulation du cuivre sur l'électrode ne serait pas le seul phénomène responsable de cette mauvaise répétabilité de mesure. En effet, lorsque la solution est renouvelée et que l'électrode est conservée, le pic du cuivre diminue à cause de la perte du mercure de l'électrode de travail dans la solution précédemment analysée. Ce phénomène peut être vérifié en analysant la concentration totale en mercure dans la solution (par ICP-MS par exemple) avant et après l'analyse électrochimique.

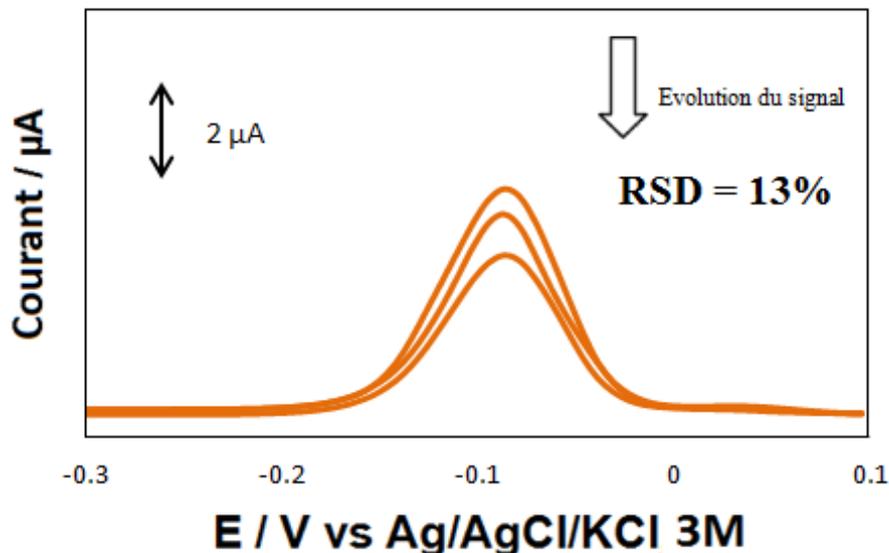


Figure 4.4 : Détermination du cuivre en utilisant une solution différente⁸ et la même électrode.

Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1

⁸ Solution différente signifie que chaque analyse de triplicat est effectuée après renouvellement de la solution contenant $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cuivre dans une solution de tampon acétate à $10^{-2} \text{mol L}^{-1}$

Cas 4 : solution différente - électrode différente

Partant de ce constat, la dernière alternative est de changer à la fois l'électrode et de renouveler la solution entre chaque répétition d'analyse (figure 4.5). Ces conditions permettant d'obtenir un RSD plus faible, inférieur à 10 %, ont été retenues et utilisées dans la totalité des analyses voltammétriques.

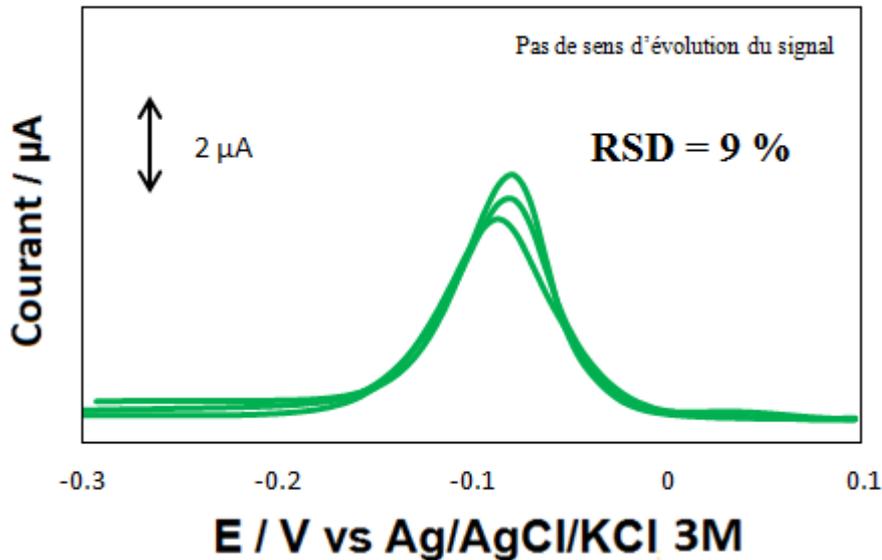


Figure 4.5 : Détermination du cuivre en utilisant une solution et une électrode différentes.

Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1

Pour compléter cette investigation sur les différents paramètres analytiques à utiliser, la nature des milieux relatifs aux mesures du cuivre total et électrolabile a été considérée, que ce soit pour la solution diluée de sol minéralisé (MS) ou la solution de sol préparée au laboratoire (lixiviat), dont la conductivité a été augmentée par ajout de nitrate de potassium (KNO_3). Le RSD a été calculé dans les conditions optimales déterminées précédemment, c'est-à-dire en changeant l'électrode et en renouvelant la solution entre chaque analyse. Le RSD, initialement estimé à 9 % dans le tampon acétate, vaut 13 % dans la MS et 6 % dans le lixiviat. De même, le RSD a été évalué pour le plomb, dans la perspective d'étudier des sols contaminés à la fois par du cuivre et par du plomb. Les valeurs obtenues sont similaires à celles obtenues pour le cuivre. Ces résultats démontrent que la répétabilité ne dépend pas seulement du renouvellement de l'électrode et de la solution mais aussi de la nature du milieu analytique. Ces informations sont importantes pour les prochaines analyses effectuées dans la MS et le lixiviat, afin de déterminer les fractions de métal total et électrolabile respectivement.

4.3.2 Effet du pH et de la conductivité du milieu analytique

En ce plaçant dans les conditions de répétabilité optimale déterminées précédemment, l'investigation s'est focalisée sur les paramètres du milieu analytique, notamment sur le pH et la conductivité. En effet, ces paramètres sont importants pour la détermination de la fraction électrolabile, car ils peuvent modifier la spéciation initiale du cuivre et du plomb dans l'échantillon. Plus la solution est acide et plus les ETM sont présents sous forme labile. De plus, la conductivité doit être ajustée afin de favoriser le transport ionique sans promouvoir de possibles complexations du métal avec des ligands anioniques apportés par le milieu analytique. Dans le cas des analyses en total effectuées dans la MS, le cuivre et le plomb doivent être totalement sous forme électrolabile. Afin de vérifier les effets de ces deux paramètres, une solution contenant $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cuivre a été préparée dans du tampon acétate et analysée par SPE-SWASV.

Dans un premier temps, la solution a été acidifiée par ajouts successifs d'acide nitrique concentré jusqu'à obtenir un pH correspondant à la MS.

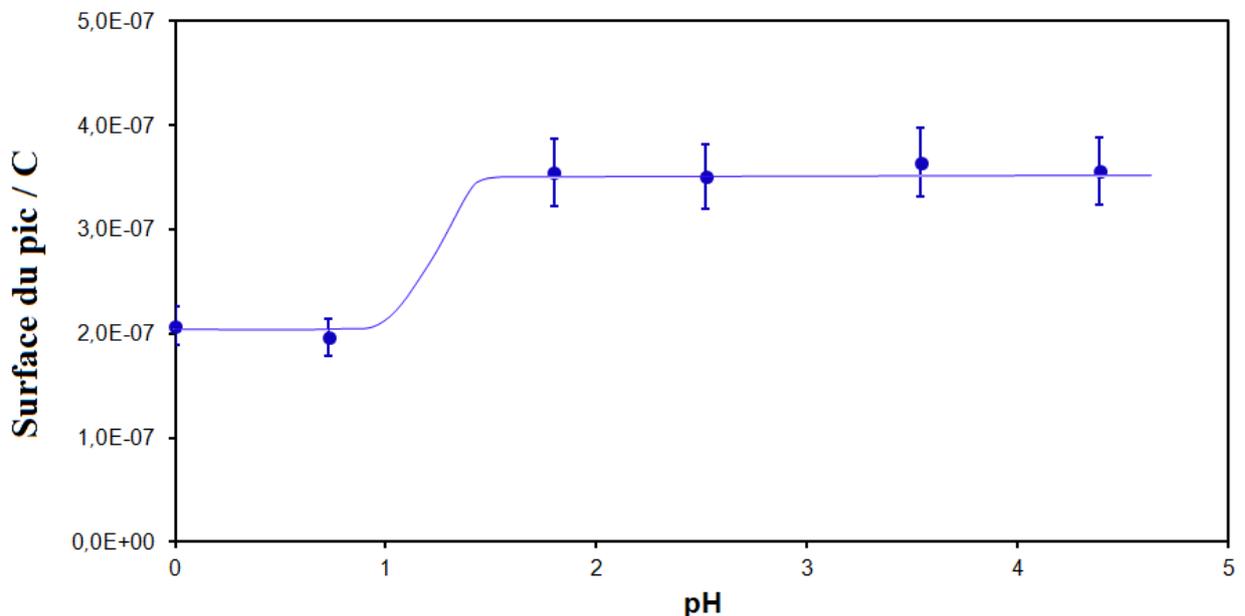


Figure 4.6 : Evolution de la surface du pic de cuivre par SPE-SWASV selon la variation du pH entre 0 et 4,5. Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1

La figure 4.6 présente l'évolution de la surface du pic de cuivre en fonction du pH du milieu analytique. Dans le cas d'une variation de pH de 2 jusqu'à 4,5 (4,5 = pH du tampon acétate), la surface du pic de cuivre ne varie pas. Lorsque le pH devient inférieur à 2, (0 = pH de la MS), la surface du pic de cuivre décroît significativement. En moyenne, une diminution de la surface du pic de cuivre de 30 % à 52 % est observée par rapport à la surface de pic du cuivre à pH = 4,5. Lorsque le pH diminue de 4,5 à 0, le cuivre est alors de plus en plus présent sous forme libre donc la surface du pic devrait augmenter or ce n'est pas le cas. Ce phénomène pourrait être dû aux additions d'acide nitrique, qui, à des concentrations élevées, pourrait conduire à la dégradation du mercure déposé sur l'électrode.

Dans un second temps, des ajouts successifs de nitrate de potassium (KNO_3) ont été effectués afin d'augmenter la conductivité de la solution (figure 4.7). La meilleure sensibilité (c'est-à-dire la plus grande surface de pic pour une même concentration en cuivre) a été recherchée tout en veillant à ce qu'aucune variation significative de spéciation concernant les formes électrolabiles du cuivre n'intervienne. Pour cela, une modélisation de spéciation a été calculée en utilisant un outil informatique, le logiciel Visual Minteq.

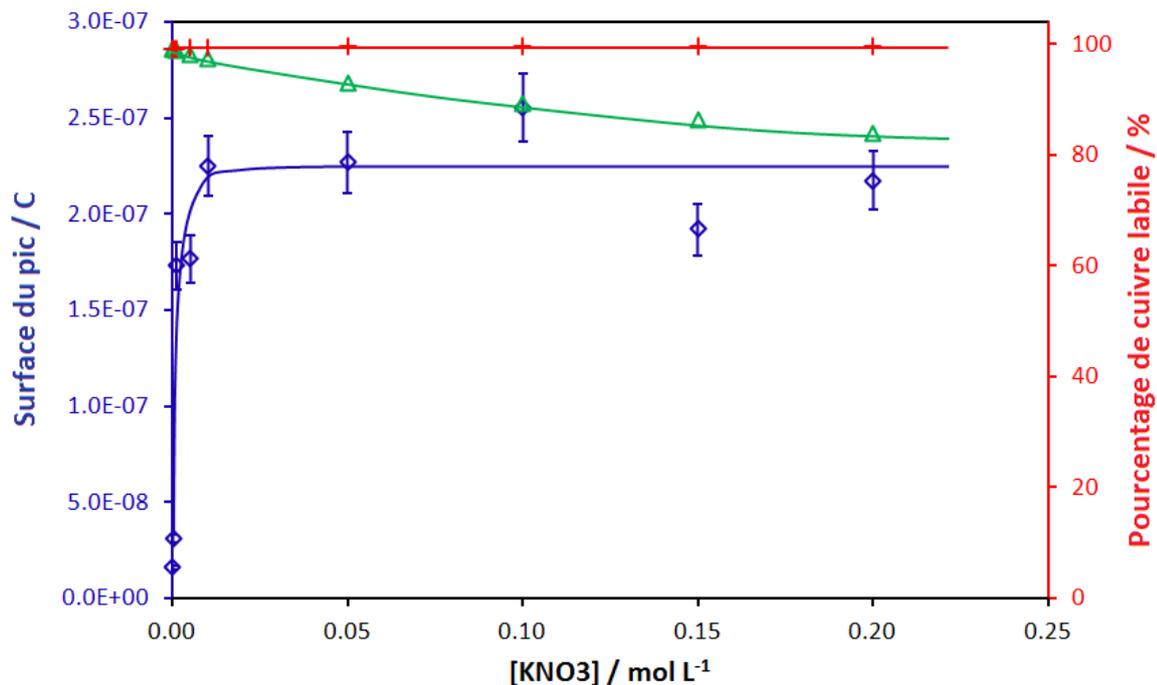


Figure 4.7 : Evolution du signal du cuivre obtenu par SPE-SWASV (◇) en fonction de la concentration en nitrate de potassium dans la solution $[\text{KNO}_3]$ (mêmes paramètres que pour la figure 4.1) et comparaison entre le cuivre sous forme libre (Cu^{2+} , △) et le cuivre électrolabile ($(\text{Cu}^{2+} + \text{CuNO}_3^+)$, +) prédit par le logiciel Visual Minteq

D'après la figure 4.7, la plus haute sensibilité est atteinte à partir d'une concentration en KNO_3 égale à $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Le meilleur compromis entre la sensibilité et la préservation du cuivre sous forme libre (spéciation) est obtenu pour une concentration en KNO_3 égale à $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Dans ces conditions, 97 % du cuivre est sous forme libre. Le fait que la surface du pic reste constante pour une concentration en KNO_3 supérieure à $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ alors que la concentration en cuivre sous forme libre diminue indique que les formes électrolabiles (c'est-à-dire la somme des concentrations en Cu^{2+} et CuNO_3^+) ne varient pas dans cette gamme de concentrations. Cette observation indique alors que CuNO_3^+ est un complexe inorganique électrolabile. Ainsi, si les formes électrolabiles sont les éléments d'intérêt, une concentration en KNO_3 supérieure ou égale à $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ permet une détermination satisfaisante. Conformément aux résultats obtenus, le milieu analytique des étalons a été ajusté de telle sorte que les valeurs de pH et de conductivité soient les mêmes que celles des solutions d'échantillons.

4.4 Applications

4.4.1 Procédure de quantification du cuivre et du plomb dans le sol de référence

Le choix de la procédure de quantification dépend à la fois de la méthode analytique et de la nature de l'échantillon. C'est pourquoi une attention particulière a été portée sur ce point et plus particulièrement sur la complexité de l'échantillon. La justesse de la détermination du cuivre a été évaluée. Idéalement, un échantillon de solution de référence certifiée en cuivre électrolabile issu d'un sol devrait être utilisé mais un tel matériel de référence n'existe pas. C'est pour cette raison qu'un sol de référence certifié a été minéralisé. Dans le but d'un suivi environnemental du cuivre et selon les résultats obtenus précédemment, la quantification du cuivre a été menée en utilisant un étalonnage externe dans du tampon acétate comme milieu de référence (Δ) et dans une solution de blanc de minéralisation (MB) (\diamond). En revanche, la quantification du cuivre et plomb dans la MS a été effectuée par ajouts dosés afin de s'affranchir d'éventuels effets de matrices intervenant dès le processus de minéralisation ou d'autres effets issus de la mesure par SPE.

Les limites de détection ainsi que les pentes associées aux différentes droites d'étalonnage ont été calculées pour chaque milieu selon la norme de l'IUPAC (cf. paragraphe 2.4.3). Les limites de détection obtenues pour le cuivre valent $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ et $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ pour un étalonnage dans le tampon acétate et dans la MB respectivement, en utilisant les mêmes conditions de déposition du cuivre. Les droites d'étalonnage correspondantes sont présentées en figure 4.8.

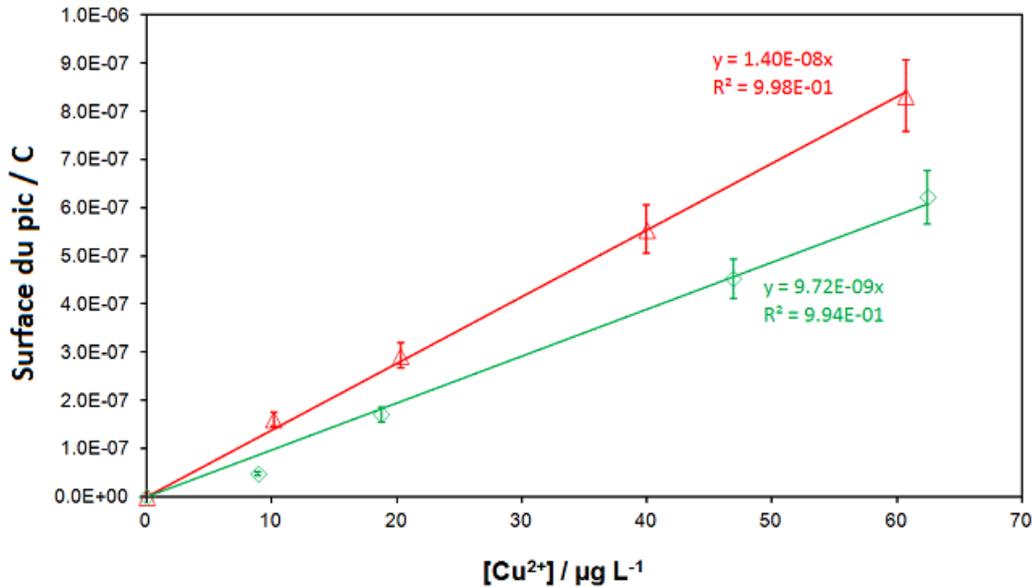


Figure 4.8 : Droites d'étalonnage du cuivre dans une gamme de 0 à $63 \mu\text{g L}^{-1}$ dans le tampon acétate (Δ) et dans la MB (\diamond) par SPE-SWASV. Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1

La pente de la droite d'étalonnage est significativement plus importante dans le tampon acétate que dans la MB. Ceci illustre une nouvelle fois l'effet du pH et de la conductivité sur la réponse analytique. D'un point de vue quantitatif, dans le cas de l'étalonnage dans la MB, la surface des pics des étalons de cuivre est réduite de 30 % en moyenne comparée à celle obtenue pour un étalonnage effectué dans du tampon acétate. Ceci est en accord avec les résultats précédents (figure 4.6) exposant que le signal du cuivre diminue d'au moins 30 % lorsque le pH est inférieur à 2. La conséquence directe est la différence de concentration obtenue pour les échantillons selon la droite d'étalonnage considérée (tableau 4.2, ligne 1).

Ces résultats mettent en évidence que :

- Une détermination juste de la quantité de cuivre peut être effectuée par SPE-SWASV ;
- L'étalonnage externe effectué dans la MB est un mode de quantification pertinent.

En plus de la quantification du cuivre, les concentrations en plomb ont pu également être déterminées (tableau 4.2, ligne 2).

Tableau 4.2 : Quantités de cuivre total et de plomb total contenues dans le sol de référence (loam soil ERM-CC141) en mg(ETM) kg⁻¹(sol) calculées selon différents mode d'étalonnage

	Etalonnage externe		Par ajouts dosés	Valeur certifiée
	Dans le tampon acétate	Dans la MB		
Cuivre	8,6 ± 0,8	12,1 ± 1,6	14,0 ± 1,9	14,4 ± 1,4
Plomb	52 ± 5	36 ± 5	44 ± 6	41 ± 4

Connaissant la quantité de sol mineralisé et la quantité de solution diluée de sol minéralisé, les valeurs ont été rapportées en mg(ETM) kg⁻¹(sol) afin de pouvoir être comparée avec le certificat.

Cette détermination conjointe (c'est-à-dire, Cu et Pb) a été effectuée afin de confirmer que la présence de plomb en quantité environ trois fois plus importante que celle en cuivre ne perturbe pas le dosage du cuivre. Dans le cas des ajouts dosés, où le plomb a été ajouté telle que sa concentration atteigne 100 µg(Pb) L⁻¹, la concentration significativement importante du plomb dans la MS ne conduit à aucun biais de la quantification de cuivre.

Les voltammogrammes correspondants aux analyses effectuées par ajouts dosés sont présentés en figure 4.9. Ils illustrent le fait qu'aucune perturbation n'intervient même lorsque les concentrations de chaque élément deviennent importantes.

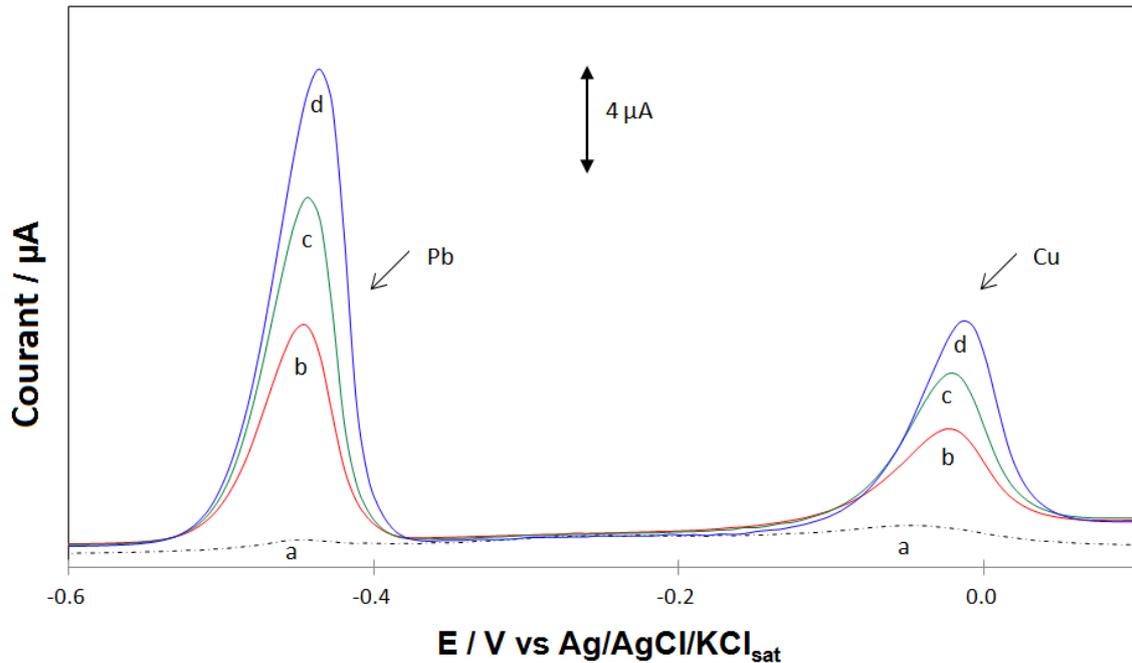


Figure 4.9 : Voltammogrammes obtenus pour l'étalonnage du cuivre et du plomb par ajouts dosés (a) Solution de blanc minéralisé et dilué 15 fois (MB) ; (b) Solution de sol minéralisé et dilué 15 fois (MS) ; (c) Idem que (b) + Addition de $10 \mu\text{g}(\text{Cu}) \text{L}^{-1}$ et de $30 \mu\text{g}(\text{Pb}) \text{L}^{-1}$; (d) Idem que (b) + Addition de $20 \mu\text{g}(\text{Cu}) \text{L}^{-1}$ et de $60 \mu\text{g}(\text{Pb}) \text{L}^{-1}$. Conditions d'analyse : Mêmes paramètres que pour la figure 4.1. Les signaux ont été corrigés du blanc

4.4.2 Recherche d'informations sur la biodisponibilité du cuivre dans des sols agricoles contaminés par le plomb

Le but de cette partie a été d'appliquer la méthode électrochimique avec les paramètres précédemment déterminés afin d'évaluer les fractions totales et électrolabiles des ETM présents dans les sols agricoles. Ceci a permis :

- de vérifier l'applicabilité de la méthode en évaluant la justesse (si possible) et la répétabilité des mesures ;
- d'appliquer cette méthode à plusieurs échantillons de sols agricoles pour évaluer ses capacités à évaluer le danger d'une éventuelle contamination métallique et vérifier la robustesse de la méthode.

Pour cela, les cinq sols précédemment décrits ont été analysés. Tout d'abord, les quantités totales de cuivre et le plomb ont été quantifiées dans les sols. Puis après lixiviation durant laquelle le cuivre et le plomb mobilisables ont été extraits des sols vers les solutions de sol préparées (lixiviats), les fractions électrolabiles de ces ETM ont été déterminées. Les différentes concentrations obtenues sont présentées dans le tableau 4.3.

En ce qui concerne les concentrations totales en cuivre et en plomb dans les sols, les analyses obtenues par SPE-SWASV ont été confirmées par les analyses ICP-MS. La totalité des valeurs obtenues sont justes dans une gamme de concentrations de 10 à 100 mg kg⁻¹ pour le cuivre et de 20 à 40 mg kg⁻¹ pour le plomb, ces gammes de concentrations correspondant aux concentrations des ETM déterminées dans les sols étudiés. Plus spécifiquement, concernant le cuivre, ces résultats confirment que le cuivre peut être déterminé de manière fiable par SPE-SWASV dans des sols ayant des caractéristiques physico-chimiques différentes et en présence de plomb.

Ensuite, les concentrations en cuivre et plomb électrolabiles ont été déterminées dans les lixiviats préparés. Ce procédé de détermination a été appliqué sur trois répliqués de lixiviats indépendants, le procédé de lixiviation ayant été répliqué trois fois (c'est-à-dire que $n = 3 \times 3$). Les concentrations obtenues sont présentées dans le tableau 4.3. Pour tous les sols, les quantités de plomb électrolabile étant inférieures aux limites de quantification (0,008 mg kg⁻¹), elles ne sont pas présentées dans le tableau 4.3. De plus, les concentrations en cuivre électrolabile sont quantifiables dans les sols de vigne mais pas dans les sols A et B qui présentent des concentrations inférieures aux limites de quantification (0,013 mg kg⁻¹).

Tableau 4.3 : Concentrations en cuivre et plomb totaux et électrolabiles dans différents sols agricoles

Sol	Plomb	Cuivre		
	Concentration en total dans le sol (mg kg ⁻¹)	Concentration en total dans le sol (mg kg ⁻¹)	Concentration en électrolabile dans le sol (mg kg ⁻¹)	Pourcentage d'électrolabile dans le sol (%)
A	26 ± 4	10 ± 2	≤ LQ*	-
B	25 ± 4	11 ± 2	≤ LQ*	-
C	29 ± 4	93 ± 12	0,38 ± 0,03	0,4 ± 0,1
D	33 ± 5	98 ± 13	0,47 ± 0,03	0,5 ± 0,1
E	35 ± 5	99 ± 13	0,50 ± 0,03	0,5 ± 0,1

*LQ = 0,013 mg(Cu) kg⁻¹sol

Le RSD évalué lors de la mesure du cuivre électrolabile dans les lixiviats a été évalué à 6 %. De plus, aucune interaction entre le signal du cuivre et le signal du plomb n'a été observée. Ainsi, la répétabilité de la détermination du cuivre par SPE-SWASV semble robuste étant donné les différentes origines et compositions chimiques des sols.

Récemment, des études ont été menées sur les sols de vignes (sols C, D, E) par Denaix et al. dans le cadre des projets « Analyse des Risques Environnementaux, Biodisponibilité et Impacts liés aux pollutions diffuses » (ARENBI) et Région Aquitaine [191]. Dans ces études, les concentrations en cuivre et plomb labiles dans les sols ont été mesurées par DGT (Diffusive Gradient in Thin film) couplé à l'ICP-MS. Étant donné qu'il n'y a aucun moyen de vérifier la justesse des concentrations en éléments électrolabiles, les résultats obtenus par SPE-SWASV ont été comparés à ceux obtenus par DGT/ICP-MS. Les concentrations obtenues par électrochimie ont été converties en µg L⁻¹ de lixiviat (le rapport de lixiviation L/S étant égale à 10) afin de pouvoir être comparables avec les concentrations obtenues par DGT/ICP-MS en µg L⁻¹ de solution de sol.

Tableau 4.4 : Comparaison des concentrations en cuivre et plomb labiles déterminées par DGT et SPE-SWASV

Sol	Cuivre		Plomb	
	DGT/ICP-MS	SPE-SWASV	DGT/ICP-MS	SPE-SWASV
C	80 ± 10	38 ± 3	0,45 ± 0,04	< LQ*
D	79 ± 6	47 ± 3	0,7 ± 0,4	
E	58 ± 3	50 ± 3	0,39 ± 0,07	

*LQ = 0,8 mg(Pb) kg⁻¹sol

Les résultats exposés dans le tableau 4.4 présentent des concentrations en cuivre et en plomb labiles du même ordre de grandeur. Les concentrations obtenues par DGT/ICP-MS sont cependant supérieures à celles obtenues par SPE-SWASV. Ceci s'explique par le fait que la DGT permet d'extraire les ions libres, tous les complexes inorganiques et une partie des complexes organiques des éléments dissous alors que la SPE-SWASV permet d'atteindre les ions libres et les faibles complexes inorganiques seulement [38,192,193]. Par conséquent, il est normal que les concentrations en éléments labiles déterminées par DGT/ICP-MS soient plus élevées que les concentrations électrolabiles.

Concernant le plomb, la DGT/ICP-MS révèle des concentrations en plomb labile inférieures à la limite de quantification de la méthode utilisée en SPE-SWASV. Les limites de quantification de la méthode DGT/ICP-MS sont plus basses et correspondent aux limites de quantification de l'ICP-MS. En effet, la DGT est un outil qui permet la diffusion et l'absorption dans une résine des espèces présentes dans la solution de sol. La résine est ensuite extraite, traitée et analysée par ICP-MS.

La stratégie basée sur la voltammétrie prouve ainsi sa capacité à donner des informations sur les conséquences de l'utilisation de pesticides à base de cuivre sur les sols pour différentes cultures. En effet, les concentrations en cuivre total sont environ dix fois supérieures dans les sols de vigne que dans les sols de blé et de tournesol alors que les concentrations en plomb total sont dans le même ordre de grandeur. Cependant, la part du cuivre électrolabile demeure faible pour tous les sols agricoles. Effectivement, moins de 1 % de la quantité de cuivre total est électrolabile dans tous les cas. Ce résultat, en accord avec la littérature [189,190], démontre que le danger potentiel lié à la mobilisation du cuivre du sol vers la solution de sol est relativement faible.

4.5 Bilan

D'un point de vue analytique, l'ensemble des résultats de cette étude confirme que la méthode SPE-SWASV peut être utilisée dans une stratégie d'évaluation de la quantité des différents ETM dont le cuivre et plomb totaux dans les sols et la détermination du cuivre électrolabile dans les lixiviats. Pour cela, des précautions doivent être prises dans le but d'obtenir des résultats justes et répétables. Spécifiquement, l'électrode de travail doit être changée et la solution renouvelée après chaque analyse. En raison de l'influence des conditions du milieu analytique sur la réponse électrochimique, le pH, la conductivité de l'échantillon et les solutions d'étalonnage durant la procédure de quantification ont été minutieusement adaptés. Respectant ces spécifications, la méthode SPE-SWASV prouve être un outil analytique intéressant dans le but d'effectuer un bilan de matière de l'élément d'intérêt dans des milieux environnementaux tels que les sols agricoles. D'un point de vue environnemental, dans les sols agricoles considérés et contenant diverses quantités de cuivre, une très faible part de cet élément s'avère être sous forme électrolabile. Ceci confirme le relativement faible impact du cuivre concernant une potentielle diffusion via la solution de sol après mobilisation du cuivre issu du sol.

L'utilisation de la technique SPE-SWASV s'avère être particulièrement adaptée aux contraintes opératoires. En effet, après optimisation des paramètres analytiques, les concentrations sont déterminées directement, sans traitement préalable de la solution d'intérêt, et permettent d'appréhender la fraction biodisponible des éléments étudiés. Un système d'électroanalyse automatisé et transportable sur terrain a récemment été développé au laboratoire [188] et pourrait être couplé à cette méthode pour faire des mesures sur site. Dans le cas présent d'étude de solutions de sol, des contraintes comparables à celles de la DGT peuvent intervenir. En effet, si les sols ne présentent pas un taux d'humidité suffisant, il sera alors difficile d'extraire un volume suffisant de solution de sol. Une solution à ce problème serait de modifier la nature de l'électrode ou éventuellement d'utiliser des microcapteurs. Dans ce cas défavorable, les études pourraient se focaliser plus spécialement sur les eaux de drainage par exemple, celles-ci étant définies comme les eaux excédentaires recueillies dans les sols afin de limiter le développement de moisissures pouvant ravager les cultures.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Assurer la qualité sanitaire des végétaux de grandes cultures nécessite la mise en œuvre d'outils de diagnostic permettant d'évaluer soit les concentrations en éléments trace métalliques et métalloïdes (ETM) dans les grains (alimentation humaine), soit les concentrations en ETM qui sont potentiellement transférables au végétal. Nous avons investi ces deux aspects en nous focalisant sur l'arsenic, le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc dans les grains de blé et de tournesol, ces ETM étant réglementés ou en voie de réglementation pour l'alimentation humaine et/ou animale.

Idéalement, l'évaluation des concentrations conduisant aux résultats les plus représentatifs d'une parcelle serait de prélever et d'analyser l'ensemble des plantes y étant cultivées. Cette stratégie étant naturellement impossible à réaliser, un protocole de prélèvement de végétaux a été mis en place et évalué. Un des avantages d'un prélèvement au champ réside dans la possibilité d'un diagnostic pré-récolte. Bien que les opérations de prélèvement puissent a priori sembler simples à mener, le choix des points de prélèvement et des procédures de prélèvement sont des paramètres cruciaux à définir afin d'acquérir des informations les plus représentatives possibles à la fois en chaque point de prélèvement et sur l'ensemble de la parcelle. Le protocole d'échantillonnage aléatoire stratifié, PEAS, objet de notre travail, consiste au prélèvement minimal nécessaire de végétaux sur une zone couvrant l'ensemble de la parcelle (placette). Il a été statistiquement démontré que le prélèvement de 2 épis de blé ou 10 grains de tournesol sur 25 points répartis suivant le PEAS suffit à être représentatif à la fois des différents points de prélèvement et des concentrations globales en ETM à l'échelle de la parcelle. De plus, le PEAS est un outil acceptable d'un point de vue représentativité et opérationnalité. Il s'est également avéré être capable de déterminer la variabilité des concentrations en ETM à l'échelle de la parcelle, pour des parcelles comprises entre 1 et 3 hectares. Il permet ainsi d'évaluer le degré d'hétérogénéité de chacun des éléments précités et de cartographier les données lorsque la distance d'hétérogénéité est supérieure au pas d'échantillonnage. Les zones de la parcelle présentant des concentrations plus importantes pouvant faire l'objet de surveillance peuvent alors être visualisées. Lorsque la parcelle s'avère être très inhomogène en concentration à des distances courtes, le PEAS offre la possibilité d'un ajout d'un nombre de points de prélèvement supplémentaire ou d'un nouveau tirage de 25 point en suivant la même méthodologie, afin de diminuer le pas d'échantillonnage et ainsi faire un zoom sur la partie souhaitée. *In fine*, ce protocole se révèle donc être un véritable système expert, représentatif de la zone d'étude et ajustable spatialement.

La possibilité d'effectuer une prédiction des concentrations en ETM susceptibles d'être transférés au végétal a été investie en étudiant la solution de sol. La SPE-SWASV s'est révélée être une technique intéressante pour l'évaluation des concentrations en ETM biodisponibles dans la solution de sol. La méthode, déjà développée pour l'étude du cadmium, du plomb et du zinc biodisponibles en solution a été adaptée à la détermination du cuivre électrolabile, associé au cuivre biodisponible. Ce focus particulier a été motivé par la forte problématique aquitaine liée aux zones de viticulture et à la reconversion de l'occupation des sols. La SPE-SWASV a été appliquée sur divers sols, dont deux d'entre eux ont été prélevés sur les parcelles tests étudiées précédemment (C6 et CL) et trois autres dans des vignes. Les teneurs mesurées en cuivre biodisponible représentent moins de 2 % des teneurs en cuivre total présent dans le sol, confirmant le faible impact du cuivre vis-à-vis d'un transfert potentiel depuis la solution de sol jusqu'aux végétaux. Ceci est en accord avec les données de la littérature. La justesse des résultats obtenus ne pouvant être vérifiée faute d'échantillon de référence, des analyses comparatives ont été effectuées par DGT couplé à l'ICP-MS. Les résultats obtenus par l'utilisation de ces deux approches sont comparables et permettent de conforter la pertinence des résultats obtenus par SPE-SWASV. Si la méthode s'avère prometteuse, elle souffre néanmoins aujourd'hui d'un manque de sensibilité et donc d'une applicabilité restreinte dans le cas de contamination diffuse et/ou faible.

En perspective de ce travail, la démarche d'évaluation et de validation du PEAS doit être poursuivie. Ainsi, le protocole doit être appliqué sur différentes parcelles cultivées en blé et tournesol et présentant des surfaces différentes (plus petites ET plus grandes) afin de s'assurer de sa robustesse. A ce jour, des prélèvements ont déjà été effectués sur des parcelles de blé et de tournesol de surface jusqu'à 10 hectares, les résultats sont en cours d'exploitation. Parallèlement, le PEAS doit être appliqué à d'autres espèces céréalières et oléagineuses, ainsi qu'à d'autres éléments et contaminants (pesticides, mycotoxines) afin d'envisager sa généralisation. Un guide d'échantillonnage, en cours de réalisation, permettra de définir toutes les étapes nécessaires aux bonnes conditions de prélèvement depuis la préparation du matériel au laboratoire jusqu'à l'envoi des échantillons pour l'analyse. Ce guide représentera ainsi une valorisation des résultats obtenus, avec un transfert du savoir faire aux instituts partenaires de ce projet. Le protocole PEAS, appliqué aux végétaux pourrait également être adapté aux sols afin de rechercher les corrélations entre les concentrations électrolabiles dans la solution de sol et les concentrations totales dans les grains.

Ceci permettrait de contribuer à la compréhension des mécanismes de transfert sol-plante, avec en perspective une démarche « en plein champ » intégrant les pratiques agricoles. Ceci ouvrirait aussi les possibilités d'utilisation du PEAS comme outil d'évaluation et de prédiction de la qualité des sols avant toute culture et/ou de la qualité sanitaire. Pour ce faire, le PEAS pourrait être combiné à la SPE-SWASV, pour la détermination des éléments électrolabiles en solution sur site. Un pilote automatisé permettant la facilité du transport de l'appareillage nécessaire à l'analyse a récemment été développé au laboratoire. Ce pilote pourrait être adapté à une telle investigation à la condition d'optimiser le prélèvement de la solution de sol, ainsi que l'étape de préconcentration. Dans un premier temps, la faisabilité d'un suivi sur site pourrait être évaluée par l'analyse des eaux de drainage par exemple. Parallèlement, le développement d'un protocole de préconcentration pourrait être envisagé, dans le respect de la spéciation des éléments présents dans l'échantillon. Une piste pourrait être une préconcentration sur l'électrode, en systèmes parallèles miniaturisés ayant recours à des microélectrodes.

Quoiqu'il en soit, les pistes de recherche et d'applications résultant de ce travail sont nombreuses et variées, allant de la recherche fondamentale à la recherche appliquée en partenariat avec les instituts parties prenantes de la sécurité sanitaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G.H. Morrison, K.L. Cheng, M. Grasserbauer, General aspects of trace analytical methods, *Pure Appl. Chem.* 51 (1979) 2243–2250.
- [2] S. Díaz, A. Martín-González, J. Carlos Gutiérrez, Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa, *Environ. Int.* 32 (2006) 711–717.
- [3] M. Chabukdhara, A.K. Nema, Assessment of heavy metal contamination in Hindon River sediments: a chemometric and geochemical approach, *Chemosphere.* 87 (2012) 945–953.
- [4] Casovihemijebg, Metalni karakter opada.
- [5] J.H. Duffus, “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 793–807.
- [6] M.E. Hodson, Heavy metals—geochemical bogey men?, *Environ. Pollut.* 129 (2004) 341–343.
- [7] K.-J. Appenroth, Definition of “Heavy Metals” and Their Role in Biological Systems, in: *Soil Heavy Met.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010: pp. 19–29.
- [8] K.A. Moon-Hee, K. Chae, What is the Meaning of Heavy Metals?: A Case Study in Korean Textbooks, in: 2007.
- [9] P.W. Atkins, L. Jones, *Chimie: molécules, matière, métamorphoses*, De Boeck Supérieur, 1998.
- [10] J.-M. Gobat, M. Aragno, W. Matthey, *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*, PPUR Presses polytechniques, 2010.
- [11] J.-P. Legros, *Les grands sols du monde*, PPUR presses polytechniques, 2007.
- [12] R. Calvet, *Le sol: propriétés et fonctions*, France Agricole Editions, 2003.
- [13] R. Morel, *Les sols cultivés*, Tec & Doc-Lavoisier, 1996.
- [14] A. Kabata-Pendias, *Trace Elements in Soils and Plants*, Third Edition, CRC Press, 2010.
- [15] M. Robert, J. Varet, *Le Sol: interface dans l’environnement: ressource pour le développement*, Masson, 1996.
- [16] P. Duchaufour, W.E.H. Blum, *Abrégé de pédologie: sol, végétation, environnement*, Masson, Paris, 1997.
- [17] S.W. Poulton, R. Raiswell, Chemical and physical characteristics of iron oxides in riverine and glacial meltwater sediments, *Chem. Geol.* 218 (2005) 203–221.
- [18] P. Duchaufour, *Pédologie: sol, végétation, environnement*, Masson, Paris, 1991.
- [19] K.H. Tan, *Principles of Soil Chemistry*, Fourth Edition, CRC Press, 2011.
- [20] L. Charlet, M.L. Schlegel, La capacité d’échange des sols. Structures et charges à l’interface eau/particule, *Comptes Rendus Académie Agric. Fr.* 85, 7–24.
- [21] B.J. Alloway, D.C. Ayres, *Chemical principles of environmental pollution*, CRC Press, 1997.
- [22] K. Subramaniam, V. Vithayaveroj, S. Yiaccoumi, C. Tsouris, Copper uptake by silica and iron oxide under high surface coverage conditions: surface charge and sorption equilibrium modeling, *J. Colloid Interface Sci.* 268 (2003) 12–22.
- [23] J.D. Rimstidt, A. Balog, J. Webb, Distribution of trace elements between carbonate minerals and aqueous solutions - Precipitation rates and overgrowth compositions, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 62 (1998) 1851–1863.
- [24] J. Cotter-Howells, S. Caporn, Remediation of contaminated land by formation of heavy metal phosphates, *Appl. Geochem.* 11 (1996) 335–342.
- [25] NF X31-003 - Qualité du sol - Description du sol.
- [26] B. Jabiol, M.-C. Girard, C. Schvartz, *Etude des sols - Description, cartographie, utilisation: Description, cartographie, utilisation*, Dunod, 2011.
- [27] *Field Book for Describing and Sampling Soils*, version 3.0 | NRCS Soils.
- [28] P. Duchaufour, *Introduction à la science du sol: Sol, végétation, environnement*. 6ème édition, Dunod, 2004.
- [29] G. Sposito, *The Chemistry of Soils*, Oxford University Press, 1989.
- [30] B.J. Alloway, *Heavy Metals in Soils*, Springer, 1995.
- [31] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.-G. Danielsson, H. Muntau, H.P. van Leeuwen, et al., Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1453–1470.

- [32] J.H. Duffus, M. Nordberg, D.M. Templeton, Glossary of terms used in toxicology, (IUPAC recommendations 2007), *Pure Appl. Chem.* 79 (2007) 1153–1344.
- [33] H. Zhang, F.J. Zhao, B. Sun, W. Davison, S.P. McGrath, A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2602–2607.
- [34] A. Lebourg, Trace metal speciation in three unbuffered salt solutions used to assess their bioavailability in soil.
- [35] J. Harmsen, W. Rulkens, H. Eijsackers, Bioavailability: concept for understanding or tool for predicting, *Land Contamination and Reclamation.* 13 (2005) 161–171.
- [36] S. Yang, D. Zhou, H. Yu, R. Wei, B. Pan, Distribution and speciation of metals (Cu, Zn, Cd, and Pb) in agricultural and non-agricultural soils near a stream upriver from the Pearl River, China, *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987. 177 (2013) 64–70.
- [37] J.S. Meyer, The utility of the terms “bioavailability” and “bioavailable fraction” for metals, *Mar. Environ. Res.* 53 (2002) 417–423.
- [38] M.-H. Tusseau-Vuillemin, C. Gourlay, C. Lorgeoux, J.-M. Mouchel, R. Buzier, R. Gilbin, et al., Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin, *Sci. Total Environ.* 375 (2007) 244–256.
- [39] C. Juste, Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol, *Sci. Sol.* 26, 103–112.
- [40] P. Marschner, *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, 2012.
- [41] K.T. Semple, K.J. Doick, K.C. Jones, P. Buraue, A. Craven, H. Harms, Peer Reviewed: Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 228A–231A.
- [42] M.V. Ruby, R. Schoof, W. Brattin, M. Goldade, G. Post, M. Harnois, et al., Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3697–3705.
- [43] D. Baize, *Les Éléments Traces Métalliques (ETM) dans les SOLS*, INRA - Orléans Ed., 2007.
- [44] W.J.G.M. Peijnenburg, L. Posthuma, H.J.P. Eijsackers, H.E. Allen, A Conceptual Framework for Implementation of Bioavailability of Metals for Environmental Management Purposes, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37 (1997) 163–172.
- [45] P.R. Darrah, The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach, *Plant Soil.* 155-156 (1993) 1–20.
- [46] W.J.G.M. Peijnenburg, T. Jager, Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56 (2003) 63–77.
- [47] B. Cerqueira, E.F. Covelo, L. Andrade, F.A. Vega, The influence of soil properties on the individual and competitive sorption and desorption of Cu and Cd, *Geoderma.* 162 (2011) 20–26.
- [48] B. Cerqueira, E.F. Covelo, M.L. Andrade, F.A. Vega, Retention and Mobility of Copper and Lead in Soils as Influenced by Soil Horizon Properties, *Pedosphere.* 21 (2011) 603–614.
- [49] E.F. Covelo, F.A. Vega, M.L. Andrade, Simultaneous sorption and desorption of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn in acid soils: I. Selectivity sequences, *J. Hazard. Mater.* 147 (2007) 852–861.
- [50] E.F. Covelo, F.A. Vega, M.L. Andrade, Heavy metal sorption and desorption capacity of soils containing endogenous contaminants, *J. Hazard. Mater.* 143 (2007) 419–430.
- [51] INRA, *AGREDE: agriculture et épandage de déchets urbains et agro-industriels*, Editions Quae, 2003.
- [52] J. Buffle, R.A. Chalmers, *Complexation reactions in aquatic systems*, (1988).
- [53] B.A. Dempsey, Y.L. Tai, S.G. Harrison, *Mobilization and Removal of Contaminants Associated with Urban Dust and Dirt*, (2011).
- [54] G.E. Batley, S.C. Apte, J.L. Stauber, Speciation and Bioavailability of Trace Metals in Water: Progress Since 1982, *Aust. J. Chem.* 57 (2004) 903–919.
- [55] I. Feix, *Contamination des sols: Transferts des sols vers les plantes*, SOFEDIS, 2012.
- [56] S.A. Barber, *Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach*, John Wiley & Sons, 1995.
- [57] J.-L. Morel, *Contribution à l'étude des transferts de métaux lourds dans le système sol - plante: Le rôle des mucilages racinaires*, 1985.

- [58] M. Patra, N. Bhowmik, B. Bandopadhyay, A. Sharma, Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance, *Environ. Exp. Bot.* 52 (2004) 199–223.
- [59] P. Hinsinger, Le sol: ressource en nutriments et biodisponibilité, *Sols Environ.* (2009).
- [60] R. Calvet, Analyse du concept de biodisponibilité d'une substance dans le sol, *Sci. Sol.* 26, 183–202.
- [61] D. Baize, Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégie d'interprétation., INRA Editions, Paris, 1997.
- [62] Y.-J. Cui, Y.-G. Zhu, R.-H. Zhai, D.-Y. Chen, Y.-Z. Huang, Y. Qiu, et al., Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Nanning, China, *Environ. Int.* 30 (2004) 785–791.
- [63] N. Zheng, Q. Wang, D. Zheng, Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn, and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc Plant in China via consumption of vegetables, *Sci. Total Environ.* 383 (2007) 81–89.
- [64] W. Rosselli, C. Keller, K. Boschi, Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil, *Plant Soil.* 256 (2003) 265–272.
- [65] J. Yoon, X. Cao, Q. Zhou, L.Q. Ma, Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site, *Sci. Total Environ.* 368 (2006) 456–464.
- [66] L. Brun, J. Maillat, J. Richarte, P. Herrmann, J. Remy, Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils, *Environ. Pollut.* 102 (1998) 151–161.
- [67] J. Pichtel, K. Kuroiwa, H. Sawyerr, Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites, *Environ. Pollut.* 110 (2000) 171–178.
- [68] J.F. Briat, M. Lebrun, Plant responses to metal toxicity, *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie.* 322 (1999) 43–54.
- [69] P. Sharma, R.S. Dubey, Lead toxicity in plants, *Braz. J. Plant Physiol.* 17 (2005) 35–52.
- [70] I.V. Seregin, L.K. Shpigun, V.B. Ivanov, Distribution and Toxic Effects of Cadmium and Lead on Maize Roots, *Russ. J. Plant Physiol.* 51 (2004) 525–533.
- [71] Céréales - Productions végétales - L'agriculture - La France Agricole - actualités agriculture, météo, cours et marchés, *Fr. Agric.*
- [72] Oléagineux et protéagineux - Productions végétales - L'agriculture - La France Agricole - actualités agriculture, météo, cours et marchés, *Fr. Agric.*
- [73] La filière céréalière française - Comment sont utilisés les grains sortis de vos champs?
- [74] Les céréales dans le monde, en Europe et en France.
- [75] J. Mac Key, *Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies*, Volumes 1 and 2, Barnes Noble.
- [76] P. Feillet, *Le grain de blé: composition et utilisation*, Editions Quae, 2000.
- [77] H.C.D. de Wit, *Histoire du développement de la biologie*, PPUR presses polytechniques, 1992.
- [78] OECD, F. and A.O. of the U. Nations, *Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2008*, OECD Publishing, 2008.
- [79] D. Jonville, *Le blé : fongicides, maladies, herbicides, cours.* - BASF Agro, (2012).
- [80] Agridyne, *Calendrier de traitement du blé.*
- [81] PROLEA, CETIOM, *Des graines aux huiles et protéines végétales.*
- [82] *Production, surfaces et rendements* - CETIOM - Centre technique des oléagineux.
- [83] G. Vermeersch, *Huiles végétales: pour une valorisation industrielle*, Biofutur. 1995 (1995) 16–18.
- [84] Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains(CETIOM), *Le Tournesol: Le contexte économique, les techniques culturales, les débouchés.*
- [85] Y. Dronne, *Les enjeux des marchés du colza et de ses dérivés*, *Ol. Corps Gras Lipides.* 10 (2003) 178–186.
- [86] J. Galle, *Maladies du tournesol: mildiou, phoma, sclerotinias..*- BASF Agro, (2013).
- [87] C. Jolivet, D. Arrouays, L. Boulonne, C. Ratié, N. Saby, *Le réseau de mesures de la qualité des sols de France (RMQS), État D'avancement Prem. Résultats Étude Gest. Sols.* 13 (2006) 149–164.
- [88] INERIS, *Analyse et évaluation des aspects environnementaux/Risques pour la SST - Fiche n°2.*
- [89] *Code du travail - Article R4412-4.*
- [90] B. Toma, B. Dufour, M. Sanaa, *Généralités sur l'analyse de risque, Epidémiol Santé Anim.* 41 (2002) 5–17.

- [91] B. Dufour, R. Pouillot, Approche qualitative du risque, *Epidémiol Santé Anim.* 41 (2002).
- [92] M.E. Shils, M. Shike, *Modern Nutrition in Health and Disease*, Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [93] A. Loué, *Les oligo-éléments en agriculture*, SCPA (Société commerciale des potasses et de l'azote): Nathan, 1993.
- [94] D. Reuter, J.B. Robinson, *Plant Analysis: An Interpretation Manual*, 1997.
- [95] N. Nanos, J.A. Rodríguez Martín, Multiscale analysis of heavy metal contents in soils: Spatial variability in the Duero river basin (Spain), *Geoderma.* 189–190 (2012) 554–562.
- [96] V. Iñigo, M.S. Andrades, J.I. Alonso-Martirena, A. Marín, R. Jiménez-Ballesta, Spatial variability of cadmium and lead in natural soils of a humid Mediterranean environment: La Rioja, Spain, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64 (2013) 594–604.
- [97] D. Baize, Teneurs totales en “ métaux lourds ” dans les sols français résultats généraux du programme ASPITET, *Courrier de l'environnement*, 2000.
- [98] Dictionnaire de l'environnement. Les termes normalisés, AFNOR, Paris la Défense, 1994.
- [99] A. Franco-Uría, C. López-Mateo, E. Roca, M.L. Fernández-Marcos, Source identification of heavy metals in pastureland by multivariate analysis in NW Spain, *J. Hazard. Mater.* 165 (2009) 1008–1015.
- [100] J. Iqbal, M.H. Shah, Distribution, correlation and risk assessment of selected metals in urban soils from Islamabad, Pakistan, *J. Hazard. Mater.* 192 (2011) 887–898.
- [101] P. Godin, Les sources de pollution des sols: Essai de quantification des risques dus aux éléments traces, *Sci. Sol.* 2 (1983) 73–87.
- [102] C. Juste, I. Feix, J. Wiart, *Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines*, ADEME Editions, Paris, 1995.
- [103] J.C. Katyal, N.S. Randhawa, *Les oligo-éléments*, Food & Agriculture Org., 1986.
- [104] C.K. Jain, I. Ali, Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques, *Water Res.* 34 (2000) 4304–4312.
- [105] M. Bissen, F.H. Frimmel, Arsenic — a Review. Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31 (2003) 9–18.
- [106] A. Tremel-Schaub, I. Feix, France, Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie, Contamination des sols: transferts des sols vers les plantes, EDP Sciences; ADEME, Les Ulis [France]; Angers, 2005.
- [107] V. Brochier, Teneurs en ETM dans les récoltes, (2011).
- [108] S. Dauguet, L. Denaix, C. Nguyen, P. Levasseur, M. Potin-Gautier, G. Lespes, et al., Mesure des flux d'éléments traces (Pb, Cd, As, Zn) dans les sols, végétaux, porcs et lisiers des exploitations porcines du Sud-Ouest, *Innovations Agronomiques.* (2011) 175–190.
- [109] K.A. Wolnik, F.L. Fricke, S.G. Capar, G.L. Braude, M.W. Meyer, R.D. Satzger, et al., Elements in major raw agricultural crops in the United States. 1. Cadmium and lead in lettuce, peanuts, potatoes, soybeans, sweet corn, and wheat, *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 1240–1244.
- [110] P.H. Bourrelier, J. Berthelin, *Contamination des sols par les éléments en traces: Les risques et leur gestion*, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 1998.
- [111] EUR-Lex - Directive 2002/32/CE du Parlement européen et du Conseil du 7 mai 2002 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux - Déclaration du Conseil.
- [112] EUR-Lex - Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- [113] A.M. Chaudri, F.J. Zhao, S.P. McGrath, A.R. Crosland, The cadmium content of British wheat grain, *J. Environ. Qual.* 24 (1995) 850–855.
- [114] V. Sappin-Didier, S. Brayette, C. Jadé, D. Baize, P. Masson, M.J. Mench, Phytodisponibilité du cadmium pour le blé. Rôle des paramètres pédologique et agronomiques, *Éléments Traces Métalliques Dans Sols Approach. Fonct. Spatiales Baize Tercé MEds INRA.* (2002).
- [115] D. Arrouays, C. Jolivet, L. Boulonne, G. Bodineau, C. Ratié, N. Saby, et al., Le réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS) de France, *Etude Gest. Sols.* 10 (2003) 241–250.
- [116] M. Barbaste, *Quasaprove*, (2012).
- [117] E. Donnat, F. Fleurat-Lessard, *Quasaprove: Qualité sanitaire des productions végétales de grandes cultures.*

- [118] M. Rambonilaza, Normes sociales et productivité dans le processus d'appariement des contrats agricoles, *Actual. Économique*. 80 (2004) 571.
- [119] J. Masai, La série E de Pylos: un cadastre?, *Rev. Belge Philol. Hist.* 45 (1967) 97–115.
- [120] Référentiel technique national de la certification horticole, (2010).
- [121] K. Aichberger, J. Bäck, The Austrian soil sampling procedure tested in a field study (CEEM-project), *Sci. Total Environ.* 264 (2001) 175–180.
- [122] G. Wagner, P. Lischer, S. Theocharopoulos, H. Muntau, A. Desaulles, P. Quevauviller, Quantitative evaluation of the CEEM soil sampling intercomparison, *Sci. Total Environ.* 264 (2001) 73–101.
- [123] G.U. Fortunati, C. Banfi, M. Pasturenzi, Soil sampling, *Fresenius J. Anal. Chem.* 348 (1994) 86–100.
- [124] M. Van der Perk, P. de Zorzi, S. Barbizzi, M. Belli, A. Fajgelj, U. Sansone, et al., The effect of short-range spatial variability on soil sampling uncertainty, *Appl. Radiat. Isot.* 66 (2008) 1582–1587.
- [125] J. de Gruijter, D. Brus, M. Bierkens, M. Kotters, Sampling for natural resource monitoring, (2006) xiii + 332 pp.
- [126] X.J. Wang, F. Qi, The effects of sampling design on spatial structure analysis of contaminated soil, *Sci. Total Environ.* 224 (1998) 29–41.
- [127] D.J. Brus, J.J. de Gruijter, Random sampling or geostatistical modelling? Choosing between design-based and model-based sampling strategies for soil (with discussion), *Geoderma*. 80 (1997) 1–44.
- [128] J.-P. Boudreault, J.-S. Dubé, M. Sona, E. Hardy, Analysis of procedures for sampling contaminated soil using Gy's Sampling Theory and Practice, *Sci. Total Environ.* 425 (2012) 199–207.
- [129] M.S.U.G.P.R.P. of C. and S.S.W.K.K.B. Station, U. of G.D.C.C.R.P. of E.I. of Ecology, A.C.S.B.P. of S.E. in the D. of L., and Water Resources University of California Davis, P.S.P. of F.E. and S. in the F.S.D.O.S. University, *Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research*, Oxford University Press, 1999.
- [130] A. Sahuquillo, A. Rigol, G. Rauret, Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 152–159.
- [131] D.C. Adriano, *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals*, Springer, 2001.
- [132] NF EN 12457-2 - Caractérisation des déchets - Lixiviation - Essai de conformité pour lixiviation des déchets fragmentés et des boues - Partie 2: essai en bûchée unique avec un rapport liquide-solide de 10 l/kg et une granularité inférieure à 4 mm (sans ou avec réduction de la granularité).
- [133] NF ISO 18772 - Qualité du sol - Lignes directrices relatives aux modes opératoires de lixiviation en vue d'essais chimiques et écotoxicologiques ultérieurs des sols et matériaux du sol.
- [134] E. Barriuso, I.N. de la R.A. (Francia), *Estimation des risques environnementaux des pesticides*, Editions Quae, 2004.
- [135] S. lorraine des sciences, *Bulletin*, 1920.
- [136] A.D. McNaught, A. Wilkinson, *Compendium of chemical terminology*, Blackwell Science Oxford, 1997.
- [137] L. Sigg, W. Stumm, P. Behra, *Chimie des milieux aquatiques: chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*, Masson, 1992.
- [138] F. Andreux, C. Munier-Lamy, *Genèse et propriétés des molécules humiques*, *Pédologie*. 2 (1994) 109–142.
- [139] V. Ndira, *Substances humiques du sol et du compost. Analyse élémentaire et groupements atomiques fictifs: vers une approche thermodynamique*, (2006).
- [140] J.A. Acosta, S. Martínez-Martínez, A. Faz, J. Arocena, Accumulations of major and trace elements in particle size fractions of soils on eight different parent materials, *Geoderma*. 161 (2011) 30–42.
- [141] E. Besnard, C. Chenu, M. Robert, Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils, *Environ. Pollut.* 112 (2001) 329–337.

- [142] C. Parat, R. Chaussod, J. Leveque, S. Dousset, F. Andreux, The relationship between copper accumulated in vineyard calcareous soils and soil organic matter and iron, *Eur. J. Soil Sci.* 53 (2002) 663–670.
- [143] J. Tolu, I. Le Hécho, M. Bueno, Y. Thiry, M. Potin-Gautier, Selenium speciation analysis at trace level in soils, *Anal. Chim. Acta.* 684 (2011) 126–133.
- [144] M.L. Ruello, M. Sileno, D. Sani, G. Fava, DGT use in contaminated site characterization. The importance of heavy metal site specific behaviour, *Chemosphere.* 70 (2008) 1135–1140.
- [145] P. Figura, B. McDuffie, Determination of labilities of soluble trace metal species in aqueous environmental samples by anodic stripping voltammetry and Chelex column and batch methods, *Anal. Chem.* 52 (1980) 1433–1439.
- [146] J. Buffle, M.-L. Tercier-Waeber, Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to *in situ* measurements, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 172–191.
- [147] M. Pesavento, G. Alberti, R. Biesuz, Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: a review, *Anal. Chim. Acta.* 631 (2009) 129–141.
- [148] W. Davison, H. Zhang, In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels, *Nature.* 367 (1994) 546–548.
- [149] H. Ernstberger, W. Davison, H. Zhang, A. Tye, S. Young, Measurement and Dynamic Modeling of Trace Metal Mobilization in Soils Using DGT and DIFS, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 349–354.
- [150] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, John Wiley & Sons, 2006.
- [151] H.P. van Leeuwen, *Metal Speciation Dynamics and Bioavailability: Inert and Labile Complexes*, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3743–3748.
- [152] T.M. Florence, The speciation of trace elements in waters, *Talanta.* 29 (1982) 345–364.
- [153] V. Tanguy, M. Waeles, J. Vandennecke, R.D. Riso, Determination of ultra-trace Sb(III) in seawater by stripping chronopotentiometry (SCP) with a mercury film electrode in the presence of copper, *Talanta.* 81 (2010) 614–620.
- [154] N. Serrano, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Stripping Chronopotentiometry in Environmental Analysis, *Electroanalysis.* 19 (2007) 2039–2049.
- [155] P.R.M. Silva, M.A. El Khakani, M. Chaker, A. Dufresne, F. Courchesne, Simultaneous determination of Cd, Pb, and Cu metal trace concentrations in water certified samples and soil extracts by means of Hg-electroplated-Ir microelectrode array based sensors, *Sens. Actuators B Chem.* 76 (2001) 250–257.
- [156] M.-L. Tercier-Waeber, F. Confalonieri, G. Riccardi, A. Sina, S. Nöel, J. Buffle, et al., Multi Physical–Chemical profiler for real-time *in situ* monitoring of trace metal speciation and master variables: Development, validation and field applications, *Mar. Chem.* 97 (2005) 216–235.
- [157] A. Lamotte, A. Hagège, M. Leroy, *Analyse de traces et d’ultratraces d’éléments*, Ed. Techniques Ingénieur.
- [158] R.W. Jakuba, J.W. Moffett, M.A. Saito, Use of a modified, high-sensitivity, anodic stripping voltammetry method for determination of zinc speciation in the North Atlantic Ocean, *Anal. Chim. Acta.* 614 (2008) 143–152.
- [159] G.C. Barker, I.L. Jenkins, Square-wave polarography, *Analyst.* 77 (1952) 685–696.
- [160] S.P. Kounaves, J.J. O’Dea, P. Chandrasekhar, J. Osteryoung, Square wave anodic stripping voltammetry at the mercury film electrode: theoretical treatment, *Anal. Chem.* 59 (1987) 386–389.
- [161] A. Economou, Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 334–340.
- [162] Y. Bonfil, M. Brand, E. Kirowa-Eisner, Characteristics of subtractive anodic stripping voltammetry of Pb and Cd at silver and gold electrodes, *Anal. Chim. Acta.* 464 (2002) 99–114.
- [163] K. Wu, S. Hu, J. Fei, W. Bai, Mercury-free simultaneous determination of cadmium and lead at a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes, *Anal. Chim. Acta.* 489 (2003) 215–221.

- [164] O. Zaouak, L. Authier, C. Cugnet, A. Castetbon, M. Potin-Gautier, Electroanalytical Device for Cadmium Speciation in Waters. Part 1: Development and Characterization of a Reliable Screen-Printed Sensor, *Electroanalysis*. 22 (2010) 1151–1158.
- [165] O. Zaouak, L. Authier, C. Cugnet, A. Castetbon, M. Potin-Gautier, Bismuth-Coated Screen-Printed Microband Electrodes for On-Field Labile Cadmium Determination, *Electroanalysis*. 21 (2009) 689–695.
- [166] M. Li, Y.-T. Li, D.-W. Li, Y.-T. Long, Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays--a review, *Anal. Chim. Acta*. 734 (2012) 31–44.
- [167] K.C. Honeychurch, J.P. Hart, Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 456–469.
- [168] S.B. Saban, R.B. Darling, Multi-element heavy metal ion sensors for aqueous solutions, *Sens. Actuators B Chem.* 61 (1999) 128–137.
- [169] W. Lund, M. Salberg, Anodic stripping voltammetry with the florence mercury film electrode. determination of copper, lead and cadmium in sea water, *Anal. Chim. Acta*. 76 (1975) 131–141.
- [170] M.B. Gholivand, S. Bahrami, S. Abbasi, A. Sohrabi, Simultaneous Determination of Nickel and Cadmium by Adsorptive Stripping Voltammetry, *Electroanalysis*. 20 (2008) 1367–1373.
- [171] K.C. Honeychurch, D.M. Hawkins, J.P. Hart, D.C. Cowell, Voltammetric behaviour and trace determination of copper at a mercury-free screen-printed carbon electrode, *Talanta*. 57 (2002) 565–574.
- [172] L. Moreno-Baron, A. Merkoçi, S. Alegret, Graphite-epoxy composite as an alternative material to design mercury free working electrodes for stripping voltammetry, *Electrochimica Acta*. 48 (2003) 2599–2605.
- [173] Le plan Local d'Urbanisme P.L.U. Commune d'Auzeville-Tolosane - SICOVAL.
- [174] C. Jolivet, L. Boulonne, C. Ratié, Manuel du Réseau de Mesure de la Qualité des Sols, (2006).
- [175] Direction de l'environnement, Organisation de Coopération et de Développement Economique, Les principes de l'OCDE de bonnes pratiques de laboratoire (tels que révisés en 1997), (1998).
- [176] S. Desalme, T. Dalix, P. Soulé, D. Orignac, M. Barbaste, Choix du broyeur en vue de l'analyse d'éléments en traces dans les plantes, (2011).
- [177] M. Bouhnik-Le Coz, P. Petitjean, E. Serrat, G. Gruau, Validation d'un protocole permettant le dosage simultané des cations majeurs et traces dans les eaux douces naturelles par ICP-MS, (2001).
- [178] H. Paucot, M. Potin-Gautier, J.-M. Mermet, E. Poussel, ICP-MS : couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie de masse | Techniques de l'Ingénieur, (2010).
- [179] J. Frayret, J.-M. Mermet, H. Paucot, ICP-OES : couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie optique | Techniques de l'Ingénieur, (2012).
- [180] M. Nič, J. Jiráč, B. Košata, A. Jenkins, A. McNaught, eds., Limit of detection in analysis, in: IUPAC Compend. Chem. Terminol., 2.1.0 ed., IUPAC, Research Triangle Park, NC.
- [181] I.M. Farnham, A.K. Singh, K.J. Stetzenbach, K.H. Johannesson, Treatment of nondetects in multivariate analysis of groundwater geochemistry data, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 60 (2002) 265–281.
- [182] S.S. Shapiro, M.B. Wilk, An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples), *Biometrika*. 52 (1965) 591.
- [183] S. Tufféry, Étude de cas en statistique décisionnelle, Editions TECHNIP, 2009.
- [184] O. Guéniat, P. Esseiva, Le profilage de l'héroïne et de la cocaïne: une méthodologie moderne de lutte contre le trafic illicite, PPUR presses polytechniques, 2005.
- [185] A. Lu, J. Wang, X. Qin, K. Wang, P. Han, S. Zhang, Multivariate and geostatistical analyses of the spatial distribution and origin of heavy metals in the agricultural soils in Shunyi, Beijing, China, *Sci. Total Environ.* 425 (2012) 66–74.
- [186] H. El Hadri, P. Chéry, S. Jalabert, A. Lee, M. Potin-Gautier, G. Lespes, Assessment of diffuse contamination of agricultural soil by copper in Aquitaine region by using French national databases, *Sci. Total Environ.* 441 (2012) 239–247.
- [187] M. Arnaud, X. Emery, Estimation et interpolation spatiale: méthodes déterministes et méthodes géostatiques, Hermes Science Publications, 2000.

- [188] O. Zaouak, L. Authier, C. Cugnet, E. Normandin, D. Champier, M. Rivaletto, et al., Electroanalytical Device for Cadmium Speciation in Waters. Part 2: Automated System Development and Cadmium Semicontinuous Monitoring, *Electroanalysis*. 22 (2010) 1159–1165.
- [189] S. Sauvé, A. Dumestre, M. McBride, W. Hendershot, Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation of Pb²⁺ and Cu²⁺, *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1998) 1481–1489.
- [190] J.O. Agbenin, P. Felix-Henningsen, Dynamics of copper fractions and solubility in a savanna soil under continuous cultivation, *Nutr. Cycl. Agroecosystems*. 68 (2004) 117–125.
- [191] J.Y. Cornu, L. Denaix, A. Schneider, S. Pellerin, Temporal evolution of redox processes and free Cd dynamics in a metal-contaminated soil after rewetting, *Chemosphere*. 70 (2007) 306–314.
- [192] L.W. Hall Jr., R.D. Anderson, J.V. Kilian, B.L. Lewes, K. Traexler, Acute and chronic toxicity of copper to the estuarine copepod *Eurytemora affinis*: Influence of organic complexation and speciation, *Chemosphere*. 35 (1997) 1567–1597.
- [193] L.W. Hall Jr, R.D. Anderson, B.L. Lewis, W.R. Arnold, The influence of salinity and dissolved organic carbon on the toxicity of copper to the estuarine copepod, *Eurytemora affinis*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54 (2008) 44–56.

ANNEXES

**ANNEXE 1 : Aide au prélèvement et à la constitution des
échantillons au laboratoire (Chapitres 2 et 3)**

Ce document a servi lors des campagnes d'échantillonnage pour l'équipe de préleveurs

I/ Application du protocole d'échantillonnage à la parcelle

Positionner les points de prélèvement selon la méthodologie du Protocole d'Echantillonnage Aléatoire Stratifié (PEAS) suivante :

- 1) Définir les bordures de la placette à au moins 5 mètres à l'intérieur de la bordure de la parcelle ;
- 2) Découper la placette en 20 sous placettes (division régulière par 5 sur la longueur et par 4 sur la largeur) ;
 - a) Placer 1 point de prélèvement au niveau de chaque coin de la placette (type A) ;
 - b) Placer 1 point de prélèvement aléatoirement dans chacune des 16 sous placettes restantes (type A) ;
- 3) Découper la placette en 4 « grandes sous placettes » et placer 1 point de prélèvement aléatoirement dans chacune d'entre elles (type B) ;
- 4) Placer un dernier point de prélèvement aléatoirement dans la placette entière (type C).

II/ Prélèvements

a) Pour le blé :

Prélever 4 épis par point de prélèvement en utilisant un couteau en céramique (dépourvu d'éléments métalliques). Placer les épis issus d'un même point de prélèvement dans 1 sac plastique distinct.

1 sac plastique par point de prélèvement → 25 sacs plastiques contenant 4 épis chacun.

Nomenclature: PEAS1, PEAS2, PEAS3 ... PEAS25.

La grille compte 25 points de prélèvement.

→ Prélèvement total de 100 épis

b) Pour le tournesol :

Prélever 20 grains par point de prélèvement. Placer les lots de grains issus d'un même point de prélèvement dans 1 sac plastique distinct.

1 sac plastique par point de prélèvement → 25 sacs plastiques contenant 20 grains chacun.

Nomenclature: PEAS1, PEAS2, PEAS3 ... PEAS25.

La grille compte 25 points de prélèvement.

→ Prélèvement total de 500 grains

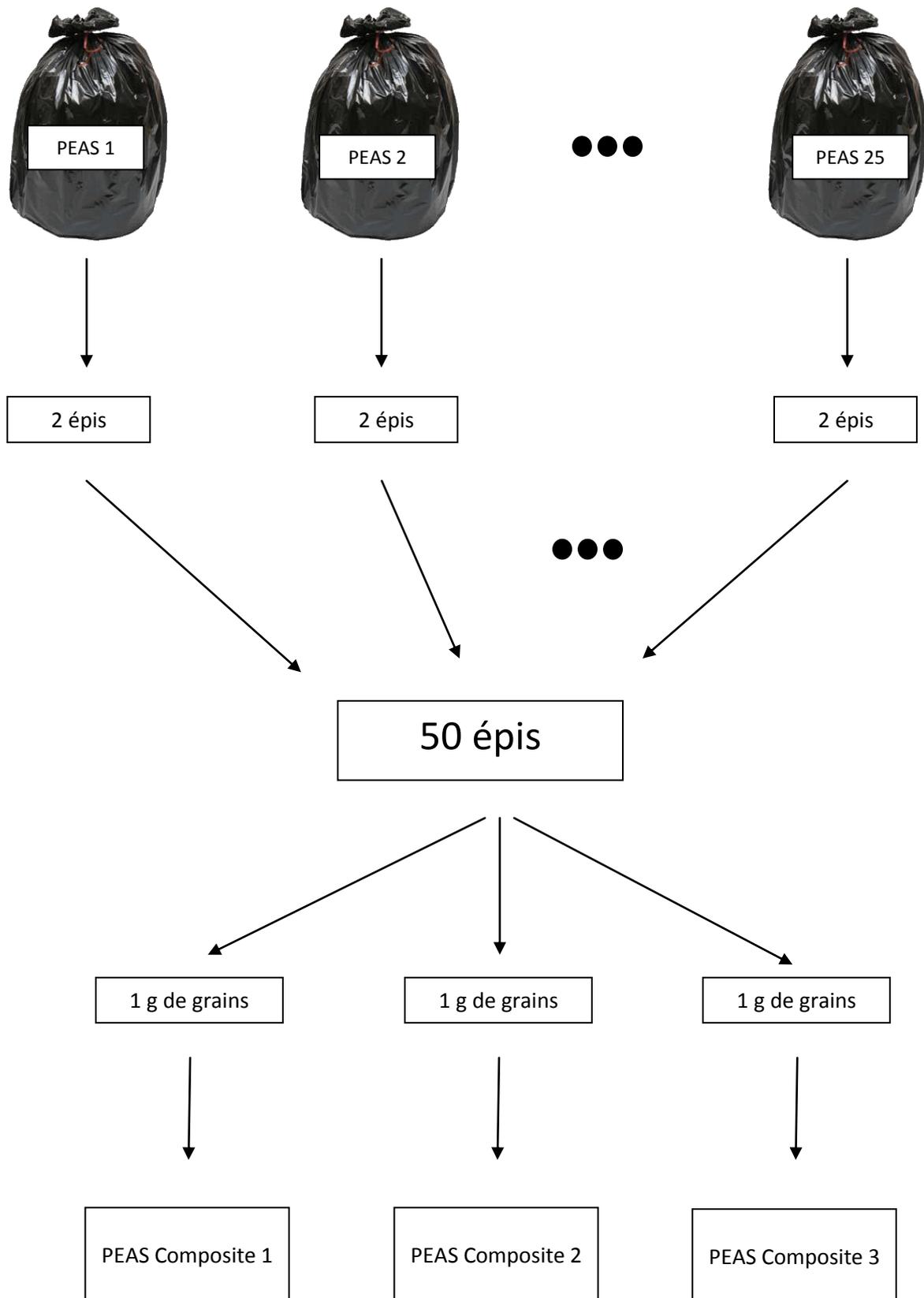
III/ Evaluation de la concentration globale en ETM à l'échelle de la parcelle

a) Pour le blé :

Les 25 sacs plastiques PEAS contiennent 4 épis chacun.

- 1) Pour chacun des 25 sacs, choisir aléatoirement 2 épis et regrouper l'ensemble ;
- 2) Egrainer les épis. Conserver seulement les grains ;
- 3) Après homogénéisation, préparer 3 échantillons de 1 g de grains ;
- 4) Le lot de 25 épis formé constitue un échantillon composite. Cette opération est à répliquer trois fois afin de préparer 3 échantillons composites de grains ;
- 5) Sécher les 3 échantillons composites à 50 °C pendant 24 h. Les peser ;
- 6) Broyer les grains pour chacun des échantillons.

→ 3 échantillons à analyser

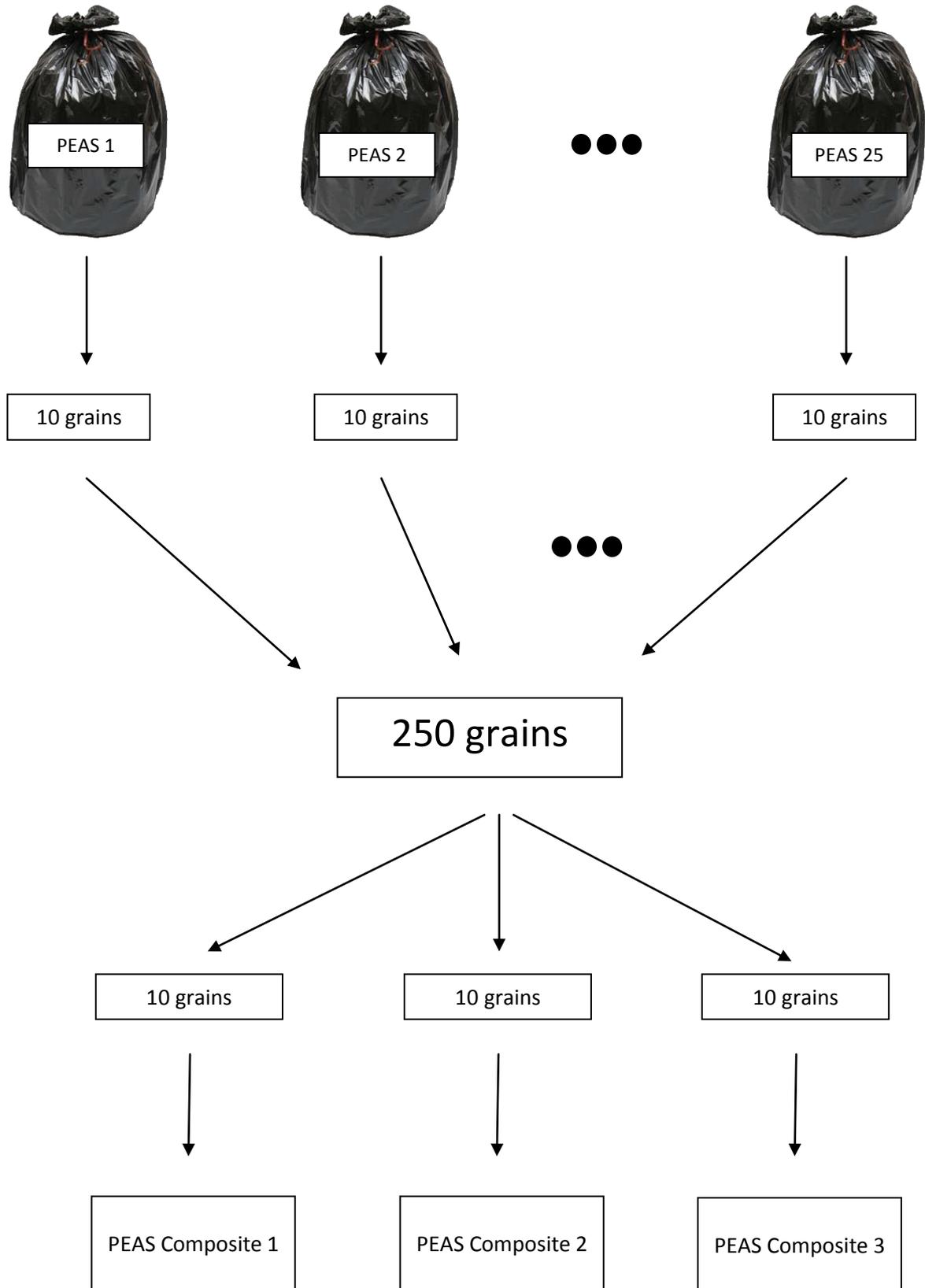


b) Pour le tournesol :

Les 25 sacs plastiques PEAS contiennent 20 grains chacun.

- 1) Pour chacun des 25 sacs, choisir aléatoirement 10 grains et regrouper l'ensemble ;
- 2) Après homogénéisation, préparer 3 échantillons de 10 de grains de tournesol ;
- 3) Le lot de 10 grains formé constitue un échantillon composite de plantes. Cette opération est à répliquer trois fois afin de préparer 3 échantillons composites de plantes ;
- 4) Sécher les 3 échantillons composites à 50 °C pendant 24 h. Les peser ;
- 5) Ne pas broyer les grains pour chacun des échantillons afin de ne pas obtenir une pâte huileuse.

→ 3 échantillons à analyser



IV/ Spatialisation des ETM à l'échelle de la parcelle

a) Pour le blé :

A ce stade, chaque sac contient 2 épis. Le but est de connaître la contamination au niveau chacun des 25 points de la placette PEAS pour évaluer les variations de contamination à l'échelle de la parcelle.

Les opérations à suivre sont les suivantes :

- 1) Pour chacun des sacs, sortir les 2 épis restantes ;
- 2) Egrainer les épis. Conserver seulement les grains ;
- 3) Sécher les 25 échantillons à 50 °C pendant 24 h et les peser ;
- 4) Broyer les grains pour chacun des échantillons.

→ 25 échantillons à analyser

b) Pour le tournesol :

A ce stade, chaque sac contient 10 grains. Le but est de connaître la contamination au niveau chacun des 25 points de la placette PEAS pour évaluer les variations de contamination à l'échelle de la parcelle.

Les opérations à suivre sont les suivantes :

- 1) Pour chacun des sacs, sortir les 10 grains restants ;
- 2) Sécher les 25 échantillons à 50 °C pendant 24 h et les peser. Ne pas broyer les grains étant donné leurs hautes teneurs en huile.

→ 25 échantillons à analyser

ANNEXE 2 : Localisation des points de prélèvement
(Chapitre 3)

Grains de blé - Parcelle C6 - Juillet 2011

Coordonnées Lambert II		Nomenclature
X	Y	Points de prélèvement
579145,1	6272067,1	PEAS 1
579124,2	6272051,7	PEAS 2
579156,4	6272046,9	PEAS 3
579171,7	6272021,1	PEAS 4
579193,9	6272015,1	PEAS 5
579214,5	6272010,6	PEAS 6
579185,0	6272001,8	PEAS 7
579233,4	6271994,9	PEAS 8
579205,2	6271987,7	PEAS 9
579232,6	6271971,9	PEAS 10
579264,1	6271972,3	PEAS 11
579238,3	6271945,3	PEAS 12
579277,8	6271947,8	PEAS 13
579261,0	6271929,5	PEAS 14
579297,5	6271921,2	PEAS 15
579323,3	6271916,3	PEAS 16
579269,3	6271899,8	PEAS 17
579290,2	6271888,9	PEAS 18
579335,4	6271883,3	PEAS 19
579319,7	6271868,8	PEAS 20
579299,1	6271851,0	PEAS 21
579341,4	6271851,0	PEAS 22
579329,8	6271827,2	PEAS 23
579377,7	6271820,0	PEAS 24
579326,5	6271804,3	PEAS 25

Grains de blé - Parcelle CL - Juillet 2012

Coordonnées Lambert II		Nomenclature
X	Y	Points de prélèvement
579508	6271332	PEAS 1
579532	6271242	PEAS 2
579510	6271298	PEAS 3
579514	6271259	PEAS 4
579458	6271305	PEAS 5
579464	6271274	PEAS 6
579497	6271255	PEAS 7
579493	6271214	PEAS 8
579452	6271235	PEAS 9
579420	6271270	PEAS 10
579475	6271206	PEAS 11
579422	6271250	PEAS 12
579425	6271207	PEAS 13
579393	6271258	PEAS 14
579387	6271239	PEAS 15
579436	6271171	PEAS 16
579387	6271185	PEAS 17
579358	6271222	PEAS 18
579312	6271243	PEAS 19
579394	6271137	PEAS 20
579446	6271282	PEAS 21
579510	6271235	PEAS 22
579365	6271233	PEAS 23
579404	6271164	PEAS 24
579468	6271191	PEAS 25

Grains de tournesol - Parcelle C6 - Aout 2012

Coordonnées Lambert II		Nomenclature
X	Y	Points de prélèvement
579143,2	6272065,2	PEAS 1
579124,7	6272052,2	PEAS 2
579157,1	6272046,3	PEAS 3
579172,3	6272017,9	PEAS 4
579194,2	6272016,6	PEAS 5
579215,2	6272011,4	PEAS 6
579184,9	6272001,4	PEAS 7
579232,9	6271993,2	PEAS 8
579205,2	6271988,2	PEAS 9
579231,4	6271973,0	PEAS 10
579264,4	6271972,6	PEAS 11
579237,7	6271945,2	PEAS 12
579278,1	6271947,5	PEAS 13
579261,3	6271929,4	PEAS 14
579297,8	6271921,5	PEAS 15
579323,2	6271916,2	PEAS 16
579269,3	6271900,1	PEAS 17
579290,6	6271888,4	PEAS 18
579335,3	6271882,6	PEAS 19
579340,9	6271850,7	PEAS 20
579299,2	6271851,1	PEAS 21
579358,1	6271848,1	PEAS 22
579329,8	6271826,8	PEAS 23
579378,3	6271819,0	PEAS 24
579326,7	6271803,8	PEAS 25

ANNEXE 3 : Développement d'un système expert pour
l'échantillonnage et l'analyse des éléments trace dans les
végétaux de grandes cultures

(Chapitre 3)

VALORISATION DES TRAVAUX

SCIENTIFIQUES

- **ARTICLES SCIENTIFIQUES**

S. FAUCHER, C. CUGNET, L. AUTHIER, G. LESPES, *Determination of total and electrolabile copper in agricultural soil by using disposable modified- carbon Screen-Printed Electrodes.* Sous presse dans Analytical Bioanalytical Chemistry. Octobre 2013.

S. FAUCHER, C. CUGNET, L. AUTHIER, G. LESPES, *Speciation of copper in agricultural soils contaminated by lead using disposable screen-printed electrodes and Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry (SPE-SWASV).* En voie de soumission dans The Analyst

S. FAUCHER, C. CUGNET, P. CHERY, P. SOULE, M. BARBASTE, G. LESPES, *Development of a sampling strategy for assessing spatial distribution of trace elements in soil and plants at field scale.* En préparation

- **PARTICIPATIONS A DES MANIFESTATIONS NATIONALES**

Communications orales :

S. FAUCHER, C. CUGNET, P. CHERY, P. SOULE, A. GAVALAND, F. FORGET, M. BARBASTE, G. LESPES. *Echantillonnage des végétaux pour une analyse multi-contaminants.* Présenté lors du comité de pilotage du Réseau Mixte Technologique pour la Qualité sanitaire des productions végétales de grandes cultures (RMT QUASAPROVE). Paris, Janvier 2013.

S. FAUCHER, C. CUGNET, P. SOULE, P. CHERY, M. BARBASTE, G. LESPES. *Mise au point d'un protocole d'échantillonnage opérationnel pour une analyse multi-contaminants.* Présenté lors de la réunion de bilan - fin de projet de la Région Aquitaine. Bordeaux, Octobre 2013.

Communication par affiche :

S. FAUCHER. C. CUGNET. P. SOULE. P. CHERY. A. GAVALAND. M. BARBASTE. G. LESPES. *Développement et validation d'un protocole de prélèvement de plantes céréalières représentatif d'une parcelle pour une analyse multi-contaminants.* Présenté lors du 4^{ème} colloque qualité sanitaire des céréales à Paris. Mars 2012.

Determination of total and electrolabile copper in agricultural soil by using disposable modified-carbon screen-printed electrodes

Stéphane Faucher · Cyril Cugnet · Laurent Authier · Gaëtane Lespes

Received: 12 July 2013 / Revised: 3 October 2013 / Accepted: 17 October 2013 / Published online: 5 November 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The objective of the study is to evaluate modified-carbon screen-printed working electrodes (SPE) combined with square wave anodic stripping voltammetry (SWASV) to determine electrolabile and total copper in soils with the perspective to assess the environmental hazard resulting from copper anthropogenic contamination. The voltammetric method was investigated using a mineralized certified reference soil such that it can be assumed that the copper was totally under electrolabile form in the solution of mineralized soil. In optimal conditions, a copper recovery of 97 % and a relative standard deviation (RSD) of 9 % were found. The limits of detection and quantification for copper were 0.4 and 1.3 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Finally, the method was applied on soil leachates, which allowed evaluating the cupric transfer from the soil to the leachates and quantifying the electrolabile copper part in leachates.

Keywords Copper · Screen-printed electrodes (SPE) · Square wave anodic stripping voltammetry (SWASV) · Electrolabile · Leachates

Introduction

The presence of metals in agricultural soil is an increasing concern because of their risks to fauna and flora. They

have a natural origin, but their accumulation is mostly due to anthropogenic activities, in particular in the case of copper in vineyard soils, brought by the excessive use of pesticides such as the Bordeaux mixture ($\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$). The total metal concentration is not sufficient to evaluate the ecotoxicological hazard. However, such determination is a necessary analytical prerequisite in a speciation strategy to relevantly assess this hazard [1]. Regarding total analyses, atomic spectrometry is a technique widely used, after solid sample mineralization, due to its multielemental capabilities, and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is very often preferred for its high sensitivity. Nevertheless, electrochemical methods can be used for such analyses, and more recently, the stripping methods, based on metal preconcentration onto a modified solid working electrode at a fixed deposition potential, have been shown as potentially more relevant for total metal determination. The interest of these methods is attributed to their notable sensitivity, multielement and speciation capabilities, low cost, and suitability to on line measurements. Square wave anodic stripping voltammetry (SWASV) is mainly used during the stripping step because it enhances the sensitivity of the analytical signal. However, the employment of a classical hanging mercury electrode with a glass capillary leads to irreproducible dropping characteristics and inaccuracy because of the etching of the glass capillary itself, especially in the case of the solution from hydrofluoric acid (HF)-based mineralization of soil. Lately, stripping analyses were performed by using modified-carbon screen-printed working electrodes (SPE). The advantages in using them come from their easy mass production at the laboratory, their low cost, their repeatability, and their geometrical shape adapted as the analytical constraints.

Published in the special issue *Analytical Science in France* with guest editors Christian Rolando and Philippe Garrigues.

S. Faucher · C. Cugnet (✉) · L. Authier · G. Lespes
Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et
Environnement (LCABIE), UMR 5254 IPREM, Université de Pau et
des Pays de l'Adour, 2 Avenue Pierre Angot,
64053 Pau Cedex 9, France
e-mail: cyril.cugnet@univ-pau.fr

Moreover, SPE are expected to be more robust than classical dropping mercury electrodes regarding the present application, and more especially the physicochemical characteristics of the solution of the HF-based mineralized soil [2]. In addition, speciation analysis of trace metals can be performed by electrochemical methods, which lead to electrolabile forms. These methods need no treatment of the soil solution (leachate), which is not the case with other analytical techniques [3]. Because there is no means to verify the accuracy of the electrolabile metal concentration, the labile metal could be estimated complementarily by using diffusive gradients in thin film technique (DGT). DGT allows determining free ions, all inorganic complexes, and part of the organic complexes of dissolved metal species while voltammetry allows reaching free and weak inorganic metal complexes only. So, it is expected that the labile metal concentration given by DGT was higher than the electrolabile one [4].

From this brief state of the art, the strategy involving jointly ICP-MS and SPE-SWASV for total and electrolabile copper determination appears intrinsically capable of evaluating the risk of the copper transfer from the soil to the plant. Another attractive strategy is to only use SWASV-based methods to achieve the same information. To our knowledge, no such strategy has been reported for soil. Considering all this, the aim of this work was to evaluate SPE-SWASV for total and electrolabile copper determination. For that, a mineralized certified reference soil was used in order to develop the method, assuming that the total copper concentration was under electrolabile form in the solution of mineralized soil. Then, copper analyses were performed by SPE-SWASV in order to verify the certified reference value for total copper in reference soil. Finally, the optimized method was used from leachates in order to deliver copper speciation information relative to an agricultural soil.

Materials and methods

Soil samples

The certified reference soil (loam soil ERM-CC141) comes from the Institute for Reference Materials and Measurements (Retieseweg, B-2440, Geel, Belgium). The natural soil analyzed was sampled in Bordeaux in 2012 at 0–30 cm depth interval, on a plot where vineyards were cultivated. After sampling, the soil was air-dried and ground to pass through a 2-mm sieve. Physical and chemical characteristics were obtained from the Laboratoire d'Analyses des Sols-INRA-ARRAS, France. The soil was silty sand, and the values of pH, organic carbon, P_2O_5 phosphorous, and cation exchange

capacity (CEC) were 8.01, 5.94 g kg⁻¹, 0.08 g kg⁻¹, and 8.13 cmol kg⁻¹, respectively.

Preparation and copper determination of the solutions of mineralized soil

Two hundred fifty milligrams of soil was mineralized in a closed system microwave (Ethos Touch Control, Milestone GMBH, Shelton, the USA) with 6 mL of nitric acid (HNO₃ 70 %, Atlantic laboratory, Bruges, Belgium), 2 mL of HF (60 %, Atlantic laboratory, Bruges, Belgium), and 2 mL of hydrogen peroxide (H₂O₂ 30 %, Atlantic laboratory, Bruges, Belgium). The determination of total copper in the solutions of mineralized soil was jointly performed by SPE-SWASV and ICP-MS. Indeed, through the mineralization step, all the copper present in the solution of mineralized soil being in electrolabile form, the value obtained by SPE-SWASV analysis must also correspond to the reference value. Concerning the SPE-SWASV analyses, the solutions of mineralized soil were recovered and diluted 15 times in 0.2 mol L⁻¹ acetate buffer prepared from sodium hydroxide monohydrate (NaOH, H₂O 99.9995 %, Sigma-Aldrich) and acetic acid (C₂H₄O₂ 99 %, Fluka, USA). Boric acid (H₃BO₃ 99.99 %, Prolabo, Paris, France) was added in excess in order to complex the hydrofluoric acid. The diluted samples were filtered at 0.45 μm before analysis. Concerning the ICP-MS analyses, the solutions of mineralized soil were diluted 50 times and filtered at 0.45 μm after boric acid addition. Then, copper was determined by standard addition calibration using indium as internal standard (purity 99 %, Sigma-Aldrich).

Leaching procedure

Leachings were carried out according to the Standard NF ISO 18772 using a rotary agitator (STR4 Stuart) provided with a programmer, allowing the user to regulate the duration and the speed of agitation: 24 h and 10 turns min⁻¹ respectively. Eight grams of dry soil and 80 g of ultra pure water exit of Milli-Q System (18 MΩ cm) were introduced into a 100-mL polypropylene centrifugation bottle, cleaned beforehand with nitric acid (10 %) and Milli-Q water. Leachings were performed in triplicate. Once agitation ended, the bottles were withdrawn from the agitator and left elutriated for 30 min. Then, they were centrifuged for 30 min at 15,000 rpm. The leachates were then collected, filtered at 0.45 μm, and stored at 4 °C in a polypropylene bottle until analysis.

Total and electrolabile copper determination in the leachates

Concerning the determination of total copper, leachates were filtered at 0.45, diluted 100 times, and acidified to 2 % by

using HNO₃ 70 %. The analysis was made by internal calibration using indium as internal standard. The total copper in the leachates was quantified in order to estimate the extractable copper from the soil and to compare the values obtained with the quantities of electrolabile copper determined by SPE-SWASV. Concerning the electrolabile copper determination, leachate conductivities were increased by potassium nitrate (KNO₃) addition (99.995 %, Merck, France) to obtain a satisfactory peak for SPE-SWASV analysis. Carbon SPE were developed at the laboratory, their preparation and the apparatus used being described elsewhere [5]. Copper was reduced at a potential of -0.8 V for 60 s duration under stirring. After 30 s of equilibrated time, stripping voltammogram was recorded by applying an anodic square wave potential scan from -0.8 to +0.1 V. The peak area was retained as the analytical answer. A volume of 10 mL of sample was used for each analysis. The samples were analyzed three times in order to evaluate the repeatability and the accuracy of the measurement. Labile metals were also determined with DGT. This determination was performed by UMR TCEM-INRA-Centre de Bordeaux Aquitaine, France.

Results and discussion

Modified-carbon screen-printed working electrodes were designed especially as disposable sensors, with all the benefits that come from the concept of an easily renewable sensor. In particular, the possibility to frequently change the sensor allows reducing the risk of contamination from one analysis to another. Tests of SPE measurement conditions were performed to define the lifetime of the disposable electrode and the solution analyzed. These tests revealed that the relative standard deviation (RSD), estimated from three copper measurements by SPE-SWASV, is minimal by using a new SPE and a new solution for each measurement. These conditions, retained for SPE-SWASV analyses, lead to a RSD inferior to 10 % in the solution of mineralized soil and water matrices for total and labile copper determination, respectively. In the case of copper labile determination, the conductivity of the leachates is not sufficient to obtain satisfactory sensitivity, so addition of 10⁻² mol L⁻¹ of KNO₃ was carried out in the leachates to increase the sensitivity. For this concentration, the amount of electrolabile forms remains constant as predicted by the Visual Minteq software. Thus, the determination of electrolabile copper is not affected by this addition. Nonetheless, the conductivity in the solution of mineralized soil was sufficient because of the salt concentrations in acids, so no KNO₃ addition was envisaged in this case.

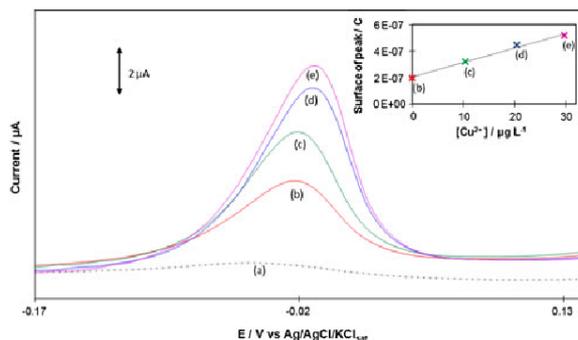


Fig. 1 Square wave voltammograms obtained for copper standard addition quantification. SWASV parameters: electrodeposition 0.8 V for 60 s, equilibration time 30 s, frequency 25 Hz, potential step 8 mV, potential amplitude 25 mV. (a) Solution of mineralized blank diluted 15 times, (b) solution of mineralized certified reference soil diluted 15 times, (c) same as (b) + addition of 10 µg Cu L⁻¹, (d) same as (b) + addition of 20 µg Cu L⁻¹, (e) same as (b) + addition of 30 µg Cu L⁻¹

Quantification procedure of total copper in the reference soil

The accuracy of the copper determination was then evaluated. Ideally, a reference solution sample obtained from soil and certified for its copper amount should be used. However, such material does not exist. So, a certified reference soil was mineralized. The resulting solution was assumed to be obtained with 100 % copper recovery. For the total copper determination, SPE-SWASV analyses were performed using standard addition calibrations (Fig. 1).

The certificated copper concentration is 14.4±1.4 mg (Cu)/kg (soil) for the reference soil. The determination of total copper by SPE-SWASV reveals a total copper concentration of 14.0±1.4 mg (Cu)/kg (soil) that leads to a copper recovery of 97 % and a precision of 91 %. Analyses were also performed by ICP-MS, and the value obtained was 15.0±0.6 mg (Cu)/kg (soil) for the total copper in the reference soil. All the results obtained by both techniques are the same (no significant difference), showing that copper can be reliably

Table 1 Total, electrolabile, and labile copper from the natural vineyard soil

Total concentration in soil ^a (mg kg ⁻¹)	Total concentration in leachate (µg L ⁻¹)	Labile and electrolabile concentrations in soil (µg L ⁻¹)		Percentage of electrolabile ^a (%)	
		DGT ^b	SPE-SWASV	In soil	In leachate
93±12	339±14	79±6	38±3	0.41±0.09	11±2

^a Calculated from the value obtained by SPE-SWASV

^b Value obtained from UMR TCEM-INRA-Centre de Bordeaux Aquitaine, France

determined by SPE-SWASV in soils. The limits of detection and quantification for copper (0.4 and $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively) have been calculated according to IUPAC recommendations: $\text{LOD}=3 \text{ SD}/s$ and $\text{LOQ}=10 \text{ SD}/s$, with SD =standard deviation of the background signal and s =slope of the curve.

Applicability: determination of copper speciation information in agricultural soil

The aim of this part was to apply the SPE-SWASV to a natural soil sample for total and electrolabile copper determination and check its applicability by evaluating the accuracy and the repeatability. Total copper concentrations obtained by SPE-SWASV and ICP-MS were 93 ± 12 and $88 \pm 3 \text{ mg Cu/kg soil}$, respectively.

Then, the total and the electrolabile copper were determined in the leachates. The electrolabile copper determination process was performed in three independent leachate analysis replicates, the leaching process being triplicated (i.e., $n=3 \times 3$). This process also allows evaluating intra- and inter-repeatability. The concentrations obtained are presented in Table 1. Only the results for the natural soil are reported because the leachates obtained with the certified reference soil contain copper below the limit of detection. Labile copper analysis was performed by DGT in order to compare the value obtained with the electrolabile one.

The results of electrolabile copper determined by voltammetry and labile copper determined by DGT have been compared, which allows verifying the relevance of the SPE-SWASV method. Regarding the values obtained, electrolabile copper is lower than the labile copper as expected. Concerning the repeatability, RSD was found to be 6 and 19 % for intra- and inter-repeatability, respectively. From all these different results, SPE-SWASV is proved to be robust. Additionally, in the natural vineyard soil studied, electrolabile metal represents a low part of the total content in this soil. However, regarding the level of copper contamination, a significant amount of this element is released under electrolabile form in the leachate.

Conclusion

Finally, and from an analytical point of view, all these results confirm that SPE-SWASV can be used at once for the determination of total copper and of its electrolabile forms. Indeed, SPE-SWASV proves to be an interesting analytical tool in order to perform a mass balance of a metal of interest in environmental media such as agricultural soils. From an environmental point of view, in the vineyard soils considered and containing a high quantity of copper, a very low part of this element proves to be under electrolabile forms, confirming the relatively low impact of the copper onto its potential transfer toward living organisms.

Acknowledgments The authors acknowledge the Region Aquitaine and the Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et Rural (CASDAR) for funding.

References

1. El Hadri H, Chéry P, Jalabert S, Lee A, Potin-Gautier M, Lespes G (2012) Assessment of diffuse contamination of agricultural soil by copper in Aquitaine region by using French national databases. *Sci Total Environ* 441:239–247
2. Truzzi C, Annibaldi A, Illuminati S, Bassotti E, Scarponi G (2008) Square-wave anodic-stripping voltammetric determination of Cd, Pb, and Cu in a hydrofluoric acid solution of siliceous spicules of marine sponges (from the Ligurian Sea, Italy, and the Ross Sea, Antarctica). *Anal Bioanal Chem* 392:247–262
3. Pesavento M, Alberti G, Biesuz R (2009) Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: a review. *Anal Chim Acta* 631:129–141
4. Hall LW Jr, Anderson RD, Lewis BL, Arnold WR (2008) The influence of salinity and dissolved organic carbon on the toxicity of copper to the estuarine copepod, *Eurytemora affinis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 54:44–56
5. Zaouak O, Authier L, Cugnet C, Castetbon A, Potin-Gautier M (2010) Electroanalytical device for the cadmium speciation in waters. Part 1: Development and characterization of a reliable screen-printed sensor. *Electroanalysis* 22:1151–1158

Développement de méthodes d'évaluation de la teneur en éléments trace pour la qualité sanitaire des récoltes

Ce travail de recherche porte sur la mise en place d'outils permettant d'évaluer le transfert en éléments trace des sols agricoles vers les plantes. Il a été ciblé sur quatre éléments trace métalliques réglementés dans le sol et/ou la plante à savoir le cadmium, le cuivre, le plomb, le zinc, ainsi qu'un élément trace supplémentaire en voie de réglementation, l'arsenic. Dans un premier temps, un protocole d'échantillonnage a été développé afin de disposer d'un outil de diagnostic pré-récolte. Le cahier des charges a été défini de telle façon que ce protocole soit opérationnel, représentatif de la parcelle, applicable pour différentes parcelles et cultures et autorise une spatialisation de la concentration en éléments trace. Il est de type aléatoire stratifié afin de pouvoir couvrir la totalité de la surface étudiée. Dans un second temps, l'étude s'est portée sur le développement d'une méthode d'analyse des sols par électrochimie afin de disposer d'un outil d'évaluation de la biodisponibilité potentielle des éléments traces et donc du risque de transfert sol - plante. Pour ce faire, les concentrations des éléments sous leurs formes électrolabiles ont été déterminées par voltamétrie de redissolution anodique utilisant des électrodes sérigraphiées élaborées au laboratoire. La méthode a été développée et validée à partir d'une solution de sol de référence minéralisé. Elle a été par la suite appliquée à des solutions de différents sols agricoles obtenues par lixiviation selon un protocole normalisé (NF ISO 18772).

Development of assessment methods of the trace element content for the sanitary quality of crops

This study concerns the establishment of tools, which allow evaluating the transfer of trace elements from agricultural soils to plants. It focused on four metal trace elements regulated in soil and/or in plants, which are cadmium, copper, lead, zinc, as well as a trace element in the process of regulation, arsenic. First, a sampling protocol was developed in order to dispose of a tool of pre-harvest diagnostic. The specifications were defined such that this protocol is operational, representative of the parcel, applicable to various parcels and crops and authorizes a spatial distribution of the trace element concentration. It is based on random stratified type in order to be able to cover the whole of the considered area. Then, the study focused on the development of a soil analysis method by electrochemistry in order to dispose of a tool for assessing the potential bioavailability of trace elements and therefore the risk of the soil - plant transfer. For that, the electrolabile form concentrations of these elements were determined by anodic stripping voltammetry using screen printed electrodes produced at the laboratory. The method was developed and validated from a solution of a mineralized certified reference soil. It was subsequently applied to solutions of different agricultural soils obtained by leaching according to a normalized protocol (NF ISO 18772).