Distribution, spéciation impact et transfert du cuivre dans un sol sous vigne : rôle de la structuration spatiale et du statut organique

Aline Navel

▶ **To cite this version:**

Aline Navel. Distribution, spéciation impact et transfert du cuivre dans un sol sous vigne : rôle de la structuration spatiale et du statut organique. Sciences de la Terre. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENU042 . tel-00680030

HAL Id: tel-00680030

https://theses.hal.science/tel-00680030

Submitted on 17 Mar 2012

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

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

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Océan, Atmosphère, Hydrologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Aline NAVEL

Thèse dirigée par
Jean MARTINS et Lorenzo SPADINI

préparée au sein du

Laboratoire d'étude des Transferts en Hydrologie et Environnement (LTHE)

dans **l'Ecole Doctorale Terre-Univers-Environnement**

Distribution, spéciation, impact et transfert du cuivre dans un sol sous vigne : rôle de la structuration spatiale et du statut organique.

Thèse soutenue publiquement le **18 Novembre 2011**,

devant le jury composé de :

M. Pascal BOIVIN
Professeur HES-SO Genève DR-IRD, Suisse, President.
M. Philippe BAVEYE
Professeur, HDR, Rensselaer Polytech. Inst., Troy, USA, Rapporteur.
Mme Claire CHENU
Professeur, HDR, AgroParisTech, UMR BioEMCo, Paris, Rapporteur.
M. Laurent CHARLET
Professeur, HDR, Laboratoire ISTerre, Grenoble, Examinateur.
M. Lionel RANJARD
DR-INRA, HDR, UMR MSE, Dijon, Examinateur.
M. Lorenzo SPADINI
MC-UJF, Laboratoire LTHE, Grenoble, Co-directeur de la thèse
M. Jean MARTINS
CR1-CNRS, HDR, Laboratoire LTHE, Grenoble, Directeur de la thèse.

Remerciements

Ce mémoire est l'aboutissement de mes travaux c'est-à-dire trois années de travail mais aussi la fin de mes études. Elles ont été variées de géologue à biogéochimiste en passant par la planétologie toujours dans le but de comprendre le fonctionnement de la terre. Je remercie d'avance tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réussite de cette thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier mes directeurs de thèse Jean MARTINS et Lorenzo SPADINI. Je les remercie de m'avoir fait confiance pour réaliser ces travaux. Je tiens tout particulièrement à remercier Jean qui fut à l'origine du bon déroulement de cette thèse. Sa disponibilité, sa confiance et sa patience, ses compétences scientifiques et rédactionnelles, ainsi que son soutient dans les moments difficiles ont été très importants dans la réussite de mes travaux. Je te remercie de m'avoir accordé une grande partie de ta disponibilité pour répondre à mes questions ainsi que de m'avoir aider dans ma formation sur le métier de chercheur. Tu m'as prodigué de nombreux conseils que je m'appliquerai à suivre du mieux que je peux. Saches que je suis très fière de compter parmi tes doctorants. Je t'adresse un GRAND MERCI. Je remercie également Lorenzo pour son aide dans les analyses chimiques mais aussi la modélisation. Tout ceci était pour moi très abstrait au départ. Au cours de ces trois années, tu m'as permis de découvrir l'enseignement et l'encadrement d'étudiants qui sont à mes yeux des choses importantes car elles permettent la diffusion mais surtout la transmission du savoir scientifique.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'analyser mes travaux de thèse. Je remercie particulièrement mes rapporteurs Claire CHENU et Philippe BAVEYE pour leur relecture de ma thèse, leurs conseils ainsi que leurs remarques pertinentes chacun dans leur domaine. Je remercie également Laurent CHARLET pour sa présence mais aussi sa confiance pour l'assister pendant ses cours et de m'avoir donné la possibilité d'enseigner. Lionel RANJARD pour sa présence mais aussi pour m'avoir enseigner les méthodes de biologie moléculaire. Pour finir, merci à Pascal BOIVIN d'avoir accepter d'être le président de ce jury ainsi que pour les conseils qu'il m'a apportés lors de la soutenance.

Je tiens à remercier Thierry LEBEL pour m'avoir permis de réaliser mes travaux au sein du laboratoire d'étude des transferts en hydrologie et environnement. Je remercie aussi les membres de l'équipe Transpore pour les discussions et questionnements scientifiques lors des séminaires ou pause café (thé) ainsi que pour leur aide durant cette thèse. Je voudrais adresser un remerciement au personnel administratif toujours très efficace et compréhensible et pour les différents moments de partage.

Le projet MOBiPo-Cu m'a permis de participer à un programme de recherche nationale et d'interagir avec plusieurs laboratoires présentant des compétences spécifiques mais complémentaires. Je remercie les membres de ce projet (Lionel, Isabelle, Pierre, Alain, Lorenzo, Jean, Pierre-Alain, Virginie) pour leurs interactions mais aussi leurs conseils qu'ils m'ont donnés pendant les réunions. Merci à la chambre d'agriculture de Saône et Loire de m'avoir donnée accès, dans le cadre de ce projet, à la fameuse parcelle viticole de Clessé de Mr Daniel LACROZE le propriétaire qui a bien voulu laisser sa parcelle viticole à la science. Cette parcelle où il est facile de se perdre, c'est grâce au trèfle et non au nord que nous arrivons à s'orienter parmi les pieds de vigne, afin de se ravitailler après les prélèvements dans le petit restaurant du coin où les habitués nous scrutent comme des extraterrestres.

Sans l'aide d'Erwann et Virginie qui m'ont enseigné l'art et les méthodes de la microbiologie comment aurais-je pu faire de la microbiologie en doctorat sachant que je n'avais pas fait de biologie depuis le bac. Merci à eux de m'avoir soutenu dans les nombreuses analyses biologiques. Je pense que vous n'oublierez pas le super conditionnement (épendorf de 1.5mL pour extraire le sol ou les falcon 50mL qui envahissent les paillasses) de mes échantillons. Fini Erwan la poussière dans tous les labos ainsi que la préparation de boites de pétri à la chaîne. Je tiens aussi à remercier Hervé pour son aide dans les analyses de

granulométrie laser. Merci à Delphine qui m'a formée sur l'ensemble des analyses chimiques avec l'ICP. Cette machine très sophistiquée permet de faire beaucoup de mesures mais comme certaines personnes le savent devient un peu capricieuse dès qu'elle me voit arriver au labo.

Un merci tout particulier à mes collègues de bureau notamment Aurélien, Sylvie et Elsa. Merci Aurélien d'avoir partagé ces trois années. On ne saura pas qui est le plus bordélique mais nous avons toujours retrouvé ce que nous cherchions. J'ai beaucoup apprécié notre partage de connaissances mais aussi tous les autres moments (colloques, manipes, attentes, discussions,…). Merci Sylvie d'avoir été là. Que dire ! tu m'as apportée ta bonne humeur quotidienne, les chocolats belges (merci au sponsor côte d'or !!!), ton sens de l'organisation très apprécié ainsi que tous les moments de partage (le midi et sur Dijon). Merci aussi à Elsa pour toutes nos discussions à la fois scientifiques que sur la gymnastique mon sport préféré. Que serions-nous devenus sans notre tableau blanc de « pisychologie » et les cours associés de Danilo.

Certes nous n'étions pas dans le même bureau, ni la même équipe, mais je tenais à te remercier particulièrement Hélène pour ton soutient et les temps de partage que nous avons eu pendant ces trois années. Malgré toutes les péripéties qui me sont arrivées sur la fin de mon doctorat tu as toujours été à mon écoute ce qui m'a fortement aidée.

Merci aux doctorants et stagiaires qui étaient présents pendant ces trois années et avec qui j'ai plus ou moins interagit : Solène, Aurélien (bis), Thomas, Clément, Anne-Julie, Rémi B. André, Danilo, Adrien, Johan, Rémi C. Gérémy, Aloïs, Simon, Valentin, Jingjing, Nan.
Comment ne pas faire dans ces remerciements un mot sur la cafet qui est passée d'une salle d'archives à une vrai cafet. N'ayant pas fréquenté le RU pendant trois ans, merci pour les temps de partage avec les accros de la cafet du midi au labo. Que serait une cafet sans café, ni thé ou encore pire sans sucre ? Désolée aux accros du café pour les manques occasionnés mais essayez de passer au thé, il y en a toujours en réserve.

Merci à mes amis qu'ils soient à Grenoble ou restés dans l'ouest tout particulièrement à Sylvie et Greg et leurs enfants pour tous les bons moments passés avec eux. Merci aussi à Paul, Marthe, Anne, JB, Mélanie, Laure, Mathilde, Jonathan, Alex, Audrey, Lucie, Luc, Adeline, Christine avec qui j'ai passé des moments précieux.

Pour finir, il y a ma famille sans qui chacun le sait je ne serais pas arrivée jusqu'ici. Je voudrais remercier Marie-Josée et Louis-Claude « mes parents adoptifs » de Grenoble. Merci pour ces dimanches passés chez vous et les superbes randonnées en montagne avec ces pique-niques étonnants. Une pensée toute particulière pour ceux qui sont partis trop vite et que je garde toujours dans mon cœur. Puis, il y a ma famille proche. Tout d'abord mes frères toujours présents pour me taquiner comme quand nous étions enfants et mes sœurs que je prends toujours en exemple. Merci d'être toujours là pour votre petite sœur. Merci également à leurs conjoints qui sont toujours à mon écoute. Merci à tous mes neveux et nièces en particulier mes filleuls (Cannelle et Maxence) qui me rappellent qu'il faut toujours garder une âme d'enfant surtout lorsqu'on joue au tamis pendant des jours au laboratoire. Mais surtout merci à mes parents qui m'ont tout donné, toujours disponibles en toutes circonstances et sans qui je ne serais pas là. Ils m'ont donné la vie, leur amour, leur confiance, leur soutien mais aussi l'éducation et les moyens pour parvenir à réussir ce doctorat. C'est pourquoi je voudrais leur dédier ce travail.

Enfin, merci à toi Vincent pour ton soutient et ton accompagnement au quotidien. Merci pour tout.

Comme je l'ai dit très souvent : QUAND ON VEUT ON PEUT !!!

Résumé

Depuis des décennies, les sols sous vignes subissent de forts enrichissements en cuivre avec l'apport non maîtrisé de Bouillie Bordelaise pour lutter contre le mildiou. Bien qu'encore mal compris, le cuivre à des effets néfastes, à forte concentration, pour le fonctionnement biogéochimique des sols.

Pour mieux comprendre le devenir et l'impact du cuivre dans les sols, nous avons mené une étude pluridisciplinaire pour établir les relations biogéochimiques qualitatives et quantitatives contrôlant la rétention, l'impact et la mobilité du cuivre dans un sol sous vigne de Clessé (Bourgogne) soumis à différents modes de gestion d'intrants organiques. Par une approche combinant géochimie, physique des sols et microbiologie, nous avons montré que le mode de gestion des intrants organiques (Contrôle, paille, compost de conifère, fétuque et trèfle) à l'échelle de la parcelle modifie les propriétés bio-physico-chimique du sol à l'échelle des micro-agrégats, et notamment la distribution du COT et du cuivre ainsi que sa biodisponibilité pour les bactéries et les plantes. L'amendement du sol avec du compost de conifère induit des variations les plus importantes de ses statuts organique et biologique (en comparaison avec le sol non amendé), raisons pour lesquelles nous l'avons choisi pour une étude en mésocosmes contaminés au Cu (240 $mg.kg^{-1}_{ss}$) et incubés durant 2 ans en laboratoire. Tout au long de cette période, nous avons suivi l'évolution de la spéciation solide et liquide du cuivre à micro-échelle (via une technique de fractionnement granulométrique du sol), la distribution et la dégradation de la MO, l'impact du cuivre dans les microhabitats microbiens du sol, ainsi que la mobilité du cuivre. Ces travaux nous ont ainsi permis de montrer des effets contrastés de l'amendement organique du sol sur le devenir du cuivre, avec d'une part un effet protecteur pour le sol en termes d'impact et, d'autre part, un effet néfaste en termes de risque environnemental liée à la forte augmentation de la mobilité du cuivre (qui reste faible toutefois) par la MO soluble apportée par le compost de conifère. Ces effets sont clairement sous le contrôle initial de la spéciation chimique du cuivre, qui évolue dans les premiers mois suivant la contamination, induisant un impact transitoire sur les communautés bactériennes du sol, puis à plus long terme, sous le contrôle de la structure spatiale du sol et de la dégradation de la MO enrichie en cuivre, via le contrôle du temps de contact cuivre/bactéries. Ces différents aspects ont pu être correctement simulés par une modélisation simplifiée avec le logiciel PhreeqC combinant des processus géochimiques et hydrodynamiques.

Cette étude a permis de montrer que la gestion des intrants organiques des sols de culture à l'échelle de la parcelle doit être menée de manière raisonnée en considérant les bénéfices mais aussi les retombés néfastes, notamment en termes de risques pour les ressources en eau.

Mots clés : Sols viticoles, amendements organiques, micro-agrégats, cuivre, spéciation, biodisponibilité, distribution micro-échelle, impact, communautés bactériennes, microhabitats, mobilité du cuivre, modélisation couplée hydrogéochimique.

Abstract

Vineyard soils become increasingly contaminated with copper due to Bordeaux mixture applications to vines to control the fungus *Peronospora* causing the "Mildew disease". Despite being poorly understood, high copper concentrations have irreversible harmful effects on soil biocenosis and soil functioning.

To better understand these effects, we conducted a multidisciplinary study in order to establish the biogeochemical relations governing the retention, speciation, impact and mobility of copper in a vineyard soil located at Clessé (Burgundy, France) that has undergone several organic management practices for over 20 years. Through a combined geochemical, hydrological and microbial approach, we have shown that the type of surface organic management of the soil (control, straw and conifer compost amendments, fescue and clover vegetalization) strongly modifies the biogeochemical properties of the soil at the microscale (aggregates), and especially the TOC and Cu contents as well as its bioavailability to bacteria and plants. The soil treatment with conifer compost was the one that induced the strongest changes in soil properties. This is the reason why we used it in comparison with a non amended control soil to conduct a soil mesocosm study to evaluate the effect of a copper contamination (240 $mg.kg^{-1}_{ds}$) during a 2 years incubation period. All along this period, we characterized the solid and liquid speciation of copper and its ageing and distribution at the micro-aggregate scale (through a soil physical fractionation technique), as well as the distribution and degradation of OM. We also established the impact of copper to bacterial communities in each bacterial microhabitat of the two soils over the 2 years of incubation, and the mobility of copper through soil leaching experiments. Our results permitted to show that the compost amendment of the soil induced contrasted effects on copper fate. We observed beneficial effects on Cu toxicity (OM protective effect) but detrimental effects on water quality due to the increase of Cu mobility (although it remains low) caused by copper facilitated transport, once chelated by mobile soluble organic compounds released by the compost. On the short term, these effects are clearly controlled by copper speciation, that induce a strong and fast ageing of the contamination (Cu becomes poorly exchangeable), resulting in an important but transitory impact of copper on soil bacterial communities. After the ageing of copper, copper effects become dominantly controlled by copper/bacteria contact kinetics that is driven by both the soil spatial structure and the degradation of Cu-enriched OM. All our results were correctly fitted using a PhreeqC simplified modelling based on the coupling of soil hydrodynamics and biogeochemistry.

This study clearly demonstrates that the field scale management of the organic status of vineyard soils should be chosen and conducted cleverly by carefully weighing up the beneficial and detrimental effects of copper repeated applications.

Keywords: Vineyard soils, organic amendments, micro-aggregates, copper, speciation, bioavailability, microscale distribution, impact, bacterial communities, microhabitats, Cu mobility, biogeochemistry modelling

Table des matières

Remerciements iii

Résumé v

Abstract vi

Table des matières vii

Table des illustrations xi

Table des tableaux xvi

Index xvii

Introduction générale 1

Chapitre I Etat de l'art 9

I-1 Le sol 11

I-1-1 L'utilisation des sols. 11

I-1-2 Les constituants du sol 11

I-1-2-1 La phase gazeuse 11

I-1-2-2 La phase aqueuse 12

I-1-2-3 La phase solide 12

I-1-2-3-1 Les composés inorganiques 12

I-1-2-3-2 Les composés organiques 15

I-1-3 Organisation spatiale des sols en agrégats 19

I-1-3-1 Naissance du concept de hiérarchisation des sols en agrégats. 19

I-1-3-2 Les facteurs influençant la stabilité des agrégats de sols. 20

I-1-3-2-1 La matière organique des sols 20

I-1-3-2-2 Les organismes vivants 22

I-1-3-2-3 Les cycles humectations/dessiccations 23

I-1-3-2-4 Les agents inorganiques 24

I-1-4 Le compartiment bactérien des sols. 25

I-1-4-1 Distribution des bactéries dans les sols. 25

I-1-4-2 Facteurs contrôlant la distribution des populations bactériennes dans les sols 27

I-2 Les contaminations métalliques des sols : cas du cuivre 29

I-2-1 Présentation générale 29

I-2-2 Origines des métaux en traces dans les sols. 29

I-2-2-1 Origine naturelle 30

I-2-2-2 Origine anthropique 30

I-2-2-3 Utilisation du cuivre pour l'agriculture 31

I-2-3 La spéciation du Cuivre 32

I-2-3-1 En solution. 34

I-2-3-2 En phase solide. 34

I-2-3-3 Les phases porteuses du cuivre 35

I-2-3-3-1 Interactions du cuivre avec les argiles 35

I-2-3-3-2 Les oxydes et hydroxydes métalliques 36

I-2-3-3-3 La rétention du Cu par la matière organique 36

I-2-4 Impact du cuivre sur les bactéries des sols 38

I-2-4-1 Réponse des bactéries à un stress cuprique 38

I-2-4-2 Biodisponibilité du cuivre 40

I-3 Conclusion de l'état de l'art 42

Chapitre II Effet de la gestion des intrants organiques sur les propriétés bio physico chimiques d'un sol viticole. ___ *43*

II-1 Introduction ___ **45**

II-2 Matériel et Méthodes ___ **46**
II-2-1 Description du site d'étude ___ 46
II-2-2 Méthode de fractionnement physique non déstructurant du sol ___ 48
II-2-3 Analyses physiques des sols ___ 49
II-2-3-1 Masse volumique apparente des sols ___ 49
II-2-3-2 Distribution de taille des constituants des sols ___ 49
II-2-4 Analyses chimiques des sols ___ 49
II-2-4-1 Concentrations totales en Carbone organique et azote ___ 49
II-2-4-2 Concentration en éléments majeurs des sols ___ 50
II-2-5 Spéciation solide et liquide du cuivre. ___ 50
II-2-5-1 Analyse du cuivre lié à la matrice solide ___ 50
II-2-5-2 Spéciation du cuivre en solution ___ 51
II-2-5-3 Mesure de la biodisponibilité du cuivre ___ 51
II-2-5-3-1 Le cuivre biodisponible pour les bactéries ___ 51
II-2-5-3-2 Le cuivre biodisponible pour les plantes ___ 52
II-2-6 Analyses statistiques des données. ___ 52

II-3 Résultats et Discussions ___ **53**
II-3-1 Les propriétés du sol de Clessé ___ 53
II-3-1-1 Propriétés physiques ___ 53
II-3-1-2 Effet de l'amendement organique sur les paramètres chimiques de caractérisation du sol. ___ 55
II-3-2 Caractérisation des fractions granulométriques des sols ___ 57
II-3-2-1 Analyse de la distribution de tailles des particules des fractions par granulométrie laser ___ 57
II-3-2-2 Distribution massique des fractions granulométriques du sol de Clessé ___ 59
II-3-2-3 Propriétés physico-chimiques des fractions granulométriques des sols. ___ 60
II-3-3 Distribution du carbone organique total du sol de Clessé à l'échelle des agrégats. ___ 61
II-3-4 Distribution du cuivre dans les fractions granulométriques du sol de Clessé ___ 63
II-3-5 Spéciation du cuivre dans les sols de Clessé ___ 64

II-4 Conclusion ___ **67**

Chapitre III Effet d'une contamination cuprique sur la microflore bactérienne à moyen terme : rôle de l'amendement organique. ___ *69*

III-1 Introduction ___ **71**

III-2 Matériel et méthode ___ **73**
III-2-1 Description du site ___ 73
III-2-1-1 Description du site viticole et campagne d'échantillonnage. ___ 73
III-2-1-2 Préparation des sols remaniés ___ 74
III-2-1-3 Suivi de l'humidité des sols au cours de l'incubation ___ 74
III-2-1-4 Contamination des sols au cuivre et incubation ___ 75
III-2-2 Analyses chimiques ___ 76
III-2-2-1 Du carbone et de l'azote organique totaux ___ 76
III-2-2-2 Eléments majeurs des sols ___ 76
III-2-2-3 Caractérisation de la spéciation du cuivre. ___ 76
III-2-2-3-1 Analyse du cuivre lié à la matrice solide ___ 76
III-2-2-3-2 Analyse du cuivre libre et total échangeable en solution ___ 76
III-2-2-3-3 Analyse du cuivre biodisponible pour les bactéries. ___ 76
III-2-2-4 Mesure du pH du sol ___ 76
III-2-3 Caractérisation de l'impact du cuivre sur la microflore bactérienne ___ 77
III-2-3-1 Enumération bactérienne ___ 77
III-2-3-2 Identification des bactéries hétérotrophes cultivables totales et résistantes au cuivre. ___ 78
III-2-3-3 Indice de diversité des communautés bactériennes. ___ 78

III-3 Résultats et discussion ___ **81**
III-3-1 Dynamique du pH ___ 81
III-3-2 Composition chimique élémentaire des sols NA et CC ___ 82

III-3-3 Dynamique du carbone organique 83
III-3-3-1 Evolution de la matière organique sur la parcelle viticole 83
III-3-3-2 Evolution de la matière organique en conditions d'incubation en laboratoire. 84
III-3-4 Dynamique de la spéciation en cuivre dans le sol. 85
III-3-4-1 Analyse de la concentration totale en cuivre dans le sol de Clessé. 85
III-3-4-1-1 Evolution de la concentration en cuivre sur la parcelle viticole de Clessé 85
III-3-4-1-2 Concentration en cuivre total dans les mésocosmes de laboratoire 86
III-3-4-2 Dynamique temporelle de la teneur en cuivre échangeable au calcium pour le sol de Clessé 87
III-3-4-2-1 Dans les sols à contamination aiguë 87
III-3-4-2-2 Contamination chronique au cuivre. 89
III-3-4-2-3 Concentration en cuivre échangeable biodisponible pour les bactéries. 90
III-3-5 Impact du cuivre sur les communautés bactériennes. 91
III-3-5-1 Impact du cuivre sur les populations bactériennes cultivables dans le sol de Clessé. 91
III-3-5-2 Impact du cuivre sur la dynamique des communautés bactériennes. 93
III-3-5-2-1 Caractérisation des communautés bactériennes à T0 93
III-3-5-2-2 Effet du cuivre sur la structure des communautés bactériennes du sol de Clessé. 95

III-4 Conclusion 98

Chapitre IV Impact d'une contamination cuprique à l'échelle de l'agrégat de sol : caractérisation et évolution. 101

IV-1 Introduction 103

IV-2 Matériel et Méthodes 105
IV-2-1 Fractionnement granulométrique du sol de Clessé 105
IV-2-1-1 Protocole de Fractionnement physique peu déstructurant 105
IV-2-1-2 Caractérisation physique des fractions granulométriques. 105
IV-2-1-2-1 Caractérisation de la distribution de tailles des fractions granulométriques du sol de Clessé par granulométrie laser 105
IV-2-1-2-2 Caractérisation par microscopie électronique à balayage 105
IV-2-2 Caractérisation chimique des fractions granulométriques du sol de Clessé. 106
IV-2-2-1 Mesure du pH dans les fractions granulométriques 106
IV-2-2-2 Titrage acide base des fractions granulométriques 106
IV-2-2-3 Composition chimique des fractions granulométriques du sol de Clessé. 107
IV-2-3 Caractérisation biologique des fractions granulométriques. 108

IV-3 Résultats et Discussions 109
IV-3-1 Caractérisation physique des fractions granulométriques 109
IV-3-1-1 Distribution et évolution de la masse des fractions granulométriques 109
IV-3-1-2 Distribution de la taille des fractions granulométriques par granulométrie laser. 112
IV-3-1-3 Distribution des tailles des constituants des fractions granulométriques par microscopie électronique. 112
IV-3-2 Caractérisation chimiques des fractions granulométriques 114
IV-3-2-1 Composition chimique des fractions granulométriques du sol de Clessé 114
IV-3-2-2 Distribution et dynamique du Carbone Organique Total (COT) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé. 115
IV-3-2-3 Caractérisation et dynamique du pH dans les solutions des fractions granulométriques du sol de Clessé 119
IV-3-2-4 Capacité d'échange protonique des fractions granulométriques du sol de Clessé. 120
IV-3-2-5 Modélisation de la réactivité des fractions granulométriques du sol de Clessé 124
IV-3-2-6 Caractérisation et évolution temporelle de la distribution et de la spéciation du cuivre dans les fractions granulométriques du sol de Clessé 128
IV-3-2-6-1 Distribution de la concentration en cuivre totale 128
IV-3-2-6-2 Evolution de la concentration en cuivre 131
IV-3-2-6-3 Rôle de la réactivité aux protons des fractions granulométrique sur l'impact du cuivre et de l'effet de l'amendement organique 132
IV-3-2-6-4 Spéciation du cuivre en phase liquide. 134
IV-3-2-6-5 Dynamique du cuivre échangeable total en solution. 138
IV-3-3 Caractérisation microbiologique des fractions granulométriques du sol de Clessé 142
IV-3-3-1 Les bactéries hétérotrophes cultivables des fractions granulométriques du sol de Clessé 142

IV-3-3-2 Evolution temporelle des populations bactériennes cultivables des fractions granulométriques du sol de Clessé après contamination au cuivre. 143
IV-3-3-3 Les communautés bactériennes dans les fractions granulométriques du sol de Clessé 146
IV-3-3-4 Impact du cuivre sur les communautés bactériennes dans les fractions granulométriques du sol de Clessé 147

IV-4 Conclusion 150

Chapitre V Etude de la mobilité du cuivre et de son évolution temporelle dans le sol de Clessé 153

V-1 Introduction 155

V-2 Matériel et méthodes 157
V-2-1 Mise en place du dispositif expérimental. 157
V-2-2 Modélisation du transfert de cuivre en colonne de sol de Clessé 159

V-3 Résultats et discussion 161
V-3-1 Caractérisation des colonnes du sol de Clessé. 161
V-3-2 Evolution temporelle de la mobilité du cuivre en colonne de sol 164
V-3-2-1 Courbes de lessivage du cuivre total 164
V-3-2-2 Spéciation du cuivre lessivé 165
V-3-3 Evolution du pH au cours du lessivage du sol de Clessé 167
V-3-4 Evolution du lessivage des particules du sol de Clessé. 168
V-3-5 Evolution temporelle de la mobilité du carbone organique total. 170
V-3-6 Evolution du lessivage des bactéries du sol de Clessé 171
V-3-6-1 Lessivage des bactéries du sol de Clessé 171
V-3-6-2 Origine des bactéries lessivées, ou micro-biogéographie du sol de Clessé 173
V-3-7 Effet de l'amendement en Matière Organique sur la mobilité du cuivre. 177
V-3-8 Modélisation de la lixiviation du cuivre dans le sol de Clessé 178
V-3-8-1 Processus pris en compte dans la modélisation du transfert du cuivre. 178
V-3-8-2 Modélisation de la mobilité du carbone organique total 179
V-3-8-3 Modélisation de la lixiviation du cuivre dans le sol de Clessé 180

V-4 Conclusion 184

Conclusion Générale et Perspectives 187

Références 195

Annexes 211

Table des illustrations

Figure Intro-1 *Carte de la répartition des zones viticoles françaises. (www.cartesfrance.fr/geographie/cartes-france-agricoles/carte-france-vin.html).* 4
Figure Intro-2 *Démarche expérimentale adoptée pour répondre aux objectifs fixés de cette étude* 7
Figure I–1 *Exemple de réseau de couche tétraèdre (a) et d'octaèdre (b) formant les argiles (Hillel 1998), et l'exemple de la structure d'un feuillet de kaolinite (T/O) (c).* 13
Figure I–2 *Taille relative de quelques matériaux et particules.* 14
Figure I–3 *Représentation schématique des particules de sable, de limon et d'argiles.* 15
Figure I–4 *Les constituants de la matière organiques des sols adaptés de Calvet (2003) et Sebastia (2007)* 16
Figure I–5 *Schéma d'une cellule bactérienne* 18
Figure I–6 *Schéma de la hiérarchisation en agrégats des sols naturels* 19
Figure I–7 *Schéma des différentes interactions entre les constituants du sol intervenant dans l'agrégation des sols (Six et al. 2004).* 20
Figure I–8 *Photo d'observation en microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM Scanning Electronic Microscopy) de différentes tailles de fragments organiques dans des agrégats de diamètres 90-250 µm (Oades 1993).* 21
Figure I–9 *Photo en microscopie électronique à balayage (MEB) de microstructures induit par les racines de Festuce rubra (Dorioz et al. 1993). a=racine, b=colonies bactériennes, f=fissure* 22
Figure I–10 *Photo d'observation en microscopie électronique à balayage (MEB) de microstructure de l'association des polysaccharides avec les argiles de type kaolinite (Chenu 1993)* 23
Figure I–11 *Photo par microscopie électronique à transmission de micro-agrégat contenant des bactéries enfermées dans une structure argileuse (Ladd et al. 1993).* 26
Figure I–12 *Exemple de distribution du Cu dans les profils de différents sols viticoles à la suite de l'utilisation de fongicides cupriques : dans les sols calcaires du Languedoc (a), sols acides sableux du Beaujolais (b) et un sol d'Italie (c) (d'après Brun et al. (1998) cité par Chaignon (2001)).* 32
Figure I–13 *Différentes formes et localisations (en solution et lié à la phase solide) des éléments traces dans les sols, adapté de (Baize 1997).* 33
Figure I–14 *Distribution du cuivre sur les différentes phases réactives des constituants du sol en fonction de la profondeur dans des jeunes sols viticoles de Victorian (Pietrzak & Mcphail 2004). Gippsland est un sol sableux, Goulburn est un sol acide limoneux, et Rutherglen est un sol acide limono-argileux.* 37
Figure I–15 *Effet d'un stress métallique sur la diversité bactérienne du sol suivant deux conceptualisations différentes (Giller et al. 1998).* 39
Figure I–16 *Représentation de la biodisponibilité des micropolluants dans les sols. Importance de l'accessibilité (mise en contact) et de la disponibilité (entrée dans la cellule) des polluants pour les microorganismes (D'après (Martins 2008)). Le polluant est représenté en rouge (●), les flèches (vertes) indiquent la localisation de quelques bactéries et les flèches courbés (bleu) indiquent le déplacement du polluant dans la solution.* 41
Figure II–1 *Localisation du site d'essai agronomique en France (a). Schéma de la distribution spatiale des différentes sous parcelles amendées en matière organique et végétalisée sur la carte pédologique du sol de Clessé (b). Les points représentent les lieux de prélèvements de sols (0-5 cm).* 47
Figure II–2 *Protocole de fractionnement physique non déstructurant d'un sol adapté de Jocteur Monrozier et al. (1991).* 48
Figure II–3 *Courbes de calibration des concentrations en cuivre des solutions standard déterminées par ICP-AES. Comparaison entre la gamme de calibration de la concentration en Cu total (□) à la longueur d'onde 324.75 nm et la droite d'ajout dosé en cuivre sur un échantillon pris au hasard (o).* 50
Figure II–4 *Photo de la plante Lolium perenne prélevée sur l'ensemble des sous parcelles du sol sous vigne de Clessé.* 52
Figure II–5 *Effet de l'amendement organique (Paille et Compost de conifère) et de la végétalisation (Fétuque et Trèfle) du sol de Clessé sur la distribution de tailles des constituants (DTC) comparé au sol contrôle mesurée par granulométrie laser (Mastersizer 2000, malvern) sans et avec traitement aux ultrasons pendant 30 sec.* 54
Figure II–6 : *Carte de la concentration en cuivre sur la parcelle viticole de Clessé obtenu par une extrapolation des concentrations en cuivre mesurées dans le sol de chaque sous-parcelle par la méthode krigeage. NA : Non Amendé (contrôle), CC : amendé avec du Compost de Conifère, P : amendé avec de la Paille, Hf : végétalisé avec de la Fétuque, et Ht : végétalisé avec du trèfle. Les croix (+) correspondent aux points de prélèvements de sol.* 56
Figure II–7 *Courbe de distribution de tailles des constituants (DTC) de chaque sous fraction granulométrique du sol de Clessé (exemple du sol contrôle) obtenues par granulométrie laser (Mastersizer 2000, Malvern). La distribution des constituants est pondérée par la masse de chaque fraction* 58

Figure II–8 *Effet de l'amendement organique (Paille et Compost de conifère) et de la végétalisation (Fétuque et Trèfle) du sol de Clessé sur la courbe de distribution de taille des constituants (DTC) de la fraction <2 µm. _ 59*
Figure II–9 *Distribution massique des fractions granulométriques du sol de Clessé amendé en Paille (P) ou en Compost de Conifère (CC) et végétalisé avec de la Fétuque (Hf) ou du Trèfle (Ht) et le contrôle (non amendé NA). Les barres d'erreurs sont calculées avec des duplicats._____ 60*
Figure II–10 *Analyse en composantes principales (ACP) des concentrations en éléments majeurs (C, Fe, Al, Ca, Mg, K, et Mn) et de la concentration en Cu dans les sols traités (a) en matière organique (NA, CC, P, Hf, Ht) et dans l'ensemble des fractions (b). La figure c montre l'ordre d'explication des axes par les différents éléments analysés. Les ACP sont centrées et normailisées._____ 60*
Figure II–11 *Distribution massique du carbone organique total (COT) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé, contrôle (NA), amendé en compost de conifère (CC) et paille (P), et végétalisé avec de la Fétuque (Hf) et du Trèfle (Ht) (x mg de COT contenus dans 30 de sol fractionné). Les valeurs au-dessus des histogrammes représentent la masse de COT des sols non fractionné. Les barres d'erreurs sont calculées avec des triplicats._____ 61*
Figure II–12 *Distribution massique cumulée du cuivre contenu dans les fractions granulométriques (normalisé par la masse total de cuivre dans le sol) du sol de Clessé contrôle (NA), amendé (CC et P) et végétalisé (Hf et Ht). Les valeurs au dessus des barres correspondent à la masse de cuivre dans chaque sol. Les barres d'erreurs sont calculées avec des triplicats._____ 64*
Figure II–13 *Concentrations en cuivre dans la phase solide du sol de Clessé (noir), dans la phase liquide : cuivre échangeable au calcium (gris), et cuivre biodisponible (pointillé) ($\mu g_{Cu}.g^{-1}_{sol\ sec}$) ; et dans la plante Lolium perenne (blanc) collecté sur les cinq traitements. Les barres d'erreurs sont calculées avec des duplicats. ___ 65*
Figure III–1 *Profile de la concentration en cuivre total sur la parcelle viticole de Clessé (mesure réalisé par I. LAMY, dans le cadre du projet MOBiPo-Cu)_____ 73*
Figure III–2 *Photos des mésocosmes de laboratoire du sol contrôle (NA) (a) et du sol amendé en compost de conifère (CC) (b) dans la chambre d'incubation du LTHE. _____ 74*
Figure III–3 *Suivi de l'évolution de l'humidité massique des sols contrôle (NA) (plein) et amendé (CC) (vide) au cours des deux ans d'incubation. Les lignes horizontales (rouge) représentent les valeurs maximales d'humidité dans les NA et CC, c'est-à-dire environ 21 % et 28 % de teneur en eau massique respectivement (i.e. 80 % CAC de chaque sol). _____ 75*
Figure III–4 *Evolution du pH_w de la solution des sols contrôle NA (o) et amendé en CC (Δ), incubés en laboratoire, contaminé (blanc) ou non (noir) en cuivre à 240 ppm._____ 82*
Figure III–5 *Evolution du pH_w des sols contrôle NA (o) et amendé en CC (Δ) incubés en laboratoire avant (vide) et après (plein) la contamination avec des doses de cuivre à 60 ppm tous les 6 mois._____ 82*
Figure III–6 *Evolution in situ de la concentration ($mg\,g_{ss}^{-1}$) en carbone organique total (COT) dans le sol de Clessé (0-5 cm) non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC) après l'arrêt de l'apport en matière organique jusqu'à aujourd'hui. Les points en blanc sont issus de la littérature (Sebastia 2007; Lejon et al. 2008) _____ 84*
Figure III–7 *Evolution de la concentration en carbone organique totale (COT) dans le sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC) dans les mésocosmes de laboratoire pendant les 24 mois d'incubation dans des conditions climatiques contrôlés. _____ 85*
Figure III–8 *Evolution temporelle de la concentration en cuivre échangeable total au calcium dans les sols non amendés (Δ) et amendés en compost de conifère (o) contaminés à 240 ppm de cuivre (noir) ou non (blanc). _ 88*
Figure III–9 *Evolution temporelle de la concentration en cuivre échangeable totale au calcium dans les sols non amendé, NA (Δ) et amendé en compost de conifère, CC (o) contaminés à 240 ppm de cuivre (symbole plein) ou non (symbole vide).contaminés représenté en échelle logarithmique._____ 89*
Figure III–10 *Evolution de la concentration en cuivre échangeable au calcium, [Cu_{ex}], dans le sol de Clessé non contaminé (H_2O) ou contaminé à 240 ppm de cuivre apporté en une fois à T0 ou en 4 fois (60 ppm, CuCh) à T0, T6, T12, et T18._____ 90*
Figure III–11 *Comparaison de la concentration en cuivre échangeable (noir) avec la concentration en cuivre biodisponible (blanc) à T0 et T24mois pour le sol contrôle non amendé (NA) et le sol amendé en compost de conifère (CC).Les barres d'erreur représente l'écart type entre les duplicatas. _____ 91*
Figure III–12 *Evolution temporelle du ratio de la concentration en bactéries hétérotrophes cultivables résistantes au cuivre (B^{Cu}) sur les bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}), dans les sols contaminés au cuivre à 240 $mg_{Cu}.kg^{-1}_{ss}$ (Cu). Les symboles pleins correspondent aux résultats du sol contrôle (NA) et les symboles vides correspondent au sol amendé en compost de conifère (CC). Les barres d'erreurs correspondent à la variation entre les réplicats. _____ 92*
Figure III–13 *Photos des bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}) sur le milieu nutritif LB (a), et résistantes au cuivre (B^{Cu}) sur le milieu de culture spécifique YG-Cu (b)._____ 93*
Figure III–14 *Empreintes génétiques des sols contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC) à T0 obtenues sur gel d'acrylamide après l'extraction de l'ADN des sols, purification et PCR. _____ 94*

Figure III–15 *Analyses en composantes principales (ACP) des empreintes génétiques (ARISA) des communautés bactériennes du sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC) à T0. Axe 1 : horizontale (57.1 %) ; axe 2 : verticale (13.3 %).* _____ *95*
Figure III–16 *Evolution temporelle de l'amplitude des modifications de la structure génétique des communautés bactériennes (distance euclidienne entre les empreinte génétiques) du sol de Clessé contaminé à forte (240 ppm, •) et faible dose (4x60 ppm, ○) de cuivre ou non pour le sol non amendé (NA) et amendé (CC).* _____ *96*
Figure IV–1 *Photo du banc de titration acide base utilisé pour le sol de Clessé.* _____ *107*
Figure IV–2 *Distribution massique des fractions granulométriques du sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en compost (CC). Les barres d'erreurs ont été calculées avec quatre réplicats.* _____ *110*
Figure IV–3 *Dynamique de la distribution massique des fractions granulométriques dans le sol contrôle (NA) et dans le sol amendé en compost de conifère (CC) à chaque temps d'incubation (T0, T6 et T24 mois). Les incertitudes sont calculées avec quatre réplicats.* _____ *111*
Figure IV–4 *Observations au microscope électronique à balayage (MEB) des cinq fractions granulométriques du sol de Clessé obtenues par fractionnement physique non déstructurant : >250 (a), exemple d'agrégat de la fraction >250 µm (b), 250-63 µm (c), 63-20 µm (d),20-2 µm (e), <2 µm (f). Les images ont été obtenues sur MEB au CMTC de G-INP.* _____ *113*
Figure IV–5 *Concentration en Carbone Organique Total (COT) des fractions granulométriques ($mg.g^{-1}_f$) du sol de Clessé amendé (CC) en compost de conifère ou non (NA).* _____ *116*
Figure IV–6 *Evolution de la distribution du carbone organique total (COT) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé non amendé (NA) ou amendé (CC) en compost de conifère, au cours des 2 ans d'incubation (0, 6, et 24 mois) en conditions contrôlées (mésocosmes de laboratoire). Les incertitudes son calculés à partir des mesures de réplicats.* _____ *117*
Figure IV–7 *pH_w à l'eau des fractions granulométriques du sol de Clessé avant la contamination au cuivre dans le sol contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC). Les barres d'erreurs ont été calculées avec des duplicats.* _____ *119*
Figure IV–8 *Dynamique du pH dans les fractions granulométriques du sol contrôle (NA) et du sol amendé (CC) au cours de l'incubation à T0 (noir), T6mois (blanc) et T24mois (gris). Les barres d'erreurs sont calculées comme l'écart type entre les réplicats.* _____ *120*
Figure IV–9 *Courbes de titration acide base des fractions granulométriques du sol de Clessé, non amendé (NA, bleu vide) et amendé en compost de conifère (CC, rouge plein), entre les pH 4 et 10. Les différentes courbes correspondent aux différents échantillons analysés.* _____ *121*
Figure IV–10 *Valeurs du ratio ΔHs/COT dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère.* _____ *123*
Figure IV–11 *Modélisation de la répartition de la capacité d'échange de protons théorique entre la MO (gris), les argiles (blanc) et les autres composés (résiduel) du sol (noir) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé non amendé (NA) ou amendé en compost de conifère(CC). Les valeurs numériques correspondent à la capacité d'échange aux protons de chaque fraction granulométrique mesurée par titrage.* _____ *126*
Figure IV–12 *Modélisation de la répartition de la capacité d'échange de protons théorique entre la MO (gris), les argiles (blanc) et les autres composés (résiduel) du sol (noir) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé non amendé (NA) ou amendé en compost de conifère(CC).* _____ *128*
Figure IV–13 *Distribution de la masse de cuivre dans les fractions granulométriques (µg) pour 30 g de sol de Clessé non fractionné pour les sols NA et le sol CC avant (a) et après contamination à 240 ppm (b). Les barres d'erreurs correspondent à la variation entre les réplicats. (x µg de cuivre pour 30g de sol fractionné).* ____ *129*
Figure IV–14 *Concentration en cuivre dans le sol de chaque fraction ($\mu g.g^{-1}_f$) avant (a) et après (b) contamination au laboratoire avec une solution de $CuSO_4$ dans les fractions de tailles granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère. Les incertitudes correspondent à la différence entre les six réplicats.* _____ *130*
Figure IV–15 *Carte de µ-SXRF représentative de la répartition du cuivre (concentration en Cu proportionnelle aux niveaux de gris) dans le sol de Macon Clessé, réalisé par A. MANCEAU.* _____ *130*
Figure IV–16 *Evolution de la concentration en cuivre total dans le sol de chaque fraction ($\mu g.g^{-1}_f$) lié à la matrice du sol au cours de l'incubation (0, 6, et 24mois) dans le sol contrôle (NA) et dans le sol amendé en compost de conifère (CC). Pour ces mesures on ne dispose pas de réplicat.* _____ *131*
Figure IV–17 *Valeurs du ratio de la concentration totale en cuivre sur la teneur en carbone organique total (Cu_{Tot}/COT) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère.* _____ *132*
Figure IV–18 *Valeurs du ratio Cu_{Tot}/ΔHs dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère.* _____ *133*
Figure IV–19 *Distribution de la concentration total en cuivre échangeable ($mg.L^{-1}$) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère avant (a) et après (b) la contamination en cuivre en laboratoire.* _____ *134*

Figure IV–20 *Concentration en cuivre échangeable au calcium (mg.L^{-1}) mesurée (symboles) et calculées (lignes) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère avant (a) et après (b) contamination.* _____ *137*
Figure IV–21 *Distribution de la concentration en cuivre échangeable totale (mg.L^{-1}) dans les fractions granulométrique du sol contrôle et amendé en compost de conifère, sur les 2 ans d'incubation (0, 2, 6, 12, 18, 24 mois), par inter comparaison entre les fractions (colonne de gauche), et suivi temporelle de l'évolution pour chaque fraction granulométrique (colonne de droite).* _____ *140*
Figure IV–22 *Concentration en cuivre échangeable au calcium mesurées (symboles) et calculées (lignes) pour les sols NA (rond) et CC (carré) après 0 (a) et 24 mois (b) d'incubation dans le sol Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère et contaminés en cuivre.* _____ *141*
Figure IV–23 *Concentration en bactéries hétérotrophes cultivable (UFC.g^{-1}_f) totales (B^{Tot}) et résistantes au Cu (B^{Cu}) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère. Les valeurs dans le graphique de la distribution des B^{Cu} représentent le pourcentage de B^{Cu} des B^{Tot}. Les incertitudes correspondent à la variation entre les duplicatas.* _____ *143*
Figure IV–24 *Evolution temporelle du ratio [B^{Cu}] sur [B^{Tot}] dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère, contaminés au cuivre à 240 ppm. Les barres d'erreurs ont été calculées à partir des réplicats.*_____ *145*
Figure IV–25 *Analyse en composantes principales (ACP) des résultats d'empreintes génétiques des communautés bactériennes des fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère dans le sol contrôle (NA) et dans le sol amendé en compost de conifère (CC) dans les fractions granulométriques obtenues par la méthode B-ARISA.*_____ *146*
Figure IV–26 *Evolution temporelle de l'amplitude des modifications des communautés bactériennes (distance euclidienne) entre le sol contaminés et non contaminés au cuivre des les fractions granulométriques et dans le sol non fractionnés des deux sols (NA et CC). L'échelle des ordonnées est une échelle arbitraire.*_____ *149*
Figure V–1 : *Photo (a) et schéma (b) du système de lessivage des sols en colonne, avec de gauche à droite : le collecteur de fraction, la colonne, le réservoir contenant la solution de lessivage et la pompe péristaltique.* _ *157*
Figure V–2 *Evolution temporelle des courbes de lessivage du cuivre total mobile (mg.L^{-1}) au cours de l'incubation dans le sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA), contaminés en cuivre (Cu) ou non (H_2O). NA H_2O, CC H_2O, NA Cu, CC Cu. NC : avant contamination* _____ *164*
Figure V–3 *Exemple de courbes de lessivage (à T0 mois) du cuivre libre [Cu^{2+}] (mg.L-^{1}) dans le sol contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC) non contaminés (H_2O) et contaminés (Cu) au cours de l'incubation.* _____ *166*
Figure V–4 *Evolution temporelle des quantités de cuivre total mobile (Cu_{aq}, symboles pleins) et libre ($Cu^{2+,}$ symboles vides) lessivées par une lame d'eau de 500 mm (soit 7 Vp) dans le sol de Clessé amendé (triangle) ou non (rond) en compost de conifère. Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs analytiques.*_____ *166*
Figure V–5 *Evolution du pH des effluents au cours du lessivage des colonnes de sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en compost de conifères (CC) contaminés (trait pointillé) ou non (trait plein) au cuivre pour chaque temps d'incubation.*_____ *168*
Figure V–6 *Photo d'une série d'échantillons de lessivage en sortie de colonne (a). Evolution de la turbidité (DO 600) des effluents de colonnes de sol de Clessé au cours du lessivage, après 2 ans d'incubation dans les sols NA (triangle) CC (rond) contaminés (vide) ou non (plein) au cuivre (b). Distribution de la taille des colloïdes lessivés mesurée par granulométrie laser (c).*_____ *168*
Figure V–7 *Evolution temporelle des courbes de lessivage du carbone organique total mobile dans les effluents (COT_{aq}) dans les sols amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA) non contaminés (H_2O) et contaminés (Cu) au cuivre au cours des deux années d'incubation.* _____ *170*
Figure V–8 *Courbes de lessivage des bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}) et résistantes au cuivre (B^{Cu}) (UFC.mL^{-1}) dans le sol de Clessé amendé en compost de conifère CC (symboles vides) et ou non NA (symbole plein), contaminé (Cu) en cuivre ou non (H_2O) mesurées à T0 (●), T1 (■), et T24 mois (Δ).* _____ *172*
Figure V–9 *Arbres phylogénétiques des bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}, rouge) et résistantes au cuivre (B^{Cu}, bleu) isolées des effluents de colonnes de sol de Clessé non amendé (NA).* _____ *175*
Figure V–10 *Arbres phylogénétiques des bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}, rouge) et résistantes au cuivre (B^{Cu}, bleu) isolées des effluents de colonnes de sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC).* *176*
Figure V–11 *Comparaison de la turbidité des solutions lessivées, de la concentration en carbone organique [COT_{aq}], et de la concentration en cuivre mobile [Cu_{aq}] des effluents du sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC) après deux ans d'incubation en mésocosmes contaminés au cuivre à 240 ppm.*_____ *177*
Figure V–12 *Modélisation du lessivage de sites réactifs au cuivre associés à la MO dissoute dans le sol de Clessé non amendé (NA) et amendé (CC) en compost de conifère à T0 et T24 mois. La courbe sans symbole représente la courbe de modélisation du COT_{aq} lessivé, pour les deux temps d'incubation.* _____ *179*

Figure V–13 *Modélisation du lessivage du cuivre dans le sol de Clessé non amendé (NA) et amendé (CC) en compost de conifère de T0 à T24 mois. Les courbes sans symbole représentent les courbes de modélisation du Cu lessivé, et les points correspondent aux concentrations en cuivre expérimentales.* _____ *182*
Figure V–14 *Comparaison des courbes modèles de la lixiviation du cuivre entre le sol contrôle NA (pointillé) et le sol amendé CC (plein), pour chaque temps d'incubation.* _____ *183*

Table des tableaux

Tableau I-1 *Teneur moyenne (mg.kg-1) des neufs éléments chimiques majeurs des sols correspondant à la couche de surface d'une épaisseur de 20cm (d'après Sposito (1989)).* *12*
Tableau I-2 *Contenu en cuivre (mg.kg^{-1}) de différentes roches (Kabata-Pendias & Pendias 1992)* *30*
Tableau II-1 *Classification granulométrique de Wentworth (Blott & Pye 2001)* *49*
Tableau II-2 Principales propriétés physiques des sols contrôle et amendé du site de Clessé..... *53*
Tableau II-3 *Principales propriétés chimiques du sol de Clessé variablement amendé ou végétalisé.* *55*
Tableau III-1 *Evolution du pH_w des solutions des sols contrôle (NA) et amendé en en compost de conifère (CC) prélevé annuellement sur la parcelle viticole*..... *81*
Tableau III-2 *Concentration en éléments majeurs (mg.g$^{-1}_{ss}$) dans la matrice du sol contrôle et amendé en compost de conifère.* *83*
Tableau III-3 *Evolution de la concentration en cuivre total (liée à la matrice solide) (mg.kg$^{-1}_{ss}$) in situ pour les sols contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC). La concentration en cuivre représente la concentration moyenne de 4 réplicats pour chaque sous parcelle des deux sols (NA et CC).*..... *86*
Tableau III-4 *Concentrations moyennes en cuivre lié à la matrice solide (mg.kg$^{-1}_{ss}$) dans le sol des mésocosmes de laboratoire incubés après une contamination aiguë (240 ppm) et après chaque contamination chronique (60 ppm) avec une solution de $CuSO_4$.* *86*
Tableau IV-1 *Bilans de masse du fractionnement physique du sol non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC) contaminé ou non en cuivre (240 ppm) à chaque temps de prélèvement (en mois). Fractionnement de 30g de sol sec.* *110*
Tableau IV-2 *Quantification de la concentration de Matière Organique Particulaire (MOP) dans les fractions grossières du sol de Clessé non amendé (NA) et amendé (CC). La concentration en MOP dans le sol est présenté par [MOP] en (m_{MOP})/(m_{ss}) et la concentration en MOP dans les fractions de taille correspondantes est présenté en [MOP_f] en (m_{MOP})/(m_f).* *111*
Tableau IV-3 *Concentrations en éléments majeurs (mg.g$^{-1}_f$) extraits à l'eau régale dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère.*..... *114*
Tableau IV-4 *Récapitulatif de la masse de MOP, la concentration en COT, et la proportion de carbone de la fraction issu des MOP (C_{MOP}/C_f), dans les fractions grossières du sol de Clessé.*..... *118*
Tableau IV-5 Réactivité aux protons (ΔHs) en mmol.g$^{-1}_{ss}$ des fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère...... *122*
Tableau V-1 *Conditions expérimentales et propriétés physiques des colonnes de sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA).*..... *162*
Tableau V-2 *Propriétés chimiques (Conductivité Electrique, concentration en cations majeurs, et Force Ionique) de la solution du sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA). Les mesures ont été effectuées après mise en équilibre de 50 g de sol et de 100 mL d'eau déminéralisée.*..... *163*
Tableau V-3 *Nombre d'espèces bactériennes identifiées dans les solutions de lessivages pour chaque condition de contamination.*..... *174*
Tableau V-4 *Valeurs de la constante de réaction du cuivre avec les sites réactifs immobiles (log_$K_{Ss_hCu}^{+2}$) du milieu poreux pour les sols non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC).*..... *182*

Index

ACP	Analyse en Composante Principale.
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
B^{Tot}	Bactéries hétérotrophe cultivable totale
B^{Cu}	Bactéries hétérotrophe cultivable résistante au cuivre
CC	Sol amendé en matière organique avec du compost de conifère
COD	Carbone Organique Dissous
COT	Carbone Organique Total
COT_{aq}	Carbone Organique Total mobile
Concentration	Quantité de l'élément analysé par gramme de substrat (e.g. $mg_{Cu}.g^{-1}_{ss}$) ou par volume de solution ($mg.L^{-1}$)
Cu	Cuivre
Cu_{aq}	Concentration en cuivre total mobilisable (libre, dissous, et sur les particules mobiles).
Cu_{Bio}	Cuivre biodisponible pour les bactéries après échange au calcium
Cu_{ex}	Cuivre échangeable total avec une solution de $Ca(NO_3)_2$ à 0.14M.
Cu_{Tot}	Cuivre totale lié à la matrice solide
DTP	Distribution de tailles des particules
g	Accélération de la pesanteur
Hf	Sol amendé par enherbement avec de la fétuque
Hs	Protons de surface
Ht	Sol amendé par enherbement avec du trèfle
NA	Sol contrôle, non amendé en matière organique.
M	Concentration molaire en $mol.L^{-1}$
MEB	Microscope électronique à balayage.
MO	Matière Organique
MOD	Matière Organique Dissoute
MOP	Matière Organique Particulaire
m_h	Masse de sol humide
m_s	Masse de sol sec
n	Porosité du milieu poreux
P	Sol amendé en matière organique avec de la paille
PCR	Polymerase Chain Reaction : Réaction de Polymérisation en Chaîne
ppm	Concentration en partie par million (ex :$mg.kg^{-1}$)
q	Flux de Darcy
rpm	Rotations par minute
S_r	Degré de saturation en eau du sol en colonne
T_C	Taux de dégradation du carbone organique total
Teneur	Concentration mesurée multiplié par le pourcentage de la masse de la fraction du sol.

µm	Unité de distance : le micromètre, soit 10^{-6}m
V_T	Volume total de la colonne
V_p	Volume de pores
W	Humidité massique
ΔHs	Réactivité aux protons
ρ_d	Masse volumique apparente du milieux poreux
ρ_s	Masse volumique des particules du sol
µSXRF	Micro Synchrotron-based X-Ray Fluorescence
θ	Teneur en eau volumique du sol

Introduction générale

De nos jours, les ressources en eau et en sol de la planète sont au cœur des préoccupations, et notamment les sols agricoles, qui représentent une grande partie de la surface de la France. Les sols constituent un des principaux compartiments d'accumulation des métaux, et aussi un de leurs points d'entrée dans la chaîne alimentaire. L'étude du devenir et de l'impact des polluants métalliques constitue un champ d'investigation très large et pluridisciplinaire, qui englobe les sols et leurs constituants mais aussi les végétaux et les microorganismes qui s'y développent.

Les sols viticoles sont particulièrement sensibles aux pollutions métalliques, et notamment au cuivre qui est le seul métal encore massivement utilisé de nos jours en tant que fongicide dans les pays industrialisés. De par son histoire, la France est connue pour la grande diversité de ses vins (depuis les années 1800) en relation avec la diversité de son vignoble (Figure Intro-1). Comme pour d'autres types de culture, les sols sous vigne présentent des problèmes spécifiques de pollution liés aux apports d'engrais et de traitement de maladies spécifiques telles que le *mildiou*, qui fait des ravages depuis le début du 20ème siècle. Afin de lutter contre cette maladie, les viticulteurs utilisent classiquement la bouillie bordelaise : un mélange de sulfate de cuivre et de chaux ($CuSO_4$ + $Ca(OH)_2$). Son utilisation pour lutter contre le mildiou a conduit à une importante accumulation de cuivre dans les sols viticoles pouvant aller jusqu'à 1500 mg.kg^{-1}, alors que le fond géochimique en cuivre des sols est plutôt dans la gamme de 5 à 30 mg Cu.kg^{-1} (Besnard et al. 2001; Chaignon 2001). Ces niveaux de contamination à caractère diffus affectent largement la qualité des sols, au point par exemple de rendre impossible l'installation de nouveaux plants de vigne dans les horizons de surface contaminés. En raison de l'importante dégradation de la qualité biogéochimique des sols pollués et du risque de contamination des eaux de surface ou souterraines, il s'avère nécessaire de développer des connaissances afin d'améliorer la prédiction des risques associés à ces pollutions et, plus généralement, de prédire l'évolution de la qualité des sols viticoles contaminés au cuivre.

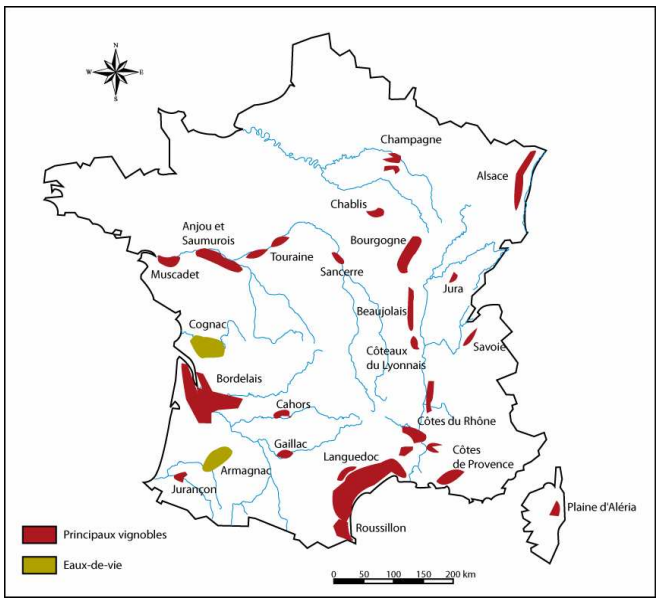


Figure Intro-1 Carte de la répartition des zones viticoles françaises. (*www.cartesfrance.fr/geographie/cartes-france-agricoles/carte-france-vin.html*).

La qualité des sols dépend d'un ensemble de paramètres chimiques et biologiques interdépendants. La toxicité, la spéciation, la mobilité et la biodisponibilité du cuivre, la diversité et les fonctions microbiennes, ainsi que les matières organiques sont des grandeurs intrinsèquement corrélées. Décrire l'impact du cuivre dans le sol implique donc nécessairement l'observation simultanée de ces grandeurs. L'impact du cuivre dépend

sensiblement de sa spéciation à l'état solide et liquide, et du pouvoir de solubilisation des atomes de cuivre complexés, précipités, ou incorporés dans les constituants du sol. Ce pouvoir de solubilisation affecte la fraction libre et donc biodisponible du cuivre (définie comme celle pénétrant à l'intérieur des cellules vivantes). Une fois dans le sol, le cuivre ajouté affecte les communautés microbiennes et fongiques du sol (Kabata-Pendias & Pendias 2001; Lejon et al. 2007, 2008; Ranjard et al. 2008) qui interviennent dans la structuration/décomposition de la matière organique solide et dissoute, aux échelles microscopique (structure moléculaire, nature des groupes fonctionnels organiques) et macroscopique (teneur en MO, réactivité et solubilité des matières organiques, distributions granulométriques des matières particulaires et colloïdales).

Une des caractéristiques des sols sous culture est la perte progressive de leur fertilité, liée à l'augmentation de la production du sol (C, N,….). Pour y remedier, ces sols sont généralement enrichis en matière organique (MO) par des amendements organiques ou par enherbement de surface avec des plantes bénéfiques pour le sol (légumineuses, graminées…). La perte de carbone organique n'induit pas seulement un problème de fertilité des sols mais peut aussi engendrer une perte de leur structuration spatiale (Bronick & Lal 2005). En effet, la structuration des sols est basée sur une organisation en agrégats (Tisdall & Oades 1982), dont l'importance et la stabilité sont fortement contrôlés par la matière organique (Gale et al. 2000; Balabane & Plante 2004; Six et al. 2004; Bronick & Lal 2005; Abiven et al. 2009). En plus de sa forte contribution à la stabilité des sols, la MO peut piéger les ETM ou servir de source de nutriments pour les microorganismes du sol, ce qui lui confère un rôle essentiel dans le fonctionnement biologique des sols et dans leur pouvoir épurateur.

La structuration des sols en agrégats, induit la formation de microenvironnements représentant des micro-habitats spécifiques pour la microflore du sol. Cette organisation spatiale des sols est sans doute un des facteurs clés de la biodiversité qu'ils hébergent, chaque micro-compartiment représentant une micro-fabrique au rôle spécifique dans les cycles biochimiques (e.g. cycles du carbone, de l'azote, du soufre,…). Ainsi, à l'échelle des agrégats, les bactéries ne sont pas localisées au hasard dans le sol, mais plutôt dans les pores ouverts et à l'intérieur des agrégats, de manière protégée des prédateurs et potentiellement plus proches des sources de nutriment (Jocteur Monrozier et al. 1991; Martins et al. 1997; Grundmann 2004). Ces études ont suggéré que cette micro-distribution très spécifique des bactéries leur confère une sensibilité variable aux stress externes dans le sol, mais cela n'a pas encore été clairement démontré faute de moyen technologiques pertinents. Les outils modernes, tels que les biocapteurs, la micro-imagerie ou le séquençage haut débit, ouvrent aujourd'hui des perspectives importantes en termes d'impact localisé ou de micro-biogéographie des sols, c'est-à-dire la possibilité de micro-localiser précisément à l'échelle du micro-habitat, les polluants ou les espèces microbiennes (aux fonctions importantes) sensibles ou résistantes aux toxiques introduits dans les sols. Ces nouvelles potentialités permettent aujourd'hui d'envisager de relier les mesures d'impact global (concentrations, activités, biomasse) aux mécanismes précis de toxicité contrôlés par la probabilité et la cinétique de contact microorganismes - polluant.

En effet, la concentration totale en polluants métalliques tels que le cuivre dans les sols est un bon indicateur de leur toxicité, mais n'est pas suffisante pour informer précisément sur son impact sur les communautés bactériennes du sol, qui sont localisées de manière non aléatoire dans ses différents compartiments fonctionnels. La micro-localisation, la disponibilité et la mobilité du cuivre sont aussi des facteurs importants pour mieux comprendre et prédire les impacts environnementaux de l'apport de fongicides métalliques sur les sols sous culture.

C'est dans ce contexte qu'a été initié ce travail de thèse qui a été développé en lien étroit avec le projet de recherche intitulé : Rôle de la **M**atière **O**rganique et de la **Bi**océnose dans le

devenir d'une **Po**llution chronique et diffuse au **Cu**ivre dans un sol viticole (**MOBiPo-Cu**). Ce projet a fait intervenir cinq laboratoires: LTHE (Grenoble), LGIT (Grenoble), INRA (Versailles), INRA (Dijon, équipe MSE), G2R (Nancy). Ce projet a été financé par le programme national **EC2CO** (**Ec**osphère **Co**ntinentale et **Co**tière). Ce projet se proposait d'étudier le devenir et les effets sur le moyen terme d'une pollution chronique et diffuse que constitue le cuivre sur la biocénose (microflore tellurique) et sur la matière organique des sols (structure moléculaire, granulométrie, distribution et solubilité), des sols sous vigne.

L'objectif principal de cette thèse était de contribuer à l'établissement, de manière qualitative et quantitative, des relations biogéochimiques contrôlant la rétention, l'impact et la mobilité du cuivre dans les sols sous vigne à micro-échelle. L'intégration de ce travail dans le cadre du projet MOBiPo-Cu a permis d'élargir les objectifs de ce travail à l'effet du statut organique du sol modifié par des modes de gestion d'intrants organiques variables et contrôlés sur le long terme : des amendements organiques et des végétalisations (site expérimental de Clessé). Nous souhaitions en particulier mieux comprendre le rôle de la structuration des sols (fortement contrôlée par son statut organique) dans l'impact du cuivre sur les microorganismes, en relation notamment avec leur distribution spatiale dans les différents micro-habitats de ce sol.

Le second objectif de la thèse était d'évaluer le risque de contamination de ressources en eau, c'est-à-dire la mobilité du cuivre dans ces différents contextes de gestion des intrants organiques, en relation avec la spéciation et la micro-localisation du cuivre ainsi que leurs dynamiques spatiale et temporelle.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons développé une approche en mésocosmes de laboratoire (Figure Intro-2) pour étudier le vieillissement sur deux ans d'une contamination au cuivre d'un sol sous vigne variablement amendé en MO ou végétalisé. Dans le cadre du projet MOBiPo-Cu, nous avons eu accès, grâce à Philippe Crozier, de la chambre d'agriculture de Saône et Loire, à un site d'essais agronomiques situé à Clessé en Bourgogne. Sur ce site, un sol sous vigne à reçu pendant plus de 20 ans différents amendements organiques ou végétalisations, conférant au sol des propriétés biogéochimiques variables. Les effets de la matière organique exogène sur la distribution, l'impact et la mobilité du cuivre et leur dynamique temporelle sur deux ans ont été plus particulièrement étudiés dans ce travail.

Ainsi, les questions auxquelles nous souhaitions répondre sont les suivantes :

- Comment se répartissent la matière organique, le cuivre et les communautés bactériennes dans le sol de Clessé à micro-échelle ?
- Comment ces distributions évoluent elles dans le temps ?
- Les différents modes de gestion des intrants organique modifient ils la distribution du cuivre, de la matière organique et des communautés bactériennes dans les sols sous vigne ?
- Quel est l'impact du cuivre sur les communautés bactériennes du sol dans les différents contextes organiques ?
- Existe-t-il une relation entre cet impact et la distribution du cuivre et des microorganismes du sol ?
- Enfin, quel est l'effet du mode de gestion organique du sol sur la mobilité du cuivre ?

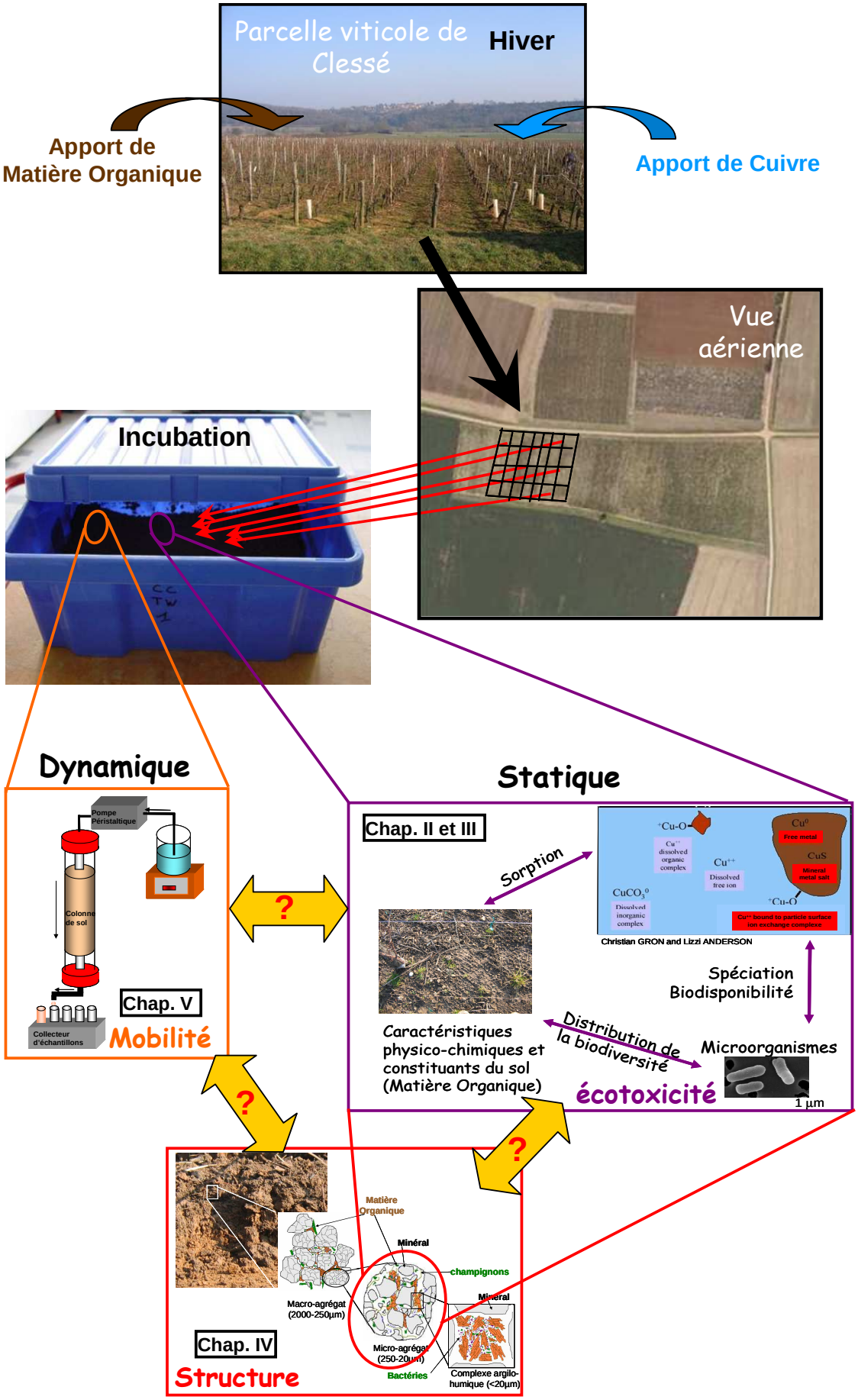


Figure Intro-2 Démarche expérimentale adoptée pour répondre aux objectifs fixés de la thèse.

Pour répondre spécifiquement à ces questions, nous avons développé une approche expérimentale couplant des conditions statiques (mésocosmes de sol incubés pendant 2 ans) et dynamiques (colonnes de sols lessivées à l'eau).

Dans le premier volet, l'objectif consistait à caractériser les interactions entre la MO, le cuivre et les communautés bactériennes à différentes échelles, avec une apporche de fractionnement granulométrique peu déstructurant des sols prélevés dans les mésocosmes sur une période de 2 ans.

Dans un deuxième volet, l'objectif était d'étudier la mobilité du cuivre en colonnes de sols prélevés aux mêmes périodes dans les mésocosmes, afin d'identifier les mécanismes prépondérants impliqués dans son transfert.

La présentation de ces travaux s'articule autour de cinq chapitres.

Le premier chapitre de la thèse est une revue bibliographique portant sur la description des sols naturels structurés, leur contamination par des éléments traces métalliques (ETM) et en particulier le cuivre, ainsi que les principaux mécanismes d'interaction et d'impact du cuivre sur les microorganismes des sols.

Le deuxième chapitre présente nos résultats sur les effets *in situ* de cinq différents modes de gestion organique des sols sous vigne (amendements et enherbements). Ces résultats ont montré un important effet du compostage du sol sur ses propriétés biogéochimiques. Ce mode de gestion organique a donc été retenu pour le reste de l'étude en comparaison avec une situation témoin sans amendement organique.

Le troisième chapitre de cette thèse présente les résultats de l'étude en mésocosmes des sols incubés en conditions contrôlées pendant 2 ans, sur la rétention et l'impact d'une contamination cuprique dans le sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA) en compost de conifère.

Dans le quatrième chapitre, nous avons étudié ces mêmes processus à l'échelle des micro-agrégats des 2 sols (NA et CC), obtenus par une méthode de séparation physique peu déstructurante (fractionnement granulométrique) permettant de séparer les sous compartimens granulométriques du sol.

Enfin, dans le dernier chapitre de cette thèse, sont présentés les résultats concernant l'effet du mode de gestion organique du sol de Clessé sur le potentiel de mobilité du cuivre en relation avec les propriétés biogéochimiques du sol de Clessé établies dans les chapitres précédents.

Chapitre I Etat de l'art

I-1 Le sol

En pédologie, le sol est défini comme la partie de la croûte terrestre où la géologie et la biologie se rencontrent. C'est un milieu vivant, sur un support organique et minéral solide. Le sol est une ressource naturelle essentielle, utilisée dans plusieurs secteurs d'activité tels que l'industrie, l'agriculture et l'urbanisme. Pour les géologues, le sol est la partie superficielle de la roche mère altérée par les conditions climatiques, biologiques et anthropiques. Pour les agriculteurs, le sol est simplement un milieu riche qui permet la récolte de nombreux produits végétaux.

I-1-1 L'utilisation des sols.

Une grande partie de la superficie totale des sols européens est couverte avec de la forêt (40 %). Les sols cultivés représentent seulement environ 25 % de la superficie totale européenne, les prairies comptent pour 20 %, et pour finir les zones bâties et non bâties (bâtiments et serres, chantiers, parkings et cimetières, routes et voies ferrées) représentent 15 % (dont 10 % pour les zones à des fins résidentielles, commerciales et industrielles). En France, l'utilisation des sols est répartie en trois grandes classes : 12 % pour les zones bâties, 23 % pour la sylviculture et 54 % pour les sols agricoles.

La viticulture se répartie sur l'ensemble du territoire. Les zones viticoles sont principalement situées dans la vallée de la Loire, dans la région du Bordelais, et du Rhône, mais aussi dans le nord est de la France et en Corse (Figure Intro-1). Chacune de ces régions produisent des vins dont les différences proviennent des propriétés des sols (terroirs) mais aussi du cépage et des conditions climatiques.

I-1-2 Les constituants du sol

Le sol est un milieu continu dont les dimensions et la géométrie sont propres à sa localisation. C'est un milieu poreux tri phasique complexe, intégrant une phase solide (les particules solides) de nature variable, une phase aqueuse, et une phase gazeuse.

I-1-2-1 La phase gazeuse

La phase gazeuse d'un sol est constituée par les mêmes composants que ceux de l'air atmosphérique. Cependant à cause de l'activité biologique présente à l'intérieur des sols, les teneurs en chacun des composants peuvent changer considérablement (Calvet 2003). La composition de cette phase dépend aussi de la profondeur et du temps de renouvellement de l'air à l'intérieur du sol. Un exemple d'évaluation du mouvement des gaz dans les sols concerne l'estimation du transport de composés organiques volatiles sur des sites contaminés.

A la surface du sol essentiellement, l'oxygène et le dioxyde de carbone ont un rôle important. En effet, la concentration en oxygène maintient les conditions d'aérobie ou d'anaérobie du sol, impliquées dans les conditions de survie des micro-organismes. L'aération des sols est très importante pour la croissance des racines des végétaux. Le dioxyde de carbone influence l'acidité du sol par sa transformation chimique sous forme de carbonate en réaction avec la phase liquide du sol. La composition de cette phase gazeuse du sol peut contrôler fortement la distribution et l'activité des communautés bactériennes des sols.

I-1-2-2 La phase aqueuse

La phase liquide du sol est principalement constituée par l'eau de pluie, dans laquelle sont dissous les ions minéraux et les molécules organiques, qui font varier sa composition et sa vitesse de transfert d'un sol à l'autre. La composition de l'eau du sol dépend du milieu géologique avec lequel elle interagit chimiquement. Du point de vue de la réactivité chimique et biologique, le pH de l'eau du sol constitue une propriété majeure qui met en jeu l'ensemble des réactions biologiques et chimiques qui se déroulent dans le sol. La composition chimique de la phase aqueuse est régulée par des processus chimiques à l'interface roche-eau et atmosphère-eau, ainsi que par des processus biologiques tels que la photosynthèse ou la respiration. Les processus de dissolution des roches contrôlent la présence du Ca et du Mg qui proviennent des carbonates, mais aussi du Na et du K provenant des feldspaths et des micas ou des anions HCO_3^- et NO_3^- (Sigg et al. 2001). Ces différentes réactions permettent la libération de nutriments et oligo-éléments, essentiels aux microorganismes du sol.

I-1-2-3 La phase solide

La phase solide est la phase prépondérante du sol et représente 50 à 70 % du volume. Elle est formée de trois types de constituants : les composés inorganiques (90 % du volume total), organiques et biotiques (tels que la faune, la flore et les microorganismes).

I-1-2-3-1 Les composés inorganiques

Les constituants de la fraction minérale du sol sont issus de la dégradation physique (altération mécanique) et chimique de la roche mère. Ils forment 'l'architecture' du sol. Les constituants inorganiques peuvent être décrits de trois manières différentes selon leurs propriétés. En effet, on peut étudier la composition élémentaire (avec la teneur en ces éléments chimiques), la minéralogie du sol (avec la nature et la teneur en minéraux) et la composition granulométrique (avec les proportions et les dimensions des particules) (Calvet 2003).

a) La composition élémentaire

Au niveau de la planète, les teneurs moyennes de l'ensemble des sols pour les neuf principaux éléments chimiques (O, Si, Al, Fe, Ca, K, Na, Mg et Ti) sont quasiment toutes identiques (Tableau I-1) quelque soit leur localisation (Sposito 1989). Cependant ces moyennes restent peu précises à cause de la grande diversité des roches sur terre impliquant une aussi grande variabilité des sols. Les deux éléments les plus abondants sont l'oxygène et la silice et les trois métaux principaux sont l'aluminium, le fer et le calcium. Les autres éléments sont moins concentrés. Les sols possèdent donc une grande diversité chimique, mais ils ne sont pas fortement enrichis en carbone et azote, sauf dans le cas des sols tourbeux.

Tableau I-1 Teneur moyenne (mg.kg-1) des neufs éléments chimiques majeurs des sols correspondant à la couche de surface d'une épaisseur de 20cm (d'après Sposito (1989)).

Eléments	**O**	**Si**	**Al**	**Fe**	**Ca**	**K**	**Na**	**Mg**	**Ti**
Teneur ($mg.kg^{-1}$)	490000	310000	72000	26000	24000	15000	12000	9000	2900

b) La composition minéralogique

En termes de minéralogie, les constituants inorganiques majeurs des sols sont les minéraux primaires constitutifs de la roche mère (i.e. quartz, feldspaths,…), mais aussi les minéraux secondaires issus de l'altération des minéraux primaires et de la précipitation d'éléments dissous. Cependant, la minéralogie est à l'origine de la réactivité spécifique des sols. Les argiles et les oxydes et hydroxydes métalliques notamment ont les plus grandes réactivités par rapport aux autres compartiments du sol (quartz, feldspaths,…).

Les argiles minéralogiques sont des phyllosilicates d'aluminium empilés sous forme de feuillets composés de couches tétraédriques de silice et octaédrique d'hydroxydes métalliques. Ces différentes couches sont séparées par des espaces interfoliaires, où l'eau peut circuler (Robert 1996). Par exemple dans le cas des argiles gonflantes, l'eau pénètre dans ces espaces interfoliaires. Elles sont constituées de couches d'octaèdre « O » ($Al(OH)_6$) et de couches de tétraèdre « T » (SiO_4) reliées par les atomes de O et OH mis en commun.

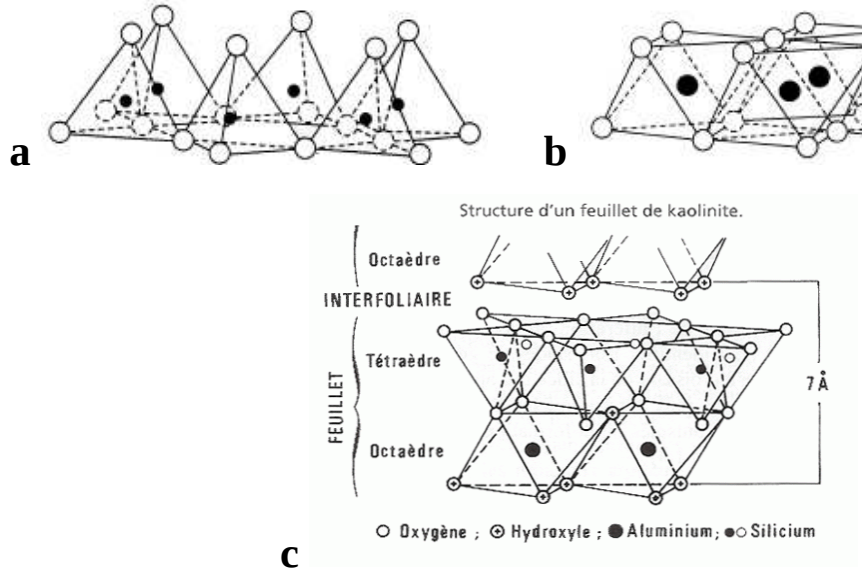


Figure I–1 Exemple de réseau de couche tétraèdre (a) et d'octaèdre (b) formant les argiles (Hillel 1998), et l'exemple de la structure d'un feuillet de kaolinite (T/O) (c).

D'après la structure du feuillet, on peut distinguer les argiles T/O (tel que la kaolinite $Al_2Si_2O_5(OH)_4$) et les argiles 2T/O (telle que l'illite : $K_{1\text{-}1.5}Al_4(Si,Al)_8O_{20}(OH)_4$). Leur forme et leur surface spécifique, leur capacité d'adsorption de l'eau ainsi que leur capacité d'échange cationique sont les propriétés principales qui permettent de caractériser ces argiles. Grâce à leur petite taille, elles possèdent une grande surface spécifique qui peut varier entre 15 et 800 $m^2.g^{-1}$ (Hillel 1998) et se structurent en interagissant avec les cations présents dans la solution. A l'échelle moléculaire, la structure des feuillets d'argile est dominée par les forces électrostatiques de Van der Waals. En effet, les feuillets sont globalement chargés négativement (Sposito 1989). La réactivité des argiles est mesurée par leur capacité d'échange cationique, et varie entre 2 et 200 $cmolc.kg^{-1}$ (Alloway 1995). Ces différentes propriétés leur procurent de fortes capacités de rétention des cations solubles et notamment des éléments trace métalliques (ETM).

Les oxydes et hydroxydes métalliques (Fe, Al et Mn) sont des constituants importants dans la réactivité des sols. Ce sont des assemblages plus ou moins complexes entre les éléments métalliques et des groupements hydroxyles (OH). Ces minéraux de petite taille, dispersés dans le sol ont tendance à recouvrir d'autres particules plus grandes. Ces constituants interagissent avec les ions H^+ et OH^- du sol, leur réactivité aux cations et anions est par conséquent très dépendante du pH du sol. A pH acide, les groupements OH se

protonent ce qui attire les anions. Au contraire, à pH basique, les groupements OH ont tendance à se déprotoner, attirant ainsi les cations.

c) La composition granulométrique

La composition granulométrique du sol permet de caractériser la texture du sol. Elle représente la répartition des minéraux par catégories de taille, indépendamment de leur nature et de leur composition, au contraire de la structure, laquelle présente l'organisation spatiale des particules du sol et son rôle dans le fonctionnement du sol qui sera traité dans le paragraphe I-1-3. Il existe plusieurs tables de classification granulométrique des particules composant les sols. La caractérisation du sol par la composition granulométrique est l'une des descriptions la plus utilisée (Hillel 1998). Les composés inorganiques sont répertoriés au dans minimum trois classes distinctes, suivant leur taille : les sables, les limons et les argiles (Figure I–3). Les sables ont une taille entre 2000 et 50 µm, les limons entre 50-2 µm et les argiles sont <2 µm (Figure I–2). Cependant selon les échelles granulométriques de classification (SCCS[1], USDA[2] et Gradistat[3]) utilisées, la séparation de taille des particules pour les classes intermédiaires entre ces grandes classes peut varier légèrement. Dans la majorité des études sur les sols, ceux-ci sont tamisés à 2 ou 4 mm. Les particules de tailles comprises entre 2 et 4 mm sont nommées des graviers dans les classifications granulométriques.

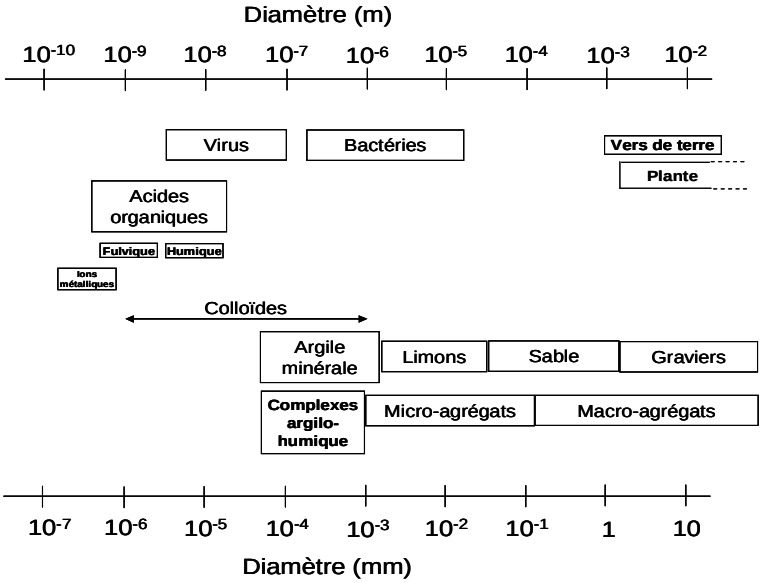


Figure I–2 Taille relative de quelques matériaux et particules.

Dans notre étude nous nous focaliserons sur la classification granulométrique de Gradistat, qui possède une distinction entre les limons et les sables à 63 µm qui est une adaptation de la classification de Wentworth (Blott & Pye 2001). Cette classification est issue d'une modélisation de la distribution de taille des particules.

[1] SCCS : Système canadien de classification des sols (1987)

[2] USDA United States Department of Agriculture (Schoeneberger 2003)

[3] Gradistat : Adaptation de la classification de Wentworth (Blott & Pye 2001)

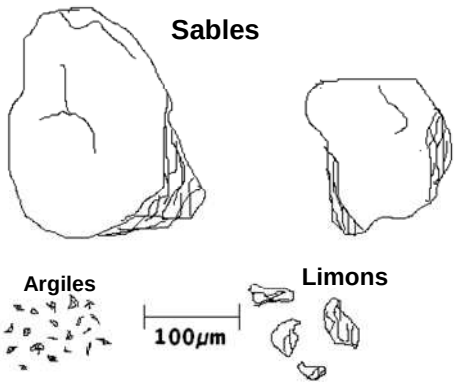


Figure I–3 Représentation schématique des particules de sable, de limon et d'argiles.

I-1-2-3-2 Les composés organiques

Les sols représentent un pool majeur dans le cycle du carbone et contiennent $172x10^{10}$t de carbone. Ils constituent l'habitat des organismes photosynthétiques terrestres.

a) La matière organique (MO) du sol

La matière organique (MO) des sols est constituée de l'ensemble des composés contenant du carbone qui ont été formés par les organismes vivants. La MO du sol constitue un compartiment très hétérogène du sol en perpétuel renouvellement. On défini le turnover de la MO comme le temps de dégradation totale d'un composé organique dans un sol. Le turnover de la MO est influencé par les apports annuels au sol, il est en moyenne de 30 à 40 ans. La MO représente la plus grande réserve de carbone de la surface de la terre, toutefois elle ne représente que quelques pourcents de la masse totale du sol et environ 2 % de son volume. La matière organique est essentiellement constituée de carbone, sa composition moyenne est de 50 % de carbone, 40 % d'oxygène, 5 % d'hydrogène, 4 % d'azote et 1 % de soufre. Les constituants organiques interviennent particulièrement dans le fonctionnement du sol, car la MO représente la réserve essentielle de nutriments (N et P) pour les organismes du sol (Stevenson 1994), et participe aussi à l'aération du sol, soutenant ainsi les organismes hétérotrophes et les processus biogéochimiques associés. De plus, les propriétés du sol telles que leur contenu en argile, en eau mais aussi la diversité des communautés bactériennes sont des facteurs importants régulant la minéralisation de la MO.

La nature et la fonctionnalité de la MO dépendent fortement de son origine et son état de dégradation dans le sol (Bonneau 1979; Andreux et al. 1980). On peut dissocier la MO des sols en trois classes principales (Figure I–4) : la composante vivante (microorganismes, petits vertébrés, racines,…), la matière organique particulaire (MOP) très peu dégradée, et la matière organique dissoute (MOD) fortement dégradée (Figure I–4). Les constituants non vivants représentent environ 85 % de la MO. Dans les sols agricoles, la majorité de la matière organique que l'on trouve dans le sol provient des apports de végétaux (résidus de récoltes), des engrais verts enfouis dans le sol, feuilles et branches mortes, excrément, mais aussi d'organismes morts sur ou dans le sol (animaux extérieurs et animaux du sol, comme les vers de terre). Si certaines des molécules organiques du sol sont héritées directement des débris organiques, la plupart sont synthétisées dans le sol, à la suite de processus physiques, chimiques et biochimiques complexes (par dégradation bactérienne) qui constituent l'humification de la MO (Chenu & Bruand 1998). Néanmoins, la proportion des différentes formes de matière organique dépend généralement de l'activité biologique du sol. La matière organique joue donc un rôle prépondérant dans les propriétés du sol, et le fonctionnement des écosystèmes.

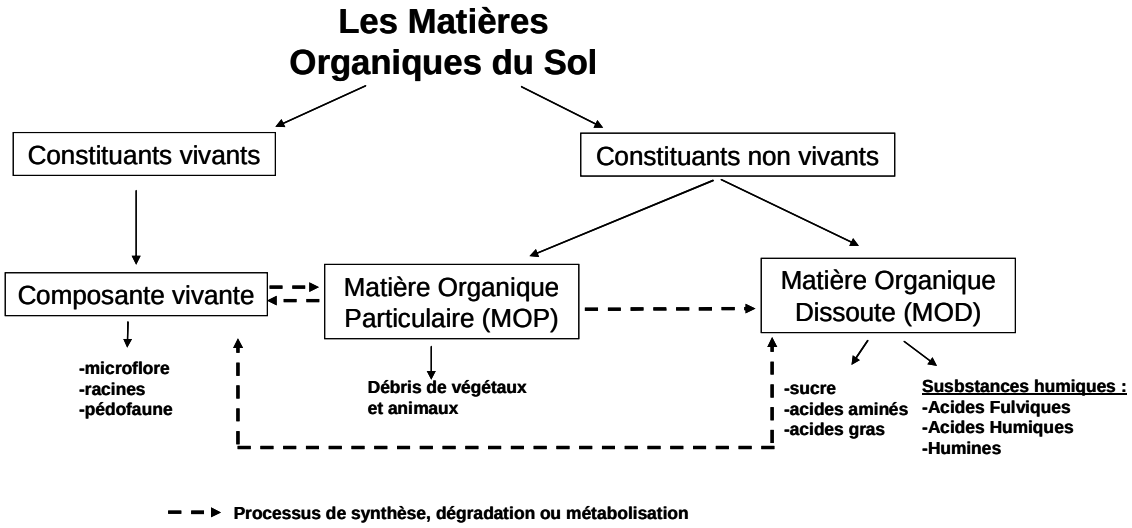


Figure I–4 Les constituants de la matière organiques des sols adaptés de Calvet (2003) et Sebastia (2007)

La matière organique des sols influence les propriétés des sols. Pour cela elle intervient au niveau des propriétés physiques, chimiques et biologiques. Les fonctions physiques de la MO interviennent dans la stabilisation des agrégats du sol, via la rétention en eau, ainsi que les propriétés thermiques du sol. Les principales fonctions chimiques de la MOS sont sa forte contribution à la capacité d'échange cationique (Stevenson 1994), son rôle de tampon dans le pH du sol, et la complexation des cations inorganiques. La fonction biochimique la plus fondamentale de la MO est l'approvisionnement de l'énergie métabolique, laquelle contrôle les processus biologiques. Le matériel organique est aussi utilisé pour la conversion des macronutriments (N, P, et S) à l'intérieur des structures organiques en une forme inorganique, lesquels sont soit immobilisés soit utilisés pour la synthèse de nouveaux tissus à l'intérieur d'organismes du sol ou minéralisés et relâchés à l'intérieur du pool de nutriments minéraux du sol. L'azote du sol est présent à plus de 95 % dans la phase organique du sol. Celui-ci se divise sous plusieurs formes (azote insoluble, acides aminés, ammonium, ammoniaque), dont les proportions évoluent dans le temps avec son cycle bien connu faisant intervenir les bactéries du sol.

Au cours de la décomposition de ces composés, la MO est transformée et évolue graduellement, devenant plus ou moins rapidement non reconnaissable. La MO se dégrade en plusieurs phases (http://www.soilhealth.com/organic/#one) qui correspondent chacune à des compartiments spécifiques de la matière organique :

- Décomposition des composés facilement dégradables, tels que les sucres, l'amidon et les protéines. Le temps de dégradation de ces éléments est court (quelques jours). Dans ce compartiment, le carbone et l'énergie de ces composés sont facilement disponibles aux organismes vivants du sol. La plupart des microorganismes du sol sont capable de les décomposer.
- Décomposition des composés plus récalcitrants, tels que la cellulose et la lignine, qui peut prendre quelques années. Ces composés sont plus difficiles à dégrader car ils possèdent des chaînes moléculaires plus longues et portent des fonctions plus difficiles à dégrader.
- Décomposition des composés qui ont été formés par des combinaisons stables et localisées à l'intérieur des agrégats de sol, tels que les phénols. Le temps de dégradation de ceux-ci est en moyenne de l'ordre de la décennie.

- Décomposition des substances humiques, lesquelles résultent de la transformation des composés organiques par les microorganismes, dont le temps de dégradation peut aller de la décennie à des milliers d'années.

Dans un milieu biologique actif, la décomposition de la matière organique se conduit par la formation d'humine, d'acides humiques (AH) et d'acides fulviques (AF), constituant ce que l'on appelle les substances humiques. Dans le cadre de la matière organique morte, les substances humiques représentent un pool majeur de la rétention du carbone dans les sols. Les substances humiques s'ionisent en fonction du pH et sont généralement négativement chargées aux pH environnementaux. Cette charge négative provient de la dissociation des protons des groupes carboxyliques (R-COOH ; 4<pH<6) et phénoliques (R-OH ; 9<pH<11), majoritaires, ainsi que des groupes sulfurés (R-SO_3H ; pH<2) et sulfhyfryles (R-SH ; pH<7), minoritaires (Aiken 1985). Ces équilibres de dissociation peuvent être représentés avec l'équation suivante :

$$R-OH \Leftrightarrow R-O^- + H^+ \qquad \textbf{[I-1]}$$

Les amines font exception à la règle puisqu'elles sont neutres à pH ambiant, et positivement chargées à pH basique (N-H ; 8.5 < pH < 12.5). Toutefois, ce groupe minoritaire ne peut en aucun cas inverser la charge négative de la MO qui est principalement déterminée par les charges négatives des groupes carboxyles et phénols. Néanmoins, l'estimation de la quantité de sites réactifs organiques dans les sols reste très difficile.

La respiration microbienne liée à la dégradation de la MO récalcitrante génère des quantités importantes de glucose et d'autres composés facilement dégradables, permettant ainsi le recyclage de la MO récalcitrante. Ces molécules, issues de l'humification, sont réutilisées comme nutriments par les plantes, définissant ainsi le recyclage, i.e. le 'turnover' de la MO réfractaire. L'incorporation de MO dans les sols peut modifier l'équilibre fragile qui existe généralement entre la synthèse et la dégradation de la MO (Lugato et al. 2010). Cette interférence affecte la biologie, la physique et la chimie du sol. Ainsi, l'incorporation de la MO peut impacter l'agrégation du sol, les propriétés hydriques et le transfert de nutriments, donc l'activité biologique et le nombre d'organisme actif, c'est à dire l'ensemble de la chaîne de processus biogéochimique du sol (Sumner 2000).

b) La composante vivante du sol

Le sol est un milieu vivant. Cette composante vivante est particulièrement diversifiée en taille et en espèce. La taille des organismes vivants du sol s'étend de moins de 0.1 µm avec les virus, jusqu'à la dizaine de cm pour les vers de terre en passant par les bactéries de taille ~1 µm et l'étendue importante en taille des insectes présents dans les sols (Figure I–2). A cela s'ajoutent les végétaux, qui agissent sur le sol via la croissance des racines et le prélèvement de l'eau et des nutriments en solution. Tous ces organismes interviennent dans les processus biogéochimiques conditionnant et définissant le sol. Les organismes vivants de taille >5 mm ont un rôle spécifique dans la mesure où ils brassent le sol et aèrent ainsi activement le sol.

L'ensemble des êtres vivants sur Terre peut être classé en deux groupes qui sont les procaryotes et les eucaryotes. La principale différence réside dans la présence dans les cellules d'un noyau cellulaire délimité ou non par une membrane contenant l'ensemble du matériel génétique. Le groupe des procaryotes est lui-même subdivisé en deux sous-groupes, les bactéries et les archæbactéries (Woese & Fox 1977). Dans la suite de cette étude nous nous intéresserons principalement aux bactéries du sol. Les communautés bactériennes sont importantes dans les sols à cause de leur rôle clé dans les processus des écosystèmes, tels que

la décomposition de la MO, les cycles biogéochimiques du C et de la N, ainsi que leurs symbioses possibles avec les plantes (Nannipieri et al. 2003).

Les bactéries sont omniprésentes dans l'ensemble des écosystèmes, à des concentrations très variables, où elles jouent un rôle très important dans les cycles biochimiques (e.g. cycles du C, N, S, …). Dans les sols, les bactéries représentent le groupe biologique le plus important métaboliquement mais aussi en concentration (10^6 à 10^{10} cellules par gramme de sol sec) et en biomasse (40-60 % de la biomasse des sols). Les bactéries ont une taille comprises entre 10^{-5} et 10^{-7} mètres (Figure I–2) et leur forme peut être classée en 3 grandes catégories : sphérique (ou coccoïdes), cylindrique (ou bâtonnets), et spiralée (ou hélicoïdales). Leur structure cellulaire (Figure I–5) peut être décrite en deux unités de base : i) la cellule est constituée d'un cytoplasme dans lequel se situe l'ensemble des fonctions vitales, et où l'on trouve l'ensemble du matériel génétique, ainsi que les enzymes ; ii) le cytoplasme est entouré d'une membrane cytoplasmique composée de deux feuillets lipidiques. Les bactéries possèdent une paroi qui leur permet de garder la stabilité de la structure de la cellule et qui correspond à l'enveloppe externe. Il existe deux types de structures de parois bactériennes : les parois à « Gram positif », lesquelles sont relativement épaisses et composées de peptidoglycane, d'acide teichoïque et de muréïne ; les parois des bactéries à « Gram négatif » sont composées de deux membranes encadrant un espace péri-plasmique, dans lequel peut avoir lieu des réactions métaboliques. Une troisième unité de base existe pour les bactéries mobiles qui possèdent un ou plusieurs flagelles ou des pilis leur permettant de se déplacer.

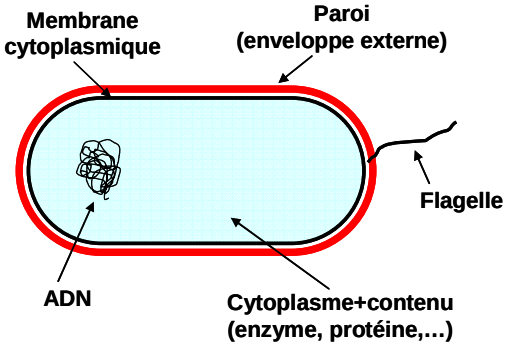


Figure I–5 Schéma d'une cellule bactérienne

Les bactéries se multiplient par division cellulaire, ce qui permet de les considérer comme des clones naturels. Cette division cellulaire permet la transmission de l'ensemble du code génétique de la cellule mère à la cellule fille. La croissance des bactéries dans un milieu se fait de manière exponentielle après une phase de latence, jusqu'à un plateau. Les taux de croissance vont dépendre des conditions physico-chimiques du milieu dans lequel les bactéries sont présentes et en particulier de la disponibilité des nutriments. La plupart des bactéries se multiplie dans des conditions modérées (Lemaitre 1998), mais leur croissance et leur diversité sont très variables et peuvent être modifiées par divers paramètres chimiques (concentration en métaux, oxygène, pH) ou physique (température, salinité, pression hydrostatique,…). Une méthode devenue classique pour représenter la diversité des communautés bactériennes est la mesure d'un indice de diversité déterminé à partir de l'empreinte génétique des communautés obtenues par la méthode moléculaire ARISA (Automated Ribosomal (rRNA) Intergenic Spacer Analysis) (Fisher & Triplett 1999; Ranjard et al. 2000). Bien qu'imparfaite, car ne considérant que les populations les plus représentées dans le sol cette approche permet de relier l'empreinte génétique mesurée à la structure des communautés bactériennes.

Le volet bactériologique sera abordé tout du long de cet état de l'art pour comprendre le rôle du compartiment procaryotique dans le fonctionnement du sol, mais aussi les interactions des métaux avec ces organismes.

I-1-3 Organisation spatiale des sols en agrégats

I-1-3-1 Naissance du concept de hiérarchisation des sols en agrégats.

Depuis le 20ème siècle, il est reconnu qu'il existe des liens étroits entre l'activité biotique des sols, l'évolution de la matière organique du sol et leur agrégation. Depuis les années 1950, quatre concepts d'agrégation des sols ont été proposés. Edwards & Bremner (1967) ont proposé une théorie selon laquelle le principal processus amenant à la micro-agrégation des constituants des sols est la réaction en phase solide entre les argiles minérales, les cations polyvalents et la matière organique des sols. En 1982, Tisdall and Oades se sont basés sur ce principe, pour mettre en place le concept de la hiérarchisation des sols en agrégats, décrivant une dépendance des mécanismes impliqués dans la formation des micro et macro-agrégats en fonction de l'échelle spatiale. Ce concept met en avant la présence d'agents de liaison entre les particules primaires (argiles, minéraux simples,…) et les petits agrégats issue de l'agrégation des particules fines. Deux ans plus tard, Oades (1984) a proposé une modification importante dans ce concept qui est la formation des micro-agrégats localisés à l'intérieur des macro-agrégats. Pour finir, Elliott (1986) a identifié pour la première fois le lien direct entre la perte de matière organique et la diminution de l'agrégation.

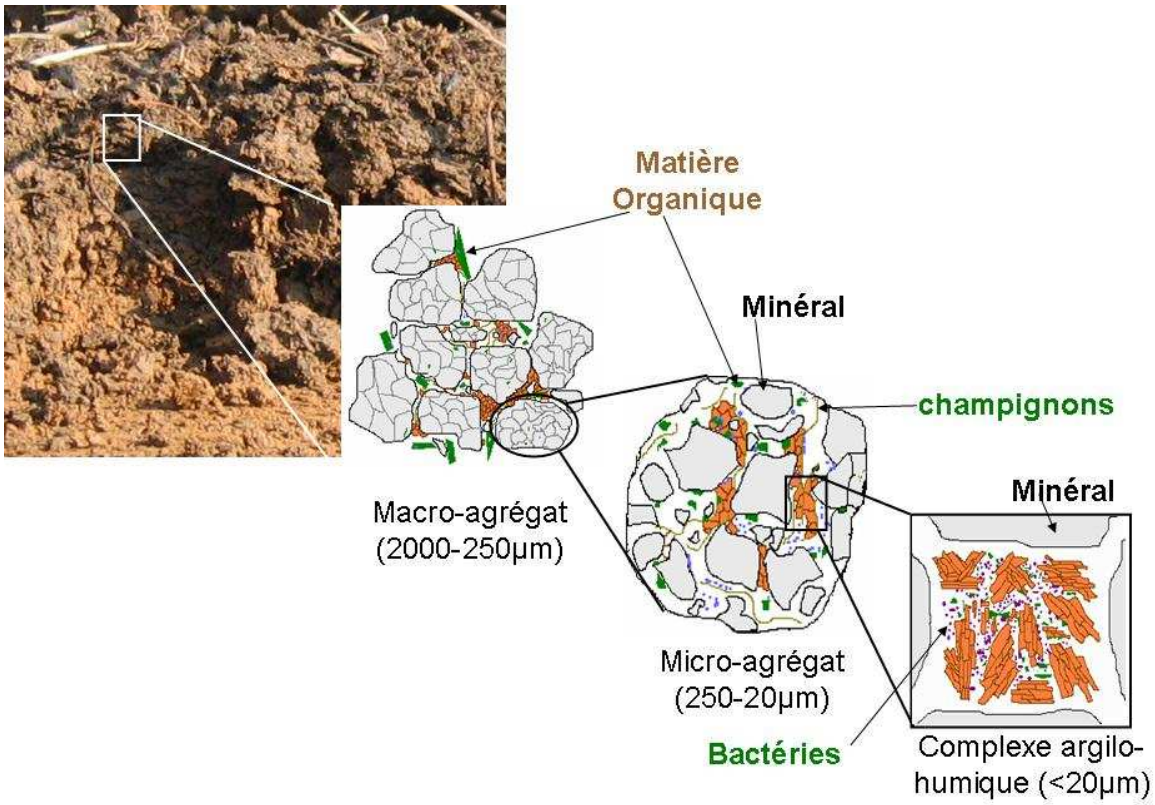


Figure I–6 Schéma de la hiérarchisation en agrégats des sols naturels

Aujourd'hui les études sur le fonctionnement, l'agrégation des sols et la stabilisation de la matière organique des sols sont basés sur ce concept d'organisation spatiale du sol (Figure I–6). Ce concept met en avant la présence d'agents de liaison entre les particules primaires et les agrégats correspondant aux particules secondaires, issues de l'agrégation des particules fines (Bronick & Lal 2005). De plus, la stabilité des agrégats dans l'eau est négativement corrélée à leur taille et positivement corrélée avec leur contenu en matière organique (Haynes & Swift 1990). John et al. (2005) définissent aussi que cette organisation en agrégats, est plus importante en surface qu'en profondeur des sols, et pour les sols anthropiques, dépendant des paramètres biogéochimiques et de la gestion des sols.

I-1-3-2 Les facteurs influençant la stabilité des agrégats de sols.

L'agrégation des sols et leur stabilité reposent sur un ensemble de facteurs physiques, chimiques et biologiques plus ou moins important. La stabilité des agrégats de sol a été décrite comme étant principalement dépendante de cinq facteurs différents : la faune, les microorganismes, les racines, les agents inorganiques de liaisons, mais aussi les variables environnementales (Figure I–7). Tous ces facteurs sont liés les uns aux autres plus ou moins fortement (Six et al. 2004).

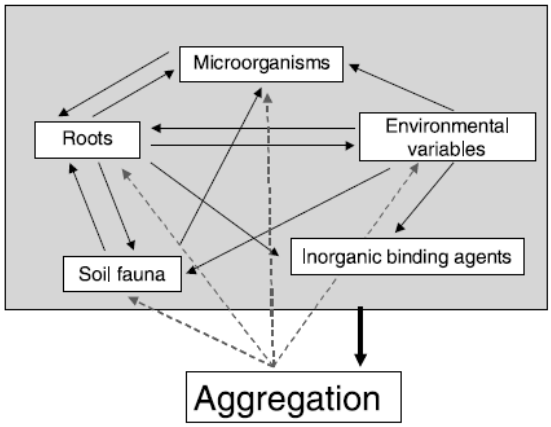


Figure I–7 Schéma des différentes interactions entre les constituants du sol intervenant dans l'agrégation des sols (Six et al. 2004).

I-1-3-2-1 La matière organique des sols

Le comportement bio-physicochimique de la MO influence fortement la stabilité des agrégats de sols. Dans les sols, la MO peut influencer la hiérarchie de l'agrégation de deux manières : i) une augmentation de la concentration en C induit une augmentation de la classe de taille des agrégats, et ii) un fort contenu en MO nouvellement apporté (carbone frais) facilement dégradable est plus présent dans les macro agrégats que dans les micro agrégats (Six et al. 2004). Il existe ainsi des agents chimiques de liaison dont l'efficacité dépend de leur dimension. Les composés stabilisants (organiques et inorganiques) de petite taille permettent alors la stabilisation des micro-agrégats. A l'opposé, les racines et autres composés de plus grandes tailles sont considérés comme des agents de liaison entre des particules séparées par des longues distances ou par des pores. C'est pourquoi, pour étudier le rôle de la MO dans l'agrégation des sols, il faut bien tenir compte que les sols sont composés d'agrégats et de particules de taille similaire.

La MO des sols se distribue dans les agrégats de toutes tailles (Figure I–8), à des stades de dégradation très différents, allant du débris végétal dans les macro-agrégats aux macromolécules organiques des complexes argilo-humiques. Ainsi, la MO dégradée, présente sous forme de macromolécules de type acides humiques ou fulviques, peut être associée aux fractions fines des sols. Cette matière organique associée aux argiles est considérée comme très évoluée et stable dans le temps (de l'ordre de la décennie) (Andreux et al. 1980; Balabane & Plante 2004). Elle s'organise sous forme de complexes organo-minéraux riches en Ca, Mn, Fe et P (Turchenek & Oades 1979). En effet, Chenu & Plante (2006) ont montré par une dispersion complète du sol que les complexes organo-minéraux sont formés par la liaison entre la MO évoluée (fraction humiques) et les minéraux primaires.

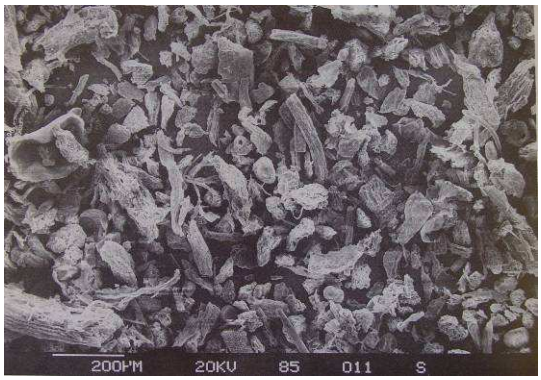


Figure I–8 Photo d'observation en microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM Scanning Electronic Microscopy) de différentes tailles de fragments organiques dans des agrégats de diamètres 90-250 µm (Oades 1993).

Christensen (2001) a définit alors trois niveaux d'organisation structurale des sols en lien avec les différentes MO. D'abord les micro-agrégats (<20 µm) où les principaux agents de stabilisation sont les produits microbiens, les exsudats racinaires, les cations polyvalents et d'autres agents de liaison persistants (polymères organiques), qui sont les plus stables dans le temps. Il définit ensuite les agrégats intermédiaires (20-250 µm) qui sont constitués de micro-agrégats et de MO libre et occluse, dont la stabilisation est due à des agents de liaison de transition tels que les polysaccharides. Enfin les macro-agrégats constitués à la fois d'agrégats intermédiaires et de MO (libre et occluse) et dont les agents de liaisons sont temporaires (racines et hyphes). Pour maintenir la structure du sol il existe différents niveaux de liaison.

La MO des sols joue un rôle important dans la formation des micro-agrégats (Gale et al. 2000), par son rôle de liant. L'utilisation du carbone par les microorganismes pour former des composés organiques liant les particules du sol entre elles dépend de la labilité de la MO, c'est-à-dire sa capacité à se dégrader. L'amendement d'un sol avec une MO fraîche et peu dégradée, constituée principalement de MOP conduira ainsi à un sol plus structuré qu'un sol non amendé contenant de la MO plus ancienne, y compris a une teneur équivalente en MO. La diminution de la taille de la MO sous l'effet de la biodégradation par les microorganismes permet l'incorporation du carbone dans des agrégats de taille de plus en plus petite jusqu'à la minéralisation totale de cette MO (Andreux et al. 1980; Tisdall & Oades 1982). De plus, l'augmentation du stock de carbone favorise le processus d'agrégation conduisant à la formation d'agrégats de taille de plus en plus grande (Oorts et al. 2007). La qualité et la quantité de carbone dans les sols jouent donc un rôle varié mais prépondérant dans la hiérarchisation des sols en agrégats. De ce fait, les cultures du sol affectant les teneurs ou la distribution de la MO ont une incidence directe sur le potentiel d'agrégation des sols John et al. (2005). Ainsi, les cultures menées sur le long terme peuvent conduire à l'altération de l'agrégation des sols ainsi qu'à la perte de la MO. La matière organique joue donc un rôle primordial dans le maintient de la structure en agrégats des sols (Balabane & Plante 2004), en

améliorant leur stabilité structurale et leur résistance aux stress extrêmes (hydrique, mécanique, …).

I-1-3-2-2 Les organismes vivants

Les organismes vivant dans les sols impactent clairement la stabilité des agrégats. Ils sont répertoriés en trois catégories : la faune, la flore (spécifiquement les racines), et les microorganismes (bactéries).

Pour la faune, de nombreuses études sur l'impact des vers de terre (Marinissen & Dexter 1990; Brown et al. 2000; Bossuyt et al. 2005, 2006) sur la formation et la stabilisation des agrégats, ont été menées avec différentes espèces modèles. Il a ainsi été montré que les vers de terre jouent un rôle direct et rapide sur la formation des micro-agrégats ainsi que sur l'incorporation de carbone frais à l'intérieur de ces micro-agrégats. L'impact direct ou indirect des vers de terre sur l'agrégation varie avec l'espèce de vers de terre, la qualité de la litière et du sol parent (Bronick & Lal 2005).

La flore stabilise le sol de deux façons différentes : d'un côté les résidus de plantes, riches en carbone, produisent sous l'effet de la biodégradation microbienne des composés humiques très réactifs qui stabilisent les agrégats des sols, et d'un autre côté les racines jouent aussi un rôle important dans la stabilisation du sol par l'étendue de leur réseau qui s'infiltre dans le sol et dans les agrégats (Dorioz et al. 1993; Angers & Caron 1998). En se développant, les racines sont capables d'exercer des pressions importantes qui vont compresser les agrégats et les séparer les uns des autres (Figure I–9). De plus les exsudats organiques libérés par les racines ainsi que les fines racines favorisent l'activité biologique impliquée dans la formation d'un ciment humique impliqué dans l'agrégation des constituants des sols (Hillel 1998). La pénétration des racines dans le sol est alors un bon indicateur de la stabilité des agrégats selon leur taille.

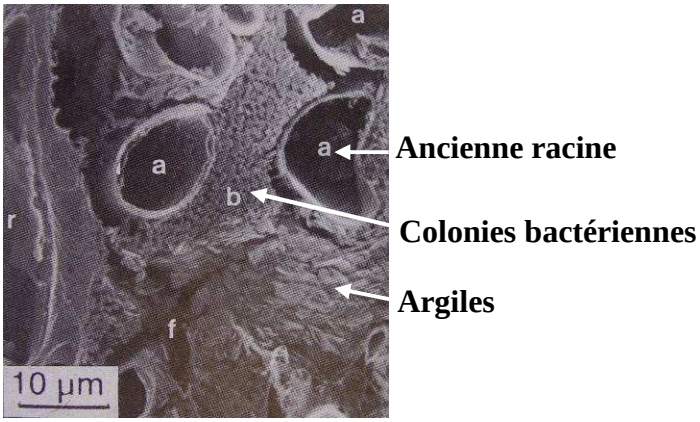


Figure I–9 Photo en microscopie électronique à balayage (MEB) de microstructures induit par les racines de *Festuce rubra* (Dorioz et al. 1993). a=racine, b=colonies bactériennes, f=fissure

A plus fine échelle les micro-organismes jouent également un rôle important dans la stabilité des agrégats. Leur stabilité dépend de plusieurs facteurs en lien avec l'échelle d'étude tels que la concentration en champignons et bactéries, la texture du sol, ou sa minéralogie. Par exemple, la formation de mycélium fongique facilite l'accumulation de MO (Jastrow 1996) et ces effets sur l'agrégation se sont révélés plus important dans les sols argileux que dans les sols sableux. Les champignons souvent localisés dans les macros pores sont plus sensibles à la dessiccation du sol que les bactéries, plutôt localisées dans les micro-agrégats. C'est pourquoi le mycélium fongique va affecter de manière directe préférentiellement les liens entre les macro-agrégats (Denef et al. 2001a).

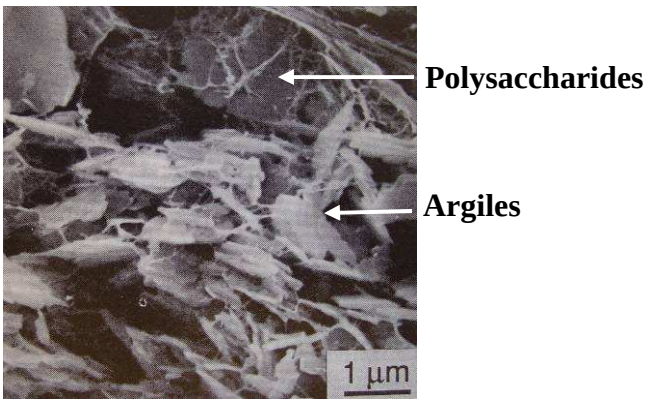


Figure I–10 Photo d'observation en microscopie électronique à balayage (MEB) de microstructure de l'association des polysaccharides avec les argiles de type kaolinite (Chenu 1993)

Le développement du mycélium fongique et les polysaccharides qu'ils libèrent améliorent la micro-agrégation (Chenu 1989, 1993) (Figure I–10). Les fractions fines sont enrichies en matières organiques évoluées et en nutriments, ce qui permet une augmentation de la biomasse bactérienne laquelle influence aussi l'agrégation du sol (Sessitsch et al. 2001). Réciproquement, les bactéries des sols peuvent trouver refuge à l'intérieur des micro-agrégats, ce qui influence la diversité microbienne et l'activité bactérienne (Hattori, 1988). L'activité des populations microbiennes joue ainsi un rôle notable dans l'agrégation (Six et al. 2004). Dans les sols à texture grossière (sols sableux) l'agrégation n'est que faiblement reliée à la biomasse microbienne ainsi qu'à leurs produits (i.e. sucres, biofilm), car seul les réseaux d'hyphes sont capables de lier les grosses particules sableuses pour former des agrégats stables. Au contraire, dans les sols argileux, des changements dans le contexte environnemental local (texture, physico-chimie,…) peuvent amener à une réorganisation des complexes argilo-humiques et de leur relation avec les microorganismes (Young & Crawford 2004; Bronick & Lal 2005; Milleret et al. 2009).

I-1-3-2-3 Les cycles humectations/dessiccations

Les sols sont soumis continuellement à des cycles d'humectations et de dessiccations au fil des saisons. Ces alternances d'humidité affectent surtout les macro-agrégats qui s'agrègent et se désagrègent en fonction des cycles, tandis que les micro-agrégats sont relativement peu affectés du fait de leur plus grande stabilité. (Denef et al. 2001a) ont exposé que dès deux cycles d'humectation dessiccation (H/D), l'ensemble des agrégats des sols testés devient plus stable et plus résistant à la dispersion aqueuse. La même étude a montré que les cycles H/D modifient fortement la teneur en MO dans les agrégats, ce qui diminue fortement et sensiblement le potentiel d'agrégation du sol. Cosentino et al. (2006) ont observé qu'en présence d'amendements organiques, un enrichissement en polysaccharides bactériens et en substances hydrophobes augmentent la cohésion interne des agrégats ainsi que leur hydrophobie, amenant à une meilleure résistance des agrégats aux cours des cycles H/D. Les macro-agrégats réagissent fortement à un apport d'eau, ce qui montre qu'ils possèdent des forces de cohésion faible, ces dernières dépendant toutefois de la présence de 'liants' organiques de type macromoléculaires (exopolysaccharides, acides humiques etc.). Au contraire, les micro-agrégats, a priori plus abondamment associé aux mêmes types de liants organiques très réactifs sont eux plus stables. Ceci a été notamment confirmé en microscopie électronique par Vollandtuduri (2004), qui permet d'observer que les micro-agrégats se déforment seulement légèrement lors de l'application de condition de dessiccation du sol, contrairement aux macro-agrégats.

On mentionnera comme dernière variable, les variations annuelles de température. Elles interviennent dans la formation et la dissociation des agrégats qui sont intimement liés à la teneur en eau du sol. Ainsi il a été observé que les cristaux de glace formés dans la porosité des sols conduisent à des forces dispersives importantes provoquant l'éclatement des agrégats (Six et al. 2004). De façon générale, les cycles climatiques annuels affectent fortement à la stabilisation des agrégats.

I-1-3-2-4 Les agents inorganiques

Les minéraux des sols affectent la stabilité des agrégats principalement par deux voies : soit en offrant des surfaces de contacts aux liants organiques, soit en générant des liants inorganiques. La formation des liants dépend de la nature des minéraux et des conditions chimiques. Il est communément admis que les phases minérales réactives du sol (oxydes de Fe et Mn, Argiles, Calcaire) présents en quantité significatives forment un substrat de sorption pour les liants macromoléculaire organiques par interaction des groupes polaires, apolaires et chargés (Six et al. 2004). Concernant les oxydes de Fer, de par leur surface chargée positivement, ils forment des liaisons électrostatiques privilégiées avec les argiles augmentant ainsi l'effet cohésif (El-Swaify & Emerson 1975). Dans des conditions chimiques appropriées (oxydation de solutions riches en Fe(II) par exemple), des précipités émanant de la dissolution d'oxydes peuvent se former et s'intercaler entre les particules associées générant ainsi un lien autant mécanique (accrochement) que chimique (Fordham & Norrish 1983). Des ions Ca^{2+} mis en solution par dissolution de la calcite ou d'autres ions peuvent par ailleurs intervenir dans la formation de complexes organo-minéraux par exemple par le pontage de groupes fonctionnels négativement chargés.

Les contaminants métalliques ont aussi été décrits comme pouvant interagir dans la stabilisation des sols. Ainsi, Parat et al. (2002) ont par exemple montré qu'un fort contenu en cuivre (200-300 $mg.kg^{-1}$) dans les sols inhibe la décomposition des débris organiques et donc la minéralisation du carbone organique, ce qui entraîne une stabilisation des macro-agrégats. De façon générale, les fortes concentrations en métaux inhibent la croissance et la diversité des populations microbiennes. Ainsi, Ranjard & Richaume (2001) ont montré que l'impact du cuivre sur les communautés microbiennes est variable aux différentes échelles du sol. Les populations bactériennes situées à l'extérieur des agrégats sont plus rapidement affectées que celles situées à l'intérieur des agrégats lesquelles sont plus protégées en terme d'accès du polluant.

La composition du sol et sa stabilité dans le temps sont donc conditionnés par les processus biogéochimiques qui s'y déroulent. Ces processus sont contrôlés à la fois par les conditions climatiques et anthropiques imposés, par la composition du sol et en particulier par la nature et la distribution de la MO. Toutefois, malgré les connaissances importantes sur le rôle de la MO, un nombre important de questions demeure, notamment en relation avec l'effet de l'apport exogène varié en relation avec la gestion de la fertilité des sols, où la maîtrise des mauvaises herbes. De plus, la complexité de ces effets multiples rend difficile la prédiction du devenir et de l'impact de contaminations telles que celles liées aux traitements phytosanitaires comme par exemple le cuivre.

I-1-4 Le compartiment bactérien des sols.

I-1-4-1 Distribution des bactéries dans les sols.

Le sol est souvent considéré comme une mosaïque de microhabitats pour les communautés bactériennes (Jocteur Monrozier et al. 1993), et dont la structure est fortement influencée par les propriétés physicochimiques du sol. La diversité des communautés bactériennes dans les sols est très importante puisqu'on estime près de 10000 génomes bactériens (de taille de génome similaire à celui d'*Escherichia coli*) présents dans un gramme de sol (Horner-Devine et al. 2004). Les avancées rapides dans les techniques d'analyse des bactéries permettent d'envisager depuis quelques années de caractériser la localisation physique des bactéries, et d'essayer de mieux comprendre leur distribution spatiale en relation avec les habitats spatialement hétérogènes (Nunan et al. 2002; Young & Crawford 2004). A l'échelle du champ, la distribution des micro-organismes rencontrés dans les sols est spatialement structurée sur des distances allant de la dizaine à plusieurs centaines de mètres, suivant les organismes mais aussi le système étudié (Ettema & Wardle 2002). Bien que la biodiversité bactérienne soit assez limitée à l'échelle régionale, les populations bactériennes présentent une forte diversité à l'échelle locale de l'agrégat de sol (Green et al. 2004). Bien que peu nombreuses, les études sur la distribution spatiale des bactéries dans les sols ont montré que les espèces bactériennes dominantes sont toujours différentes à l'intérieur des micro-agrégats par rapport au sol dans son ensemble ou au niveau des macro-agrégats, montrant ainsi que des espèces minoritaires peuvent avoir un comportement spécifique à leur environnement local (Jocteur Monrozier et al. 1993; Ranjard & Richaume 2001; Dechesne et al. 2005).

La détermination de la densité bactérienne par des quantifications directes (Kabir et al. 1994; Chenu et al. 2001; Nunan et al. 2002) ou indirectes (Richaume et al. 1993) ou d'analyse de la biomasse bactérienne (Martins et al. 1997) montre clairement une distribution hétérogène des bactéries dans les sols. Cette hétérogénéité spatiale ne favorise pas seulement la diversité microbienne dans les microhabitats mais elle permet aussi la séparation physique d'organismes du sol potentiellement compétiteur entre eux ou ayant une relation de prédation (Ettema & Wardle 2002). Depuis la mise en évidence de la hiérarchisation des sols en agrégats présentant des fonctions spécifiques et la mise en place d'une procédure fiable de fractionnement physique non déstructurant des sols en agrégats, l'ensemble des études confirme les résultats précurseurs de Hattori (1988), qui a le premier présenté les populations bactériennes comme majoritairement localisées dans le compartiment interne du sol (contenant les plus petits pores) plutôt que dans la partie externe du sol (les larges pores mais aussi la surface des agrégats) plus sujette à des stress de toutes sortes (hydrique, thermique, chimique et même biologique avec la prédation).

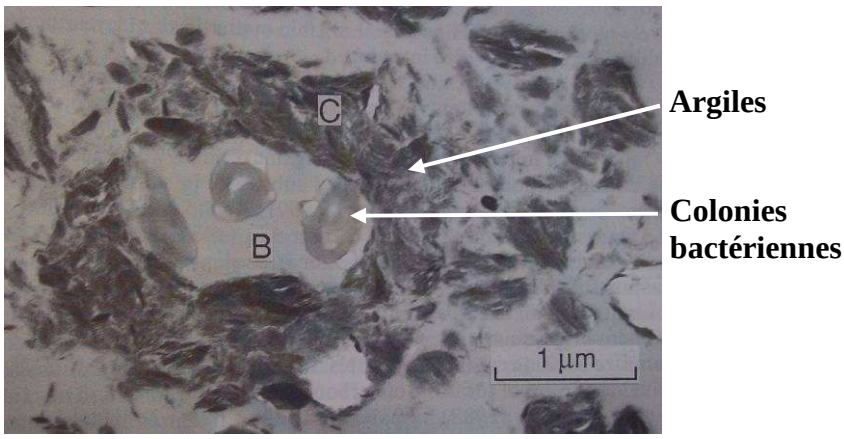


Figure I–11 Photo par microscopie électronique à transmission de micro-agrégat contenant des bactéries enfermées dans une structure argileuse (Ladd et al. 1993).

Ainsi, il est reconnu aujourd'hui que plus de 80 % des bactéries se situent dans la fraction interne des sols qui contient des diamètres de pores de taille entre 2 et 6 µm (Hattori 1988). En effet, les habitats les plus favorables à la vie bactérienne sont les micro-agrégats (e.g. Figure I–11) de taille <20 µm (Jocteur Monrozier et al. 1991, 1993; Kabir et al. 1994; Ranjard et al. 1997; Kandeler et al. 2000; Sessitsch et al. 2001; Ranjard & Richaume 2001; Chotte et al. 2002; Fall et al. 2004; Mummey & Stahl 2004; Mummey et al. 2006; Zhang et al. 2007; Janusauskaite et al. 2009; Ruamps et al. 2011). Cette plus faible densité cellulaire du compartiment externe des sols est également associé à une plus faible diversité des communautés bactériennes en relation avec la présence importante de champignons entre les agrégats du sol et particulièrement sur les surfaces des agrégats (Chenu et al. 2001; Zhang et al. 2007). Par ailleurs, la faible taille des pores des fractions fines génère des microhabitats protecteurs pour les microorganismes face aux pollutions mais aussi aux prédateurs. On peut alors constater une similitude entre la taille des bactéries et celle des micropores où elles se multiplient (Grundmann 2004). Kilbertus (1980) avait déjà montré que les bactéries, qui sont de taille micrométrique assez uniforme, ne colonisent pas les pores de taille inférieure à 0.8 µm, bien qu'elles peuvent être présentes sous forme de cellules isolées. Malgré l'ubiquité des bactéries dans toute la structure spatiale des sols, seul un faible pourcentage de leur espace poral est colonisé par les bactéries, et ne représente qu'environ 0.6 % de la surface terrestre (Young & Crawford 2004). Tisdall & Oades (1982) ont défini que les microorganismes sont importants dans les processus d'agrégation des constituants des sols à une échelle comprise entre 2 et 2000 µm. Les bactéries ne sont donc pas localisées au hasard dans le sol, mais la plupart du temps dans les pores ouverts et à l'intérieur des agrégats probablement proches des sources de nourriture (Grundmann 2004). Dans les sols structurés, les communautés bactériennes résidant à la surface des agrégats de sols contaminés en ETM sont plus résistantes au stress provoqué par la présence du métal que celles localisées à l'intérieur des agrégats, suggérant une évolution et une adaptation différentielles des communautés suivant leur localisation (Ranjard et al. 1997; Almås et al. 2005).

Les microenvironnements telluriques réunissent tout à fait les conditions nécessaires à la survie et au développement des communautés bactériennes, et ceux-ci sont considérés comme des microhabitats privilégiés pour ces organismes. La localisation spatiale des populations bactériennes est donc un facteur clé affectant aussi bien leur survie, leur activité et leurs fonctions écologiques (Mummey & Stahl 2004) majeurs que leur sensibilité à des stress bio physicochimique. Ce dernier point est un des aspects que nous avons particulièrement étudié dans ce travail (Chapitre IV).

I-1-4-2 Facteurs contrôlant la distribution des populations bactériennes dans les sols

La variabilité des caractéristiques physico-chimiques des différentes fractions granulométriques des sols confère à ces compartiments des propriétés spécifiques qui en font des habitats privilégiés et hétérogènes pour les bactéries (Jocteur Monrozier et al. 1991, 1993; Ranjard & Richaume 2001). La définition des facteurs formant un micro habitat propice à la vie bactérienne dépend à la fois des paramètres du sol mais aussi des populations bactériennes elles-mêmes. Un paramètre non négligeable influençant la distribution des populations bactériennes dans les sols est leur relation trophique au sein des microenvironnements, qui dépend-elle même des autres facteurs. Beaucoup de travaux se sont intéressés aux techniques de mesure de la biodiversité mais assez peu ont concernés les liens entre cette biodiversité et la nature de ces microhabitats.

Les sols sont composés d'un ensemble d'organismes vivants de tailles extrêmement variables. Comme dans l'ensemble de la chaîne alimentaire, les populations bactériennes sont sous le contrôle de prédateurs qui leur sont spécifiques. Leurs principaux prédateurs ont une taille supérieure à la taille des micro-agrégats dans lesquels les bactéries sont majoritairement localisées. Cette microfaune prédatrice étant principalement présente dans les plus grands agrégats, cela induit une pression sélective sur la structure des communautés bactériennes dans la macroporosité via notamment leur protection dans les micro-agrégats de sols (Sessitsch et al. 2001).

Dans ce contexte, la texture des sols est un facteur important pour la distribution des bactéries dans les sols, car elle influence directement leur structure spatiale. Ainsi, Chenu et al. (2001) ont observé directement que dans les sols sableux les bactéries sont présentes aussi bien à la surface qu'à l'intérieur des agrégats de sols sableux, alors que dans les sols argileux, la majorité des populations est distribuée à l'intérieur des agrégats. La structure du sol est donc un facteur majeur du contrôle de la distribution des bactéries, en relation également avec la répartition des nutriments essentiels à leur développement.

L'évolution de la dynamique de l'eau et des gaz dans la porosité des sols, influence aussi la distribution des organismes vivants (Jocteur Monrozier et al. 1993; Ranjard & Richaume 2001). Les fortes variations de la teneur en eau dans le sol liées aux cycles d'humectation et de dessiccation (liée à la météorologie) impliquent une adaptation particulière des populations bactériennes localisées principalement dans la macroporosité des sols et notamment entre les agrégats (ce que l'on considère comme le compartiment externe des sols). La rétention et potentiellement l'immobilisation de l'eau sont plus importantes dans les micropores que dans les macropores, permettant de garder une humidité plus importante dans les micro agrégats, en relation avec la présence de composés organiques hydrophiles tel que les polysaccharides produit par les bactéries ou les champignons (Chenu 1989, 1993; Jocteur Monrozier et al. 1993).

Pour les gaz, il a été observé un effet inverse sur les populations microbiennes. L'air à l'intérieur des micropores étant moins souvent renouvelé, cela peut conduire à un état anoxique du sol en relation avec la respiration du sol et à la présence de bactéries majoritairement anaérobies dans les structures solides fines, alors que les compartiments grossiers contiennent un mélange de bactéries aérobies et anaérobies. Le faible renouvellement des gaz peut dans certains cas protéger les bactéries des gaz toxiques (Ranjard & Richaume 2001).

Un autre facteur important pour la distribution des communautés bactériennes dans les sols est la teneur en carbone organique. En effet, la MO agit comme une source énergétique

pour les microorganismes, en plus d'être largement impliquée dans la stabilisation des agrégats de sol. Dans les sols bien agrégés on peut retrouver plus de 50 % de la matière organique dans les micros agrégats (Ladd et al. 1993; Virto et al. 2008). L'amendement d'un sol en MO affecte l'activité, la taille mais aussi la composition des communautés bactériennes (Saison et al. 2006). En effet, il semble exister une corrélation positive entre le carbone de la biomasse et la concentration en carbone organique des sols (Kunito et al. 1999a). Des apports exogènes de MO dans les sols, sous forme d'amendement on t un effet direct sur l'agrégation des sols (Besnard et al. 2001), et indirectement sur la distribution des microorganismes.

Les populations bactériennes présentes dans la macroporosité des sols sont sujettes à de fortes variations des conditions hydriques et gazeuses (O_2), alors que les conditions stables de l'intérieur des agrégats les plus petits contribuent au plus faible renouvellement des nutriments et des gaz. Toutefois, dans les fractions grossières des sols les nutriments disponibles sont plus limités car plus facilement lessivés au passage d'un flux d'eau, ce qui montre que les bactéries de ces fractions doivent s'adaptées à des conditions d'oligotrophie (Ettema & Wardle 2002) en développant un plus large éventail métabolique (Sessitsch et al. 2001), leur permettant notamment de dégrader des grandes molécules organiques. Ces fractions sont riches en *α-proteobacterie*, et notamment en *Sphingomonas*, bactéries capable de dégrader de nombreux composés aromatiques (Sessitsch et al. 2001) de la MO 'fraîche' ou évoluée. Les fractions granulométriques plus fines sont colonisées par les bactéries de la division des *Acidobacterium*. Certains changements environnementaux favorables à l'augmentation locale de l'activité microbienne des sols pourraient résulter dans la réorganisation des complexes sol-microbes (Young & Crawford 2004). L'évolution des propriétés physicochimiques de ces micro-habitats spécifiques peut influencer les communautés bactériennes (Baptist et al. 2008; Shahnavaz 2009; Tarfa 2011)

L'ensemble des ces facteurs contrôle les processus intrinsèques aux populations microbiennes tels que la localisation, la reproduction ou la compétition qui influencent l'agrégation des sols (Ettema & Wardle 2002) et la distribution des populations bactériennes.

Outre ces effets globaux, de nombreuses études indiquent clairement qu'un des facteurs limitant de la biodiversité et indirectement de la distribution des communautés bactériennes dans les sols est l'impact des pollutions métalliques ou organiques sur ces microorganismes. Cet aspect est détaillé ci-dessous.

I-2 Les contaminations métalliques des sols : cas du cuivre

I-2-1 Présentation générale

Le cuivre est un des rares métaux qui existe à l'état natif dans le sol. C'est pourquoi il est utilisé par l'homme depuis très longtemps, comme l'or et l'argent. Des objets fabriqués en cuivre ont été datés d'environ 8700 avant J.C. Le mot cuivre vient du latin *cuprum* signifiant « l'île de Chypre », qui était réputé pour ses mines de cuivre. Le cuivre est caractérisé par une structure cristalline cubique à faces centrées, une masse atomique de 63.546 $g.mol^{-1}$, et une température de fusion de 1084.62°C. Sa couleur rouge métallisée permet de le différencier des autres métaux. Dans les minerais de cuivre, celui-ci se trouve sous forme pure mais aussi principalement sous la forme de sulfures tels que les minerais de Chalcopyrite ($CuFeS_2$) et Bornite (Cu_5FeS_4). En 2010 les réserves mondiales de cuivre étaient estimées à 630 millions de tonnes, avec une production d'extraction de 16.2 millions de tonnes, essentiellement en Amérique du sud.

Le cuivre a été fortement utilisé par différentes civilisations pour sa grande capacité d'alliage avec l'étain, par exemple dans la formation du bronze (5 %Sn et 95 % Cu) mais aussi avec le Zinc pour former le laiton (30 %Zn et 70 %Cu). De plus ses grandes capacités anticorrosives, lui procurent une utilisation importante dans le domaine de l'industrie. Ce sont aussi ces propriétés anticorrosives qui lui permettent d'être utilisé dans toute l'industrie du bâtiment. Grâce à ses propriétés physiques, et particulièrement de sa conductibilité électrique et thermique, il est très largement utilisé dans le développement de l'électricité au début du $20^{ème}$ siècle. Avec ces différentes caractéristiques, le cuivre couvre tout l'éventail des activités industrielles allant des pièces traditionnelles à des systèmes de hautes technologies. Toutefois en contact avec l'air, le métal s'oxyde pour donner une patine verdâtre, appelée vert de gris, extrêmement toxique.

Dans cette étude, le cuivre n'est pas étudié pour ses propriétés physiques mais pour ses propriétés biologiques et écotoxiques. Il serait restrictif de définir le cuivre uniquement comme élément en trace métallique toxique. Le cuivre est un élément présent dans la croûte terrestre mais aussi chez tous les êtres vivants, car il est essentiel à de nombreux processus vitaux. Par exemple, il a été calculé qu'un européen utilisera environ 680kg de cuivre au cours de sa vie. En effet, à de très faibles doses, le cuivre est un oligo-élément indispensable à la vie, par son action sur le renforcement du métabolisme des êtres vivants et en particulier celui des protéines de plante ou d'animaux. Toutefois son ingestion chronique peut être fatale à des doses peu élevées. La propriété de fongicide du cuivre n'est qu'en partie attribuée à la destruction des spores de champignon qu'il provoque. Une autre partie de cet effet est due à son action sur le renforcement du métabolisme des protéines des cellules vivantes.

I-2-2 Origines des métaux en traces dans les sols.

Dans le langage courant, les termes 'pollution' et 'contamination' sont employés indifféremment pour désigner une accumulation anormale d'éléments minéraux, organiques ou pathogènes dans un milieu donné. Dans le domaine des sciences de l'environnement, le terme 'contamination' désigne l'accroissement notable de la concentration d'un composé (apporté par l'homme) au sol sans anticiper de modification de la qualité du sol (Juste et al.

1995). Au contraire, le terme 'pollution' lui est employé pour désigner l'accumulation d'un composé dans des quantités telle que l'élément peut engendrer des dangers pour les organismes vivants ou compromettre une ou plusieurs des grandes fonctions du sol.

I-2-2-1 Origine naturelle

La concentration en éléments traces métalliques (ETM) mesurée dans les sols résulte de l'héritage des concentrations engendrées par l'altération de la roche mère (fond géochimique local), plus ou moins modifiée par des processus de pédogenèse (fond pédogéochimique). Ce fond est réhaussé par les apports des activités humaines. Le fond pédogéochimique naturel local correspond donc à la concentration des éléments traces métalliques issues de l'évolution géologique et pédologique du sol sans tenir compte des apports anthropiques (Baize 1997).

En ce qui concerne plus spécifiquement le cuivre, objet de notre étude, il est présent dans la croûte terrestre, mais ne représente que 0.01 % des éléments présents dans la terre. Il est aussi présent dans les océans mais à l'état de traces. Les teneurs en cuivre de la croûte continentale sont listées dans le Tableau I-2. La concentration moyenne est de 35 mg kg^{-1}, avec une variation entre 2 et 120 mg kg^{-1} selon les différentes roches (Kabata-Pendias & Pendias 1992; Alloway 1995; Baize 1997; Sumner 2000), en revanche les teneurs dans les plantes sont comprises entre 2 et 20 mg kg^{-1} de matière sèche. Dans un sol dépourvu de contamination anthropique le fond pédo-géochimique est dépendant des caractéristiques physico-chimiques de la roche mère.

Tableau I-2 Contenu en cuivre ($mg.kg^{-1}$) de différentes roches (Kabata-Pendias & Pendias 1992)

	Roches magmatiques			**Roches sédimentaires**		
	Basiques	**Intermédiaires**	**Acides**	**Argilo-sableuses**	**Grès**	**Carbonate**
Cu ($mg.kg^{-1}$)	60-120	15-80	10-30	40	5-30	2-10

I-2-2-2 Origine anthropique

L'inquiétude sur les pollutions des sols par l'anthropisation est née de la forte augmentation des contaminations liées au développement agro-industriel de notre société. Ce développement a induit le relargage important de composés minéraux et notamment les éléments en trace, la plupart du temps présents sous forme immobile, vers les écosystèmes, sans qu'ils soient éliminés par les processus de biodégradation et d'épuration (Bourrelier et al. 1998). Les sources de pollutions liées aux activités anthropiques sont diverses, allant de la pulvérisation sous forme de pesticide dans l'agriculture, à l'extraction minière, et au dépôt atmosphérique sur le sol, sans être exhaustif.

L'homme utilise depuis longtemps le cuivre, pour différentes activités qui ont évolué en même temps que ses connaissances. Les extractions minières des éléments chimiques, quelles qu'elles soient, engagent une succession de réactions chimiques qui peuvent conduire à des pollutions. Dans le cas du cuivre, celui-ci est présent dans les minerais sous forme de sulfures (e.g. la chalcopyrite ($CuFe_2S$), la bornite (Cu_5FeS_4)), et sous forme d'oxyde (e.g. cuprite (Cu_2O), malachite ($Cu_2(CO_3)$), azurite ($Cu_3(CO_3)_2(OH)_2$)). Lors de son excavation, des sous produits tels que le dioxyde de soufre sont relargués et transformés en acide sulfurique. La

transformation engage donc une succession de réactions chimiques qui peuvent fortement polluer le sol localement en cuivre et en acide.

La contribution anthropique aux teneurs en cuivre dans les sols agricoles est d'origine diverse. Les apports sont principalement liés à des ajouts locaux effectués par l'agriculteur, voir liés à des apports aériens diffus involontaires provenant de parcelles voisines ou plus lointaines. Sauf exception, il s'agit d'apports de fongicides en viticulture et arboriculture. Ils peuvent également provenir d'apports de dégradation des végétaux contaminés par l'activité humaine, et ces apports peuvent se faire directement par l'agriculteur, ou indirectement par l'activité éolienne ou par ruissellement. L'activité humaine est donc plutôt une source de contamination des sols. Toutefois, Juste et al. (1995) ont montré que les pratiques agricoles par rapport au cuivre peuvent fonctionner en puits de contamination. En effet, l'épandage des boues d'épuration permet une redistribution de certains éléments nutritifs tels que le phosphate et l'azote, ainsi que d'oligo-éléments (Cu, Mn et Zn) mais aussi d'autres éléments en trace métalliques (Cd, Cr, Ni, Hg, Pb).

C'est l'utilisation massive du cuivre en agriculture, et particulièrement son application aux sols viticoles, qui nous intéresse dans cette étude.

I-2-2-3 Utilisation du cuivre pour l'agriculture

La culture de la vigne en Europe est issue d'une vieille tradition de plus de 2000 ans, où elle était le pilier de la culture et de la vie rurale dans toutes les régions où il était possible de la cultiver. Un grand nombre de variétés de cépage était cultivé jusqu'au milieu du 19^{e} siècle. Mais en 1863, le Phylloxéra (insecte homoptère, i.e. puceron) importé d'Amérique du nord, détruisit près de la moitié des vignes. La réponse à cette invasion involontaire a été d'importer de la région où son issus ces insectes des portes greffes plus résistants. Cependant les vignes sont devenues sensibles au mildiou *Plasmopara viticola* (un champignon microscopique), observé pour la première fois en France en 1878 qui a ravagé par la suite en quelques années le vignoble français et la plupart des vignobles européens. Ce champignon affecte de nombreuses espèces de plantes mais particulièrement la vigne. Le mildiou survit pendant l'hiver dans les feuilles de vignes tombées sous forme de spores permanentes, lesquelles germent au printemps lorsque les conditions d'humidité et de température sont réunies. La propagation de ce champignon nécessite un certain nombre de paramètres climatiques et biologiques. Il prolifère particulièrement sous des conditions humides et chaudes.

C'est le botaniste Alexis Millardet (1832-1902) qui a découvert dès 1882 et de façon tout à fait inopinée l'action protectrice du cuivre contre le mildiou. Il expérimente en 1884 un mélange de sulfate de cuivre et de chaux afin de limiter la phytotoxicité des sels de cuivre dans les plantes. Il est donc le précurseur et le créateur de la Bouillie Bordelaise, qui est un fongicide contenant le cuivre comme agent actif, utilisée depuis 1885 dans la lutte contre le mildiou en France, puis dans le monde. La Bouillie Bordelaise est une mixture neutre composée de sulfate de cuivre et de chaux qui réagissent ensemble suivant la réaction suivante :

$$CuSO_4,5H_2O + Ca(OH)_2 \rightarrow Cu(OH)_2 + CaSO_4,2H_2O + 3H_2O \qquad \textbf{[I-2]}$$

Le cuivre reste le fongicide le plus efficace contre le mildiou et son application est autorisée dans le règlement européen depuis 1991 pour l'agriculture biologique. En viticulture traditionnelle, la vigne reçoit en moyenne 4 à 5 traitements de ce mélange par an correspondant en moyenne à 15 kg.ha^{-1}.an^{-1}. Cependant, lors d'années très humides ces doses sont souvent largement dépassées. Les contraintes réglementaires actuelles sur l'utilisation de la bouillie bordelaise s'orientent vers une diminution progressive des doses annuelles. En

2003, la dose de cuivre utilisable pour lutter contre le mildiou a été limitée à 8 $kg.ha^{-1}.an^{-1}$ par la commission Européenne, puis à 6 $kg.ha^{-1}.an^{-1}$ en 2006.

Lors de la pulvérisation de la bouillie bordelaise sur les vignes, une partie n'atteint pas la vigne elle-même. Plus de 60 % du cuivre se localise sur les feuilles de vigne, 30 % retombe directement sur le sol. Une grande partie du cuivre retourne au sol par le lessivage des feuilles et des ceps de vigne lors d'évènements pluvieux mais aussi par la dégradation des feuilles mortes sur le sol lui-même (Flores-Velez et al. 1996). Un grand nombre d'étude s'est intéressé à l'impact du cuivre dans les sols agricoles dont les teneurs sont très disparates en relations avec les différents états de contamination. Komárek et al. (2010) ont recensé un grand nombre de ces concentrations dans les couches supérieures du sol principalement pour les sols cultivés européens. Les teneurs en cuivre dans les sols agricoles (non pollués) sont généralement faibles, mais certains sols présentent des concentrations allant jusqu'à des valeurs de l'ordre de 1000 mg kg^{-1}de sol (Flores-Velez et al. 1996). La valeur maximale tolérée par l'Union Européenne pour les terres agricoles est fixée à 150 $mg_{Cu}.kg^{-1}$ de matière sèche. Il est à noter que cette norme est valable pour tous les types de cultures, i.e. indépendamment des rotations de culture (Fernández-Calviño et al. 2008a).

Dans les sols, et particulièrement pour les sites viticoles, la concentration en cuivre diminue très rapidement avec la profondeur (Brun et al. 1998; Pietrzak & Mcphail 2004; Li et al. 2005; Komarek et al. 2008) quelque soit le type de sol, pour se concentrer dans l'horizon supérieur (0-20cm) des sols (Figure I–12). La diminution en cuivre qui s'accumule dans les couches superficielles est particulièrement marquée pour les sols viticoles. C'est en, effet l'importante capacité de fixation du cuivre du sol, et tout particulièrement l'affinité importante du cuivre pour la MO qui est responsable de la faible mobilité du cuivre vers les horizons plus profonds (Komárek et al. 2010). La concentration en Cu diminue aussi avec l'écart au pied de vigne lié au retombé du cuivre par ruissellement le long des pieds de vigne. (Fernández-Calviño et al. 2008a) ont indiqué que ces effets sont d'autant plus marqués que le vignoble est jeune.

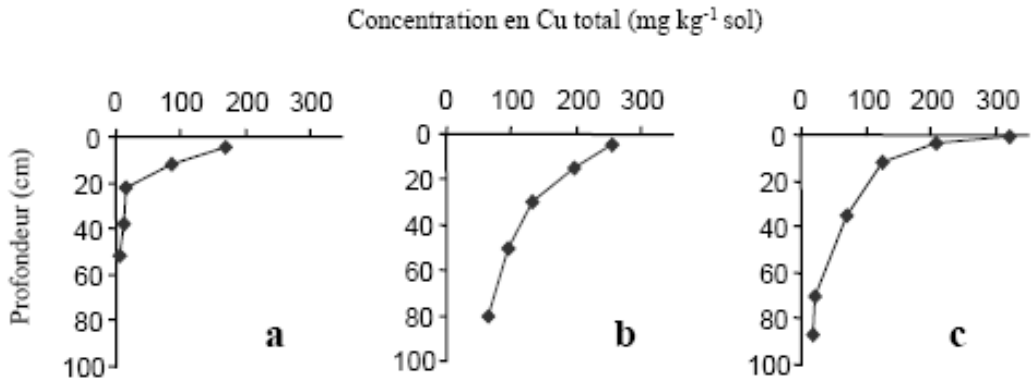


Figure I–12 Exemple de distribution du Cu dans les profils de différents sols viticoles à la suite de l'utilisation de fongicides cupriques : dans les sols calcaires du Languedoc (a), sols acides sableux du Beaujolais (b) et un sol d'Italie (c) (d'après Brun et al. (1998) cité par Chaignon (2001)).

I-2-3 La spéciation du Cuivre

Le terme spéciation pour un métal correspond à la distinction entre les différentes formes chimiques possibles du métal, c'est-à-dire les différents types d'espèces présentes de l'élément dans le milieu étudié. La spéciation chimique permet de comprendre le devenir des métaux dans l'environnement. En effet, l'impact d'un métal comme le cuivre dans les sols et particulièrement la toxicité sur les organismes vivants dépend de sa spéciation dans le milieu.

Il est largement reconnu que la toxicité du cuivre varie avec les espèces présentes dans l'ordre décroissant suivant la forme libre Cu^{2+} la plus toxique, les hydroxydes $Cu(OH)^{+}/Cu(OH)_2$, le carbonate de cuivre ($CuCO_3$, $CuHCO_3^{+}$, $Cu(CO_3)_2^{2-}$) et les complexes chlorés ($CuCl_2$) les moins toxiques.

Les métaux dans les sols sont présents en solution ou plus ou moins liés aux surfaces solides suivant leur spéciation. Les métaux interagissent avec les composés organiques et inorganiques du sol, par des mécanismes de transformation chimique qui peuvent être passifs, abiotique ou biotiques passifs (sorption, complexation, précipitation, réaction d'oxydoréduction, échange cationique) ou activement contrôlés par les processus biologiques. On citera pour ces derniers la bioaccumulation ainsi que les réactions de méthylation/déméthylation (Bolan et al. 2003b, 2010). Il existe plusieurs types de mécanismes impliqués dans la rétention et l'interaction de l'élément avec les constituants du sol, tel que l'adsorption sur la matrice solide, l'absorption, la formation d'hydroxydes, de complexes avec les ligands, l'échange ionique en présence de solutions salines.

On peut classer les ETM des sols en fonction de l'appartenance à un réservoir qui conditionne leur mobilité. Nous distinguons ainsi six compartiments dans le sol (Figure I–13). Le cuivre peut être :

- Inclus dans les réseaux cristallins des minéraux primaires (c'est-à-dire hérités de la roche mère mais non altérées) et des constituants secondaires (issus de l'altération pédogéochimique).
- Incorporé dans les êtres vivants : les organismes végétaux et animaux morts ou vivants, restitués dans la solution de sol, lors de leur minéralisation, ainsi que les micro-organismes.
- Complexé (chélaté) avec les macro-molécules de composés organiques
- Associé sous une forme plus ou moins échangeable (cation ou anion), à des surfaces réactives du sol tels que les argiles, les oxydes de Fer ou la matière organique.
- Présent sous une forme soluble ou colloïdale potentiellement mobile.

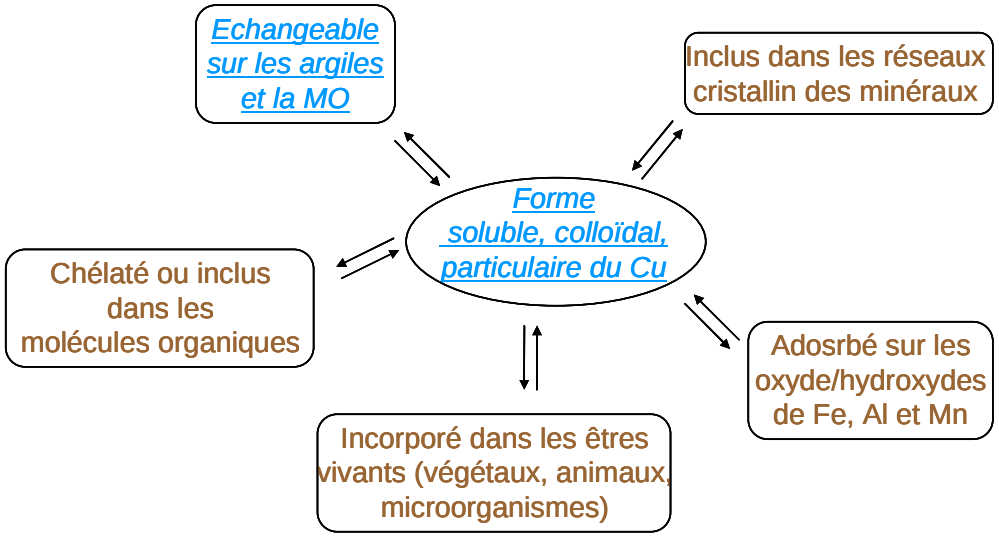


Figure I–13 Différentes formes et localisations (en solution et lié à la phase solide) des éléments traces dans les sols, adapté de (Baize 1997).

L'ensemble de ces processus de spéciation et les phases porteuses sont décrits dans les paragraphes ci-dessous. La répartition d'un élément trace entre ces différents compartiments n'est pas figée au cours du temps, mais évolue en permanence en fonction des conditions changeantes des facteurs contrôlant les cinétiques et équilibres présents, tels que la

température, le pH de la solution du sol, l'humidité, l'aération (redox), des apports externes d'ETM, etc (Juste et al. 1995).

I-2-3-1 En solution.

Dans les solutions de sol comme dans les eaux naturelles, on trouve de nombreux ligands organiques et inorganiques interagissant avec le cuivre. Le ligand le plus abondant est l'eau. Ainsi, chaque cation métallique est entouré d'un cortège de molécules d'eau, au nombre général de 6 pour les cations mono- et bivalents, ce qui correspond à la sphère d'hydratation du cation (Sigg et al. 2001). La proximité de la charge positive du cation à celle des protons a pour effet la déprotonation des molécules d'eau entourant le cation. Ce processus d'hydrolyse donne un comportement d'acide faible aux cations. L'hydrolyse dépend sensiblement du pH de la solution et est spécifique aux ions.

Les ligands inorganiques majeurs tels que SO_4^{-2}, NO_3^- ne réagissent que très faiblement avec le cuivre en solution. Par contre, l'ion majeur Cl^- est connu pour former des complexes relativement stables avec le cuivre. Ces ligands inorganiques sont en compétition avec les groupes fonctionnels de la matière organique pour laquelle le cuivre à une très grande affinité (Arias et al. 2004; Li et al. 2005). A la différence des ligands inorganiques, les ligands organiques peuvent être de nature et de tailles très différentes.

Ainsi, les ligands organiques peuvent contenir seulement quelques carbones (acides aminés, sidérophores, oses…) ou composés de macromolécules (protéines, acides humiques & fulviques…). La concentration en groupes fonctionnels organiques et inorganiques réactifs dans les sols est bien plus élevée que celle du cuivre. De ce fait, et du fait également de la forte stabilité des liaisons formées entre le cuivre et la matière organique, l'activité libre du cuivre est faible dans les solutions de sols naturels (Sigg et al. 2001).

I-2-3-2 En phase solide.

La sorption des cations métalliques sur les phases solides implique des surfaces solides minérales ou organiques dans le milieu. Les espèces chargées en solution sont attirées à la surface des particules de sol chargées par attraction électrostatique et/ou à travers la formation de liaisons spécifiques (Mott, 1981). Les propriétés du sol et de la solution déterminent l'équilibre dynamique entre le métal en solution et les phases solides du sol.

Les interactions des métaux avec les surfaces solides sont caractérisées par le changement de phase du soluté réactif et la modification de la surface par la présence du même soluté. Les mécanismes correspondants sont l'échange d'ions, la complexation de surface, la précipitation de surface, les processus de sorption liés au caractère hydrophobe de la surface ou du composé considéré, et l'absorption d'ions, qu'on peut associer à la diffusion dans la phase solide (Sigg et al. 2001).

L'adsorption par échange cationique décrit un échange de cations de charge équivalente à proximité immédiate d'une surface solide de charge constante. La présence des solutés cationiques est attribuable à l'effet électrostatique qui attire les charges positives de la solution à la surface négativement chargée. Le changement de la distribution des cations en solution à proximité de la surface présuppose un changement de concentration des cations en solution avec laquelle les cations échangés sont en équilibre. A l'opposé, la complexation de surface décrit la formation d'une liaison chimique par liaison covalente entre le cation et la surface. Dans ce cas, au moins une molécule anionique (e.g. ions OH^- pour les oxydes) interagit avec le cation qui s'adsorbe, à la différence des complexes dit 'de sphère externe',

pour lesquels les cations gardent leur sphère d'hydratation. Les processus de partage d'ion et de formation de complexe (sphère externe) sont très proches ce qui se reflète dans les constantes d'adsorption qui sont toutes du même ordre de grandeur pour le cas de l'échange cationique. Ceci, s'explique par le fait que les forces de liaison dans l'échange cationique ne mettent en jeu quasiment que les charges des ions qui sont de +1 ou de +2. Au contraire, les constantes de réaction des complexes de sphères externes varient de plusieurs ordres de grandeur, dépendant de la nature de l'ion et de la surface (ou de la molécule) sorbante. Les forces de liaisons en sphère interne sont plus beaucoup fortes que les forces mises en jeu par les interactions électrostatiques qui visent uniquement à neutraliser 'à distance' la charge du solide. Un cation complexé en sphère interne peut être considéré comme faisant partie du solide après adsorption, il ne neutralise pas forcément sa charge, il est alors possible que l'ion adsorbé ait la même charge que la surface. Les cations complexés en sphère interne peuvent donc modifier, voire inverser la charge intrinsèque de la surface.

L'absorption de cations se décrit simplement par l'introduction du cation métallique à l'intérieur du solide, par la création de liaisons chimiques entre le cation métallique et la surface réactive. La précipitation sur les phases solides décrit l'adhésion d'une microparticule inorganique sur une autre phase solide.

I-2-3-3 Les phases porteuses du cuivre

De nombreuses études (McLaren & Crawford 1973; Ramos et al. 1994; Arias et al. 2004; Buekers et al. 2007; Jacobson et al. 2007; Lejon et al. 2008) ont montré que la rétention des métaux dans les sols est particulièrement dépendante des phases porteuses. Des mesures par microscopie électronique indiquent que la distribution du cuivre est bien corrélée à celle des argiles et des oxydes de fer, mais que le cuivre présente une association préférentielle avec la MO du sol (Jacobson et al. 2007). Des études basées sur des approches d'extraction séquentielle (Shuman 1985), consistent à mettre en contact le sol avec des extractant de plus en plus forts (sensé attaquer des phases solides spécifiques) ont clairement permis de montrer que dans les sols, une majorité des métaux est liée avec la MO et les oxydes (Arias et al. 2004; Li et al. 2005; Lejon et al. 2008; Komárek et al. 2010). La matière organique des sols et les oxydes de Fe et de Mn, ainsi que les argiles sont les phases essentielles dans la rétention du Cu dans les sols. Ces travaux ont montré des fluctuations de la distribution du cuivre sur certaines phases porteuses en fonction du temps et de la teneur en cuivre du sol (Arias-Estévez et al. 2007).

I-2-3-3-1 Interactions du cuivre avec les argiles

Par leur petite taille et leur structure en feuillets, les argiles jouent un rôle important dans la rétention des métaux. Les argiles issues de l'altération des roches possèdent trois types de sites, fondamentalement différents, qui peuvent chacun interagir avec le cuivre :

- La structure en feuillet confère aux argiles la possibilité d'incorporer des charges positives (dont celle du cuivre) à l'intérieur des feuillets sous forme de complexes de sphère externe. La capacité d'échange cationique des argiles dépend alors essentiellement de cette configuration structurale. Elle s'exprime variablement selon la nature de l'argile en question. La capacité d'échange cationique est maximale pour les smectites et vermiculites, d'environ 1 $mmol_{charge}.g^{-1}$ de matière sèche (comparable à celle des acides humiques et fulviques), et minimale pour la kaolinite (~100 fois plus faible). Cette présence abondante de sites réactifs constitue un lieu de fixation privilégié du cuivre dans le cas de la présence d'argiles réactives dans les sols.

Toutefois, les cations liés aux argiles sont en équilibre avec leurs homologues libres en solution. Le seul paramètre discriminant ces incorporations est la charge de l'ion. Le cuivre, qui est un cation minoritaire en solution, sera aussi associé de façon minoritaire aux sites d'échange cationiques. Par exemple, malgré l'abondance de sites d'échange cationique, avec une solution de sol riche en ions Ca^{2+}, les surfaces solides ne retiendront que peu de cuivre sur des sites d'échange cationique.

- Les terminaisons des feuillets d'argiles constituent des sites de complexation de surface. Sur ces sites, le cuivre peut se lier sous forme de complexe de sphère interne. Grâce à ses propriétés chimiques, il peut donc être incorporé de façon préférentielle aux cations majeurs, moins réactifs à la complexation, tels que Ca^{2+}, Mg^{2+}, ou bien sûr Na^{+} et K^{+}, qui n'ont aucun pouvoir complexant (Tournassat et al. 2004).
- Les feuillets des argiles sont constitués d'un réseau formé en partie par des cations Al^{3+} qui peuvent être substitués contre des cations bivalents ou trivalents différents, parmi lesquels le cuivre. Le cuivre peut ainsi faire partie du réseau cristallin des argiles. Hypothétiquement, il est alors possible que le cuivre de la solution du sol intègre la structure des feuillets en substituant des cations de la structure minérale. Ce processus est a priori plutôt lent et pourrait être considéré dans le cas d'observations de sols contaminés au cuivre sur le long terme.

Les argiles constituent donc un substrat privilégié de sorption du cuivre par leur réactivité naturelle élevée et la variabilité importante des sites d'interaction.

I-2-3-3-2 Les oxydes et hydroxydes métalliques

Les oxydes de Fe, Al, et Mn sont des composants importants des sols. La petite taille des cristaux constitutifs confère une réactivité importante notamment aux oxydes de Fe et Mn. Les cations métalliques s'adsorbent sur ces cristaux en formant des complexes de sphère interne. Ceci signifie qu'il s'agit de substrats potentiellement intéressant pour la rétention du cuivre dans la mesure où l'interaction cuivre-oxydes ressemble à celles décrites sur les terminaisons des feuillets des argiles. Le cuivre concurrence efficacement les cations majeurs de la solution sur ces sites. Les oxydes de Fer amorphes observés aux rayons X (par exemple la Ferrihydrite) peuvent atteindre des réactivités de l'ordre du $mmol.g^{-1}$, qui sont des réactivités similaires à celles atteinte par des structures macromoléculaires organiques (Spadini et al. 2003). Les structures plus cristallisées (e.g. goethite, hématite, lépidocrocite…) peuvent avoir des réactivités diminuées de plusieurs ordres de grandeur suivant leur état de cristallisation. Les oxydes de Mn présents dans les sols ont généralement des réactivités au moins similaires, voire supérieures à celles des oxydes de Fer, à cause de la formation de structures lamellaires. Toutefois, les oxydes de Mn sont généralement bien moins abondants que les oxydes de Fer. Les oxydes d'Al sont moins décrits en termes de substrats réactifs dans la littérature. Il en découle que les oxydes de Fe et de Mn constituent des substrats privilégiés pour l'adsorption du cuivre, concurrençant à ce titre potentiellement les pools organiques et argileux des sols.

I-2-3-3-3 La rétention du Cu par la matière organique

De nombreuses études se sont intéressées à la réactivité de la matière organique avec les métaux dans les sols. L'ensemble de ces études ont montré une rétention importante des métaux par les matières organiques. Plus particulièrement pour le cuivre, il a été montré que la concentration en cuivre liée à la matière organique diminue avec la profondeur Figure I–14 et avec le contenu en MO (Pietrzak & Mcphail 2004) au profit de fractions réactives résiduelles.

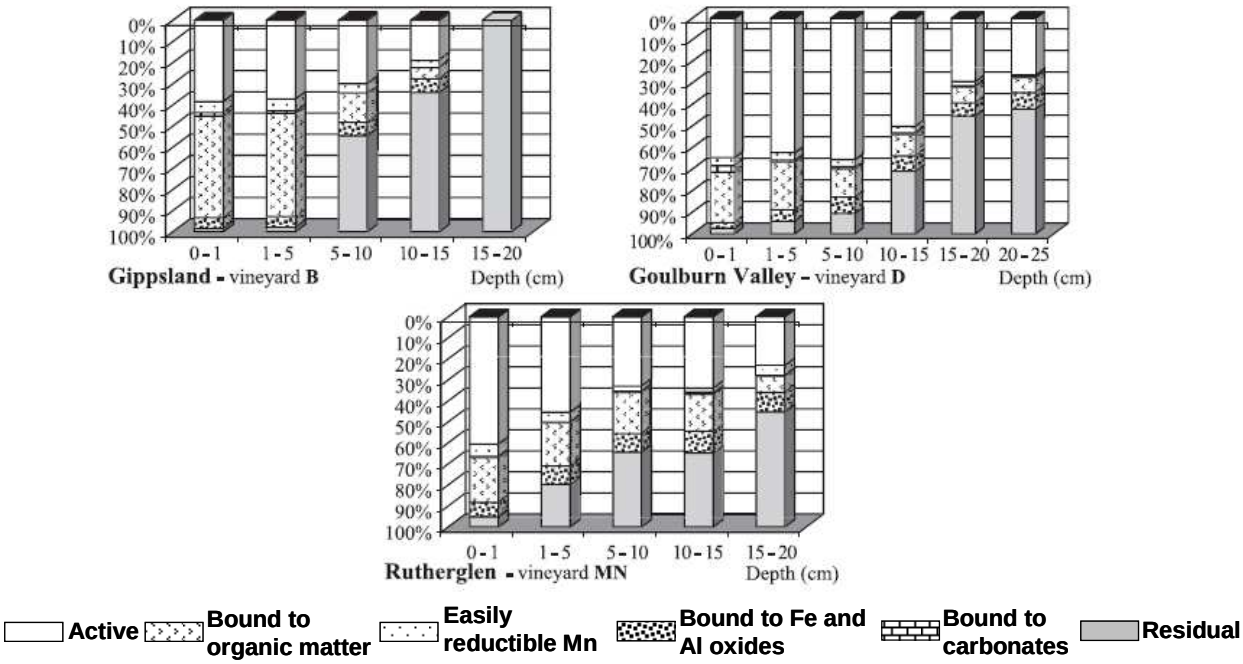


Figure I–14 Distribution du cuivre sur les différentes phases réactives des constituants du sol en fonction de la profondeur dans des jeunes sols viticoles de Victorian (Pietrzak & Mcphail 2004). Gippsland est un sol sableux, Goulburn est un sol acide limoneux, et Rutherglen est un sol acide limono-argileux.

La dégradation de la MO est à l'origine de la formation de l'humus, le constituant principal des colloïdes organiques du sol. Leur structure macromoléculaire confère à ces colloïdes une densité de groupes fonctionnels réactifs adide-base très élevée (dépassant le $mmol.g^{-1}$ de matière sèche). C'est pourquoi, le pool réactif de la matière organique des sols est représenté généralement par les substances humiques et notamment par les Acides Humiques et Fulviques. Les ETM, dont le cuivre, sont principalement retenus dans le compartiment organique des sols par chélation sur les groupes fonctionnels décrits dans le paragraphe I-1-2-3-2-a (page 15). Une étude récente (Manceau & Matynia 2010) a montré que dans les sols le cuivre est lié aux substrats organiques à l'échelle moléculaire par la formation principalement des chélatants, dont la structure ressemble à celle des ligands de type malate et malonate, ce qui implique donc la complexation du cuivre par deux carboxyles.

Il est connu que de par sa configuration électronique, le cuivre présente une affinité pour les groupes fonctionnels de la matière organique (Irving & Williams 1953) par rapport à d'autres cations bivalents tels que Ni, Pb, Zn etc.

Ainsi, diverses mesures par microscopie électronique (µSXRF) ont permis de mettre en évidence une co-localisation du cuivre avec la matière organique du sol (Jacobson et al. 2007). De plus, les plus fortes concentrations en cuivre sont souvent liées à la MO la moins dégradée, ce qui semble indiquer un effet inhibiteur du cuivre pour la minéralisation des composés organiques des sols riche en cuivre (Parat et al. 2002). Besnard et al. (2001) ont montré que les matières organiques particulaires (MOP) sont enrichies en cuivre, et que la concentration en cuivre dans ces MOP augmente avec la diminution de leur taille. Ces MOP de petites tailles seraient plus réfractaire à la dégradation. Sebastia et al. (2008) a montré que ces MOP sont particulièrement réactive au cuivre

La matière organique fixe donc très fortement le cuivre et présente ainsi un rôle important dans le pouvoir épurateur des sols et l'accumulation du cuivre dans les couches superficielles du sol. Toutefois, des apports exogènes de MO (amendements organiques ou boues) sur les sols naturels (Vacapaulin et al. 2006; Lejon et al. 2008) peuvent modifier à la fois la spéciation du cuivre, sa biodisponibilité et sa mobilité. Ceci montre une fois de plus que les

sols constituent un milieu complexe ; dans lesquels il est difficile de prédire le comportement des ETM sur la base de données générique, puisque le fort pouvoir complexant de la MO peut ainsi tout autant induire l'augmentation que la diminution de la mobilité du cuivre. Ces aspects et mécanismes seront évalués dans le dernier chapitre de cette étude.

I-2-4 Impact du cuivre sur les bactéries des sols

A partir des années 1960-1970, la prise de conscience des très forts apports de métaux dans les sols a motivé de nombreuses études sur l'impact des métaux sur les populations bactériennes (Giller et al. 1998). Les premières observations de la toxicité des métaux sur les microorganismes datent du début du 20ème siècle, mais il a fallu attendre les années 1960 avec l'apparition des fortes pollutions des sols aux métaux lourds pour voir émerger de nombreuses études sur l'impact des ETM sur les bactéries. Le cuivre est un élément essentiel à la vie des organismes, et peut agir comme co-facteur de la catalyse enzymatique ou d'oxydoréduction et la stabilisation des macromolécules et des membranes. De ce fait, il n'a pas été immédiatement considéré comme polluant

Les relations entre les bactéries et les ETM dépendent d'un ensemble de mécanismes qui contrôlent leurs interactions avec les protéines, avec les exopolymères extracellulaires, ou avec la paroi des cellules, ou encore leur compartimentation intracellulaire. Du fait de la plasticité de leur génome, les microorganismes ont pu développer ou acquérir des mécanismes de résistance ou de tolérance aux métaux via des mécanismes d'efflux ou de volatisation des métaux. Ces mécanismes de défense peuvent être affectés par des phénomènes de compétition entre métaux qui modifient les processus d'assimilation ou encore par l'induction de dommage dans la cellule (Giller et al. 1998; Ledin 2000; Hartwig et al. 2002) induisant des dommages importants aux cellules. Un mécanisme de toxicité bien connu est la substitution d'un élément chimique (ou métal) essentiel à la bactérie dans une protéine ou enzyme d'intérêt par un autre métal conduisant à l'inactivation de la formation vitale. Le métabolisme bactérien est très souvent limité par le flux d'oligo-éléments vers le cytoplasme cellulaire, et notamment les ETM essentiels. En terme de modélisation, cela permet de simplifier les interactions métal-bactéries à un équilibre thermodynamique des espèces chimiques du métal en solution et sur les sites sensibles des surfaces biologiques (Slaveykova & Wilkinson 2005). En effet, les bactéries sont capables de réguler les quantités de métaux intracellulaires (homéostasies) par des systèmes actifs d'entrée/sortie des métaux. Dans le cas du cuivre, celui-ci intervient de manière essentielle dans des systèmes enzymatiques tels que : catalyse de l'oxygène, la nitrification, oxydation des phénols et des amines, transport d'électrons dans les cellules (Ledin 2000).

Les microorganismes ont développé divers mécanismes de protection contre les métaux toxiques tels que la séquestration intracellulaire du métal, ou sous efflux vers l'extérieur de la cellule, mais aussi la séquestration extracellulaire. Pour induire un effet sur les bactéries, le métal doit d'abord se fixer sur des sites de surface spécifique des membranes bactériennes avant d'être internalisés (Beveridge 1989).

I-2-4-1 Réponse des bactéries à un stress cuprique

La réponse des populations bactériennes à des pollutions métalliques dans les sols est contrôlée par des facteurs biotiques comme nous venons de le voir, mais aussi par des propriétés physico-chimiques du sol. Giller et al. (1998) ont proposé deux modèles hypothétiques de réponse des communautés bactériennes à un stress métallique (Figure I–15). Le premier modèle considère une diminution de la diversité des communautés bactériennes

avec l'augmentation de la concentration en métal dans le sol. Le deuxième modèle, lui fait l'hypothèse que, même à de faibles concentrations en métal, des espèces compétitives peuvent être sélectionnées et dominer la communauté conduisant à une baisse de la biodiversité. L'augmentation de ce stress (concentration) induit ensuite une diminution de la compétitivité inter espèces ce qui permet la prolifération de certaines espèces (pic de diversité à un stress moyen à fort). Cependant dans les deux cas, aux fortes concentrations en métal, la diversité des communautés diminue drastiquement en relation avec l'extinction de la majorité des espèces.

Khan & Scullion (2000) ont montré que dans les sols contaminés la quantité (carbone) et l'activité (respiration) de la biomasse diminuent avec l'augmentation de la concentration en métal dans le sol. Toutefois, certains auteurs ont montré que la réponse des bactéries à un stress métallique est modulée par la teneur en MO (Khan & Scullion 2000; Marschner 2003; Lejon et al. 2008). En effet, ces études ont montré que les réponses des populations face aux apports métaliques sont moins prononcées dans les sols plus enrichis en matières organiques.

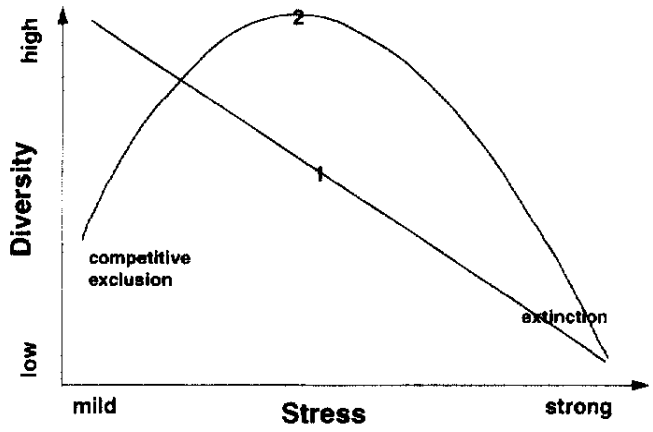


Figure I–15 Effet d'un stress métallique sur la diversité bactérienne du sol suivant deux conceptualisations différentes (Giller et al. 1998).

D'une manière générale, les pollutions métalliques tendent donc à la diminution de la diversité microbienne des sols en terme de richesse d'espèces, due à l'extinction de certaines espèces sensibles au stress de la pollution imposée, et peut aussi potentiellement amener à l'enrichissement du sol en certaines espèces adaptées résistantes à cette pollution. Ceci, conduit à la mise en place d'une résistance à l'échelle de la communauté bactérienne face à la contamination (Kandeler et al. 1996; Lejon et al. 2008; Piotrowska-Seget & Kozdroj 2008; Ranjard et al. 2008; Brandt et al. 2010).

La diversité génétique est toujours présente à l'intérieur d'une communauté et est sans doute cruciale dans la détermination de la réponse des populations face à un changement des conditions géochimiques du sol. Toutefois les corrélations entre la biodiversité et le stress métallique ne sont pas linéaires puisque des stress limités peuvent induire des phénomènes de compétitivité d'exclusion (Giller et al. 1998; Chaignon 2001).

Récemment, Wakelin et al. (2010) ont étudié les phénomènes d'exclusion compétitive et d'extinction des espèces en relation avec l'amplitude et la durée (long terme) d'une contamination cuprique. Cette étude a montré une dominance des *acidobacteria* dans la communauté bactérienne des sols. Ces bactéries sont sensibles au cuivre contrairement à des bactéries telles que *Pseudomonas* ou *Sphingomonas* qui sont très résistantes. Malgré cela, la diversité microbienne des sols contaminés évolue linéairement avec l'amplitude du stress métallique, et semble stable sur le long terme (plusieurs années). Ceci indique une

convergence de la structure des communautés bactériennes sous l'effet de stress métallique de faible ou forte amplitude (Brandt et al. 2010). Cet effet s'accompagne inéluctablement par une baisse de la biomasse microbienne par rapport à celle d'un sol non pollué (Giller et al. 1998).

La pollution des sols avec des métaux conduit souvent à une modification de la dominance des bactéries à Gram+ ou Gram- indiquant que les propriétés de surface des parois cellulaires sont fortement impliquées dans ces mécanismes de prélèvement des métaux (Dellamico et al. 2008). En effet, Ledin (2000) a montré que les interactions des ETM avec des sites actifs des bactéries conduisent à une réponse biologique directe (i.e. la toxicité), tandis que les interactions avec des sites de transport conduisent à l'internalisation de ces métaux suivie par une réponse biologique indirecte (i.e. induction enzymatique).

I-2-4-2 Biodisponibilité du cuivre

La toxicité du cuivre et son impact peuvent être étudiés via l'étude de sa biodisponibilité pour les microorganismes. Dans les sols naturels, les bactéries prélèvent pour leur métabolisme des quantités de métal dit biodisponible. La biodisponibilité se définit comme l'aptitude du métal à passer d'un compartiment quelconque du sol à l'intérieur d'un organisme vivant, faisant apparaître les notions d'accessibilité et d'assimilation (Figure I–16). La biodisponibilité est donc fortement dépendante de la spéciation chimique du métal en solution. En effet, la minéralogie, ainsi que l'ensemble des propriétés du sol, et particulièrement le pH et le taux de MO, par leur contrôle de la spéciation des métaux, sont des facteurs clés de la biodisponibilité du cuivre pour les microorganismes. En effet, la MO peut réduire la biodisponibilité du cuivre par la formation de complexes métaux/ligands organiques (Tom-Petersen et al. 2001). Au contraire, une diminution du pH provoque une meilleure solubilisation du cuivre et augmente ainsi sa disponibilité pour les bactéries selon la théorie de l'ion libre (Sauvé et al. 1997). La plupart des études ont montré que la forme libre du cuivre est la plus toxique pour les bactéries. Les effets toxiques du cuivre sur les bactéries sont donc spécifiques aux caractéristiques des espèces présentes, ainsi qu'à la concentration en cuivre dans le milieu (Pelmont 2005).

Comme on vient de le voir, dans les sols, la réponse biologique à un stress métallique peut entraîner des modifications des propriétés physico-chimiques du milieu ce qui peut modifier les mécanismes d'internalisation des métaux et leur bioaccumulation. Ainsi, les processus de chélation avec des ligands organiques piègent les métaux dans le milieu extérieur, ce qui limite les interactions du métal avec les sites réactifs des membranes bactériennes (Worms et al. 2006). Les mécanismes de séquestration extracellulaire des métaux par certaines bactéries peuvent donc induire une diminution de la biodisponibilité du métal. Ainsi par une approche en microcosmes de sols, Lejon et al. (2008) ont montré que la biodisponibilité du cuivre pour les bactéries est fortement modulée par l'apport d'amendement organique de différente nature, et semble contrôler l'impact du cuivre sur la biodiversité microbienne.

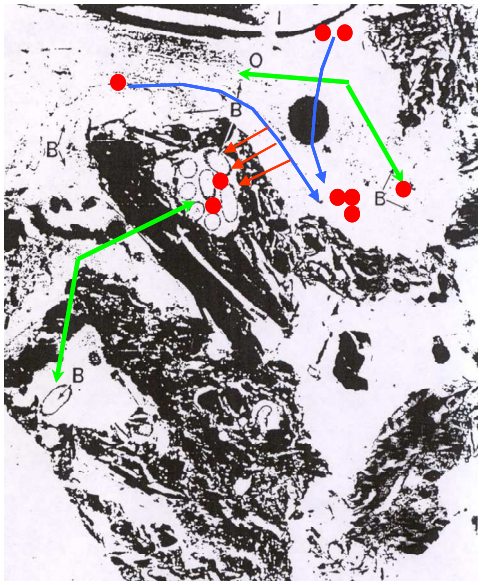


Figure I–16 Représentation de la biodisponibilité des micropolluants dans les sols. Importance de l'accessibilité (mise en contact) et de la disponibilité (entrée dans la cellule) des polluants pour les microorganismes (D'après (Martins 2008)). Le polluant est représenté en rouge (•), les flèches (vertes) indiquent la localisation de quelques bactéries et les flèches courbés (bleu) indiquent le déplacement du polluant dans la solution.

Plusieurs études ont montré une meilleure corrélation entre la toxicité des métaux pour les bactéries et la concentration en métal échangeable en solution plutôt qu'avec la concentration totale en métal dans le sol (Kunito et al. 1999a; Khan & Scullion 2000; Conder et al. 2001; Tom-Petersen et al. 2001; Giller et al. 2009; Maderova et al. 2011). Ceci indique que la concentration en solution est un meilleur indicateur de la concentration en métal biodisponible. Ainsi, pour évaluer la biodisponibilité du cuivre dans la solution des sols, certains auteurs ont appliqué des biocapteurs spécifiques du cuivre (Tom-Petersen et al. 2001; Lejon et al. 2008) (*Pseudomonas* DF57) pour quantifier la concentration en cuivre réellement « vue » par les microorganismes des sols.

Nous avons pu mettre en avant, que les différents composés du sol possèdent des propriétés spécifiques. En effet, les propriétés physicochimiques des sols peuvent modifier la répartition mais aussi la toxicité du cuivre pour les bactéries. Notamment, la matière organique des sols représente un pool très actif dans la structure des sols, ainsi que dans l'interaction avec les phases minérales des sols et les communautés bactériennes. La biodisponibilité du cuivre pour les bactéries est un facteur clé pour mesurer l'impact du cuivre sur les communautés bactériennes. Cette concentration en cuivre biodisponible et par conséquent la concentration en solution dans les sols est fortement dépendante de la hiérarchisation du sol, laquelle est étroitement liée à la teneur en matière organique du sol. Il apparaît alors que pris séparément les propriétés biogéochimiques du sol (hiérarchisation du sol, cuivre et matière organique) affecte de façon différente les communautés bactériennes des sols naturels. Cette étude met en avant, les connaissances des différents paramètres étudiés séparément mais souligne le peu d'étude sur la connectivité entre les différents paramètres à l'échelle des agrégats de sol et leur évolution temporelle.

I-3 Conclusion de l'état de l'art

Cette partie bibliographique présente une revue globale des connaissances actuelles sur la composition des sols et leur fonctionnement, ainsi que les paramètres biotiques et abiotiques intervenant dans la distribution, l'impact et la dynamique d'une contamination métallique au cuivre dans le cas des sols viticoles. Le cuivre de part sa spécificité d'oligoélément est très étudiée dans le cadre des pollutions des sols viticoles.

Nous avons pu mettre en avant, que les différents constituants du sol possèdent des propriétés spécifiques. En effet, les constituants tel que la MO, les argiles, les microorganismes des sols peuvent modifier la répartition mais aussi la toxicité du cuivre dans les sols. La matière organique des sols notamment représente un pool très actif dans la structure des sols, ainsi que dans l'interaction avec les métaux, mais aussi dans la diversité des communautés bactériennes. Il apparaît alors que pris séparément les paramètres du sol, du cuivre et de la matière organique agissent de manière différente sur les microorganismes du sol Les populations bactériennes sont très dépendantes des propriétés physico-chimiques du sol.

Cette étude met en avant les connaissances des différents paramètres étudiés séparément mais souligne le peu d'étude sur les relations entre les différents paramètres à l'échelle des agrégats de sol. D'après cet état de l'art, il est alors important de comprendre le rôle et l'impact de la MO et du cuivre sur les communautés bactériennes, avec leurs interactions respectives aux différentes échelles du sol. C'est pourquoi dans le cadre de ce travail, nous avons étudié les relations entre la matière organique, la spéciation du cuivre et la diversité bactérienne à l'échelle du sol global et des agrégats de sol à partir d'une étude expérimentale présentée dans les chapitres suivants.

Chapitre II Effet de la gestion des intrants organiques sur les propriétés bio physico chimiques d'un sol viticole.

II-1 Introduction

Dans un contexte d'accroissement de la population mondiale, l'amélioration des rendements des cultures et de la qualité des sols par la gestion d'intrants organiques sur les sols agricoles est devenue de nos jours une des priorités. En effet, une des caractéristiques des sols sous cultures est la perte progressive de leur fertilité, liée à l'augmentation de la production du sol (C, N,….). Pour lutter contre cela, ces sols sont généralement enrichis en matière organique (MO) par des amendements organiques ou par enherbement de surface avec des plantes bénéfiques pour le sol (légumineuses,…). La perte de carbone organique du sol n'induit pas seulement un problème de fertilité des sols mais peut aussi engendrer une perte de structure des sols (Bronick & Lal 2005). En effet, la structuration des sols est basée sur une organisation en agrégats (Tisdall & Oades 1982), dont l'importance et la stabilité sont fortement contrôlés par la matière organique (Gale et al. 2000; Balabane & Plante 2004; Six et al. 2004; Bronick & Lal 2005; Abiven et al. 2009). Les amendements organiques sont alors couramment utilisés dans les sols agricoles, pour améliorer les propriétés physiques et chimiques du sol. La gestion des amendements dans les sols est un facteur important contrôlant à la fois le stockage de carbone dans les sols et la stabilité de leur structure.

Le cuivre est largement appliqué sur les cultures de vignes, ce qui a conduit à d'importantes augmentations des teneurs totales en cuivre des sols, allant dans certaines régions jusqu'à des valeurs de 1000 $mg_{Cu}.kg^{-1}$ de sol (Flores-Velez et al. 1996). A de telles concentrations dans les sols, le cuivre est toxique et les effets sont irréversibles pour la biocénose du sol, conduisant à des modifications profondes de la structure des communautés microbiennes (Giller et al. 1998; Ranjard et al. 2008; Wakelin et al. 2010). L'impact des ETM sur les microorganismes des sols est dépendant à la fois de sa distribution mais aussi de sa spéciation dans la solution du sol. Pour évaluer les risques toxiques pour les plantes et les microorganismes du cuivre dans des sols fortement contaminés, il est nécessaire d'évaluer sa biodisponibilité pour ces organismes. Plusieurs études ont montré que les concentrations en cuivre dans les sols ne sont pas représentatives des concentrations biodisponible pour les plantes (Chaignon et al. 2003) et les microorganismes.

En plus de sa forte contribution à la stabilité des sols, la MO joue aussi des rôles importants de piège pour le cuivre ou de source de nutriments pour les microorganismes du sol. Dans les sols, la distribution du cuivre est hétérogène, mais s'accumule préférentiellement sur la MO (Jacobson et al. 2007). La MO joue donc un rôle essentiel dans le fonctionnement biologique des sols et dans leur pouvoir épurateur. Les effets des intrants organiques sur le fonctionnement et sur la contamination en cuivre des sols sont fortement dépendants du type de MO ajouté au sol (Mohamed et al. 2010).

Les objectifs de ce chapitre sont d'évaluer le rôle spécifique du mode de gestion des intrants organiques apportés au sol de Clessé sous forme d'apport en surface ou par végétalisation à la fois dans la stabilité structurale du sol, et dans la spéciation du cuivre *in situ*. Afin d'identifier le type d'intrant organique qui présente le plus d'impact sur les mécanismes de rétention et d'impact du cuivre dans le sol de Clessé.

II-2 Matériel et Méthodes

II-2-1 Description du site d'étude

Dans le cadre de cette étude, nous avons eu accès à un essai agronomique par la chambre d'agriculture de Saône et Loire sous le contrôle de Philippe Crozier et du propriétaire Daniel Lacroze. Le site viticole est localisé sur la commune de Clessé au nord de Mâcon (Bourgogne, Est de la France, 46°24'59''N, 4°48'54''E, Figure II–1a), et il est classé en terme de pédologie comme un cambisol eutrique (Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006; Bartoli & Dousset 2011). Ce sol précédemment utilisé pour la culture du maïs a été mis en culture de vigne en 1986. Cette parcelle viticole est devenue un site d'essai agronomique en 1991. Les amendements organiques sont apportés de manière homogène sur l'ensemble de la parcelle. Le sol est donc un sol brun profond, argilo limoneux fin développé sur une roche mère similaire. La parcelle montre une légère pente vers l'est (Figure II–1b). Ce site d'essai a initialement été mis en place pour comprendre l'influence de différents apports en matières organiques ou de différentes couvertures végétales sur l'érosion des sols viticoles.

De ce fait, sept types d'amendement ou de végétalisation ont été apportés sur ce sol en conditions contrôlées qui sont les suivantes :

Contrôle : non amendé en matière organique (**NA**) ; désherbage annuel.

Amendement organique :

Paille d'orge (**P**) : 10 $t.ha^{-1}$ tous les 2 ans.

Ecorces de conifère (**ER**) : 300$m^3.ha^{-1}$ tous les 3-4 ans.

Compost de conifère (**CC**) : 100$m^3.ha^{-1}$ tous les 3-4 ans (1991, 1994, 1997, 2000, 2003)

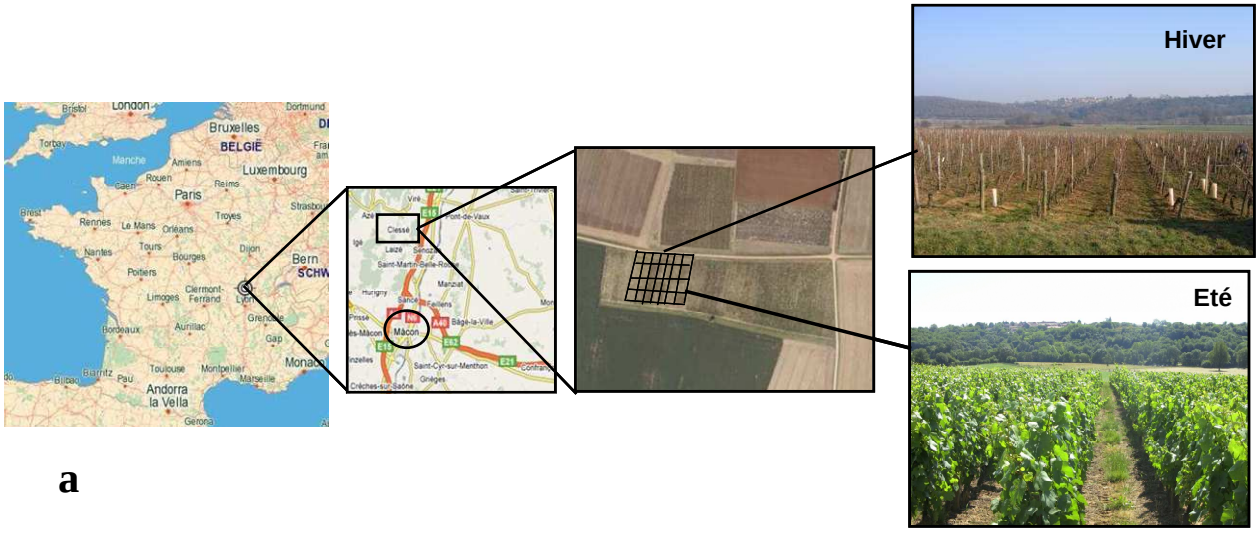
Végétalisation du sol par :

Trèfle (**Ht**).

Fétuque (**Hf**).

Enherbement naturel maîtrisé (**ENM**) : Ryegrass *Lolium perenne*.

La matière organique est apportée en mulch (i.e. déposée sur le sol) entre les rangs de vigne. La gestion contrôlée des apports organiques a été arrêtée en octobre 2003. Pour chacun des traitements organiques, les échantillons de sols ont été prélevés en mars 2008, c'est à dire 5 ans après les derniers apports de MO. Pour chaque échantillon nous avons prélevé les 5 cm premiers centimètres. Pour limiter les effets de l'hétérogénéité de la parcelle de sol sur les résultats, celle-ci a été divisée en 28 sous parcelles disposées selon 4 lignes et 7 colonnes, formant ainsi des plots de 13.5m x 8.1m. Les amendements sont répartis aléatoirement sur chaque ligne, comme présenté dans la Figure II–1b.



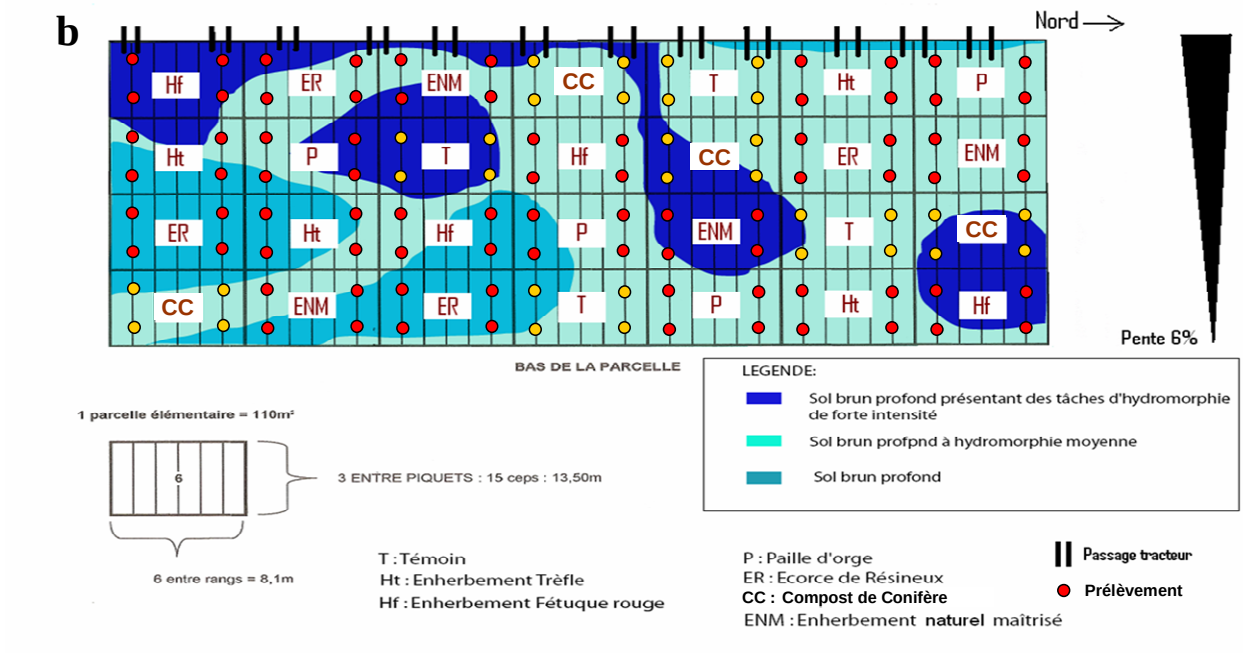


Figure II–1 Localisation du site d'essai agronomique en France (a). Schéma de la distribution spatiale des différentes sous parcelles amendées en matière organique et végétalisée sur la carte pédologique du sol de Clessé (b). Les points représentent les lieux de prélèvements de sols (0-5 cm).

La fréquence et l'intensité des apports de cuivre effectués tout au long de l'historique de la parcelle viticole sont présentées ci-après. Les apports de bouillie bordelaise, ont été apportés aux sols à raison d'environ 4 $kg.ha^{-1}.an^{-1}$ sous la forme d'un mélange de $CuSO_4$ et de chaux (20 % de cuivre). Les amendements en cuivre se font donc chaque année, à l'exception de 2003 (année très sèche), à une dose entre1500 à 3000 $g.ha^{-1}$. Les traitements ont été effectués à l'aide d'un canon pulvérisateur produisant une répartition relativement homogène du cuivre autour du pulvérisateur. L'apport en cuivre est fait une à deux fois par an selon la pluviométrie annuelle. Les précipités de cuivre déposés sur les plants de vignes se dissolvent lentement selon l'humidité présente. Une fertilisation en azote, typiquement au printemps, et une fertilisation en phosphore, potassium et magnésium, typiquement en début d'année, ont été effectuées annuellement.

II-2-2 Méthode de fractionnement physique non déstructurant du sol

La structure, et particulièrement l'organisation en agrégats, d'un sol est fragile nous avons choisi d'utiliser une méthode de fractionnement physique non déstructurant pour séparer les différents compartiments du sol. Pour cela, nous avons appliqué le protocole de fractionnement partiellement non destructif décrit par Jocteur-Monrozier et al. (1991), adapté à nos expériences (Figure II–2), pour optimiser la préservation de la micro agrégation naturelle des sols.

Les fractions granulométriques des sols de tailles spécifiques ont été obtenues par dispersion, tamisage humide et sédimentation des échantillons de sol. Pour chaque échantillon environ 30 g de sol équivalent sec sont prélevés. Au moment du prélèvement des sols ceux-ci présentaient une humidité massique moyenne de 80 % de la capacité aux champs du sol de Clessé et une température moyenne de 5°C au moment du prélèvement. Pour une bonne dispersion des agrégats, les sols sont mis en suspension dans 200 mL d'eau distillée dans des bouteilles en verre de 500 mL et mis sous agitation à 250 rpm (rotations par minute) pendant une heure. Les particules les plus fines (<20 µm) sont séparées des particules grossières par sédimentation. Les temps de sédimentation nécessaires pour obtenir les différentes classes de tailles de particules sont calculés avec l'équation de Stockes suivante :

$$t = \frac{9 \times h \times \eta}{2 \times r^2 \times (d_p - d_m) \times g} \qquad \textbf{[II-1]}$$

Avec t : le temps de sédimentation (s); h : la hauteur de chute des particules (cm); η : la viscosité du milieu (cPoise); r : le rayon des particules (cm); d_p : la densité des particules (-); d_m : la densité du milieu (-); g : l'accélération de la pesanteur (cm s^{-1}).

Après sédimentation, le surnageant contenant les particules fines est prélevé à l'aide d'une pompe à vide et stocké dans une bouteille de 1L avant d'être tamisé. Les particules plus grossières sont remises en suspension, pour optimiser le fractionnement, cette étape est répétée trois fois.

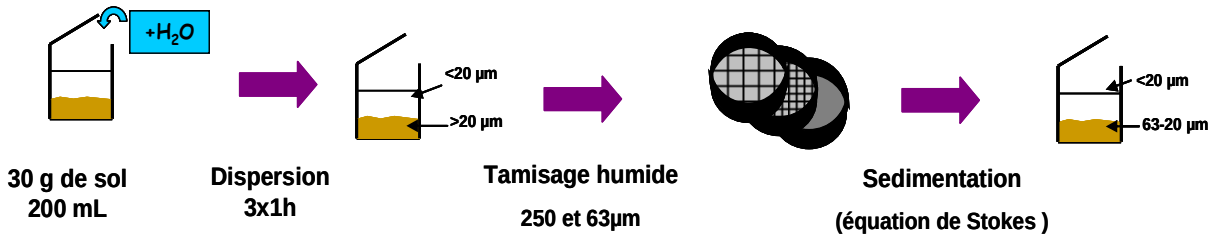


Figure II–2 Protocole de fractionnement physique non déstructurant d'un sol adapté de Jocteur Monrozier et al. (1991).

La suite du protocole consiste en un tamisage humide du sol des particules >20 µm issues du culot de sédimentation. Les fractions obtenues par tamisage présentent des tailles >250µm, ou comprises entre 250-63 µm. Il est nécessaire d'effectuer une dernière étape de sédimentation (à 1g) pour récupérer les particules du fond de tamis d'une taille de 63-20 µm (environ 10 minutes). La dernière étape du protocole est la séparation des particules <20 µm en deux fractions granulométriques correspondant aux limons fins (20-2 µm) et aux argiles (<2 µm). Les particules de 20-2 µm sont sédimentées à 1g (environ 5 à 6 heures), et les particules fines <2 µm sont centrifugées à 11'000g (Beckman J2-HC), pendant 20min (déterminé avec l'équation [II-2]). La classification granulométrique utilisée dans cette étude

est la classification de Gradistats (Tableau II-1), adaptée de la classification de Wentworth par (Blott & Pye 2001).

Tableau II-1 Classification granulométrique de Wentworth (Blott & Pye 2001)

2000-250 µm	250-63 µm	63-20 µm	20-2 µm	<2 µm
Sable grossier	Sable fin	Limon grossier	Limon fin	Argile

II-2-3 Analyses physiques des sols

II-2-3-1 Masse volumique apparente des sols

La texture du sol a été déterminée au laboratoire par une méthode de tamisage (II-2-2). Au contraire, la masse volumique apparente sèche du sol (de la couche de surface) a été mesurée sur le site viticole avec la méthode bien connue des cylindres de (Blake & Hartge 1986).. Les dimensions des cylindres sont de 7.4 cm de diamètre et de 4.9 cm de hauteur, ce qui correspond à un volume de 210.7 cm^3. Les mesures ont été réalisées en triplicats pour chaque sol.

II-2-3-2 Distribution de taille des constituants des sols

La distribution de taille des constituants des sols ou de leurs fractions granulométriques a été mesurée par granulométrie laser (Mastersizer 2000, Malvern Ltd). Cette technique permet d'obtenir la texture organominérale du sol. Le granulomètre, équipé avec un module de vitesse à flux variable, mesure la taille des particules dispersées dans l'eau par diffraction laser de la lumière à l'aide de 52 détecteurs photodiodes. L'indice de réfraction utilisé comme paramètre modèle est de 1.55. Cet appareil mesure en routine la taille des particules de sol de taille comprise entre 0.02 et 2000 µm. Les mesures sont analysées en utilisant la théorie de Mie comme convertisseur des données de dispersion de la lumière en données de distribution de tailles de particules de l'échantillon. Cette mesure donne la correspondance de la taille des particules par rapport à un volume équivalent de particules de formes sphériques. Avant chaque mesure, les échantillons de sol sont dispersés ou non par des ultrasons à puissance maximale pendant 30sec ou plus. Cette technique destructive est rapide, avec un temps de traitement d'échantillons de 3 à 4 minutes. Cette procédure a été appliquée pour évaluer la distribution de taille des particules de nos sols et de leurs fractions granulométriques obtenues par la procédure de fractionnement physique non déstructurant, pour vérifier à la fois l'agrégation des sols et la qualité du fractionnement granulométrique.

II-2-4 Analyses chimiques des sols

II-2-4-1 Concentrations totales en Carbone organique et azote

Les concentrations totales en carbone organique et azote des sols ainsi que leurs fractions granulométriques ont été déterminées (duplicats) sur des échantillons de 20 mg de sol sec, préalablement broyés finement, homogénéisés, et analysés avec un analyseur élémentaire FlashEA1112/FLASH 2000 (LECA, Grenoble). Cette méthode de mesure est destructive. Le principe global de fonctionnement est de brûler à très haute température les échantillons avec

un catalyseur sous flux d'hélium, pour transformer le C organique en dioxyde de carbone (CO_2), et l'N organique en NOx qui est ensuite réduit en molécules de diazote (N_2) et de molécules d'eau piégées. Les deux gaz obtenus (CO_2 et N_2) sont séparés par chromatographie en phase gazeuse et détectés par un détecteur à conductivité thermique.

II-2-4-2 Concentration en éléments majeurs des sols

Les concentrations en éléments majeurs dans les sols et leurs fractions granulométriques ont été obtenues après extraction des éléments chimiques à l'eau régale (HNO_3 + HCl). La méthode de dissolution acide du matériel non homogène pour déterminer les concentrations en éléments chimiques est préférée à l'extraction par des agents de fusion car elle limite la concentration en matériel superflu dans la solution finale et une faible interférence dans la détermination des concentrations en solution des éléments. Les éléments chimiques cationiques mesurés sont Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn. Dans cette étude, la méthode consiste à broyer et homogénéiser 0.5g de sol sec avant d'être mis au contact avec 5 mL de solution d'eau régale pendant 24h à 70°C sur un banc de sable. L'eau régale est un acide fort obtenu par le mélange d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique en proportion molaire équivalente. Après digestion acide du sol, les échantillons sont dilués dans 50 mL d'eau déminéralisée (dilution 1:10 de l'eau régale), et les éléments quantifiés par ICP-AES (3000 DV, Perkin Elmer Ltd) à ISTerre, Grenoble. Les solutions standard sont préparées dans la même matrice d'eau régale diluée, afin de prévenir les effets de matrice. La détection limite de ces éléments dans notre cas est d'environ 20 ppb. Les mesures ont été dupliquées. Les données obtenues ont été analysées par une analyse en composante principale (ACP) après un traitement statistique mené avec le logiciel R.

II-2-5 Spéciation solide et liquide du cuivre.

II-2-5-1 Analyse du cuivre lié à la matrice solide

La concentration totale en cuivre (Cu_{Tot}) liée à la matrice solide des sols a été analysée après une extraction à l'eau régale du cuivre avec le même protocole que celui utilisé pour l'extraction des éléments majeurs (II-2-4-2). Les concentrations en Cu_{Tot} ont été mesurées de la même manière par ICP-AES, préalablement calibré avec des solutions standard (Figure II–3). La courbe de calibration pour le cuivre est totalement linéaire dans la gamme testée.

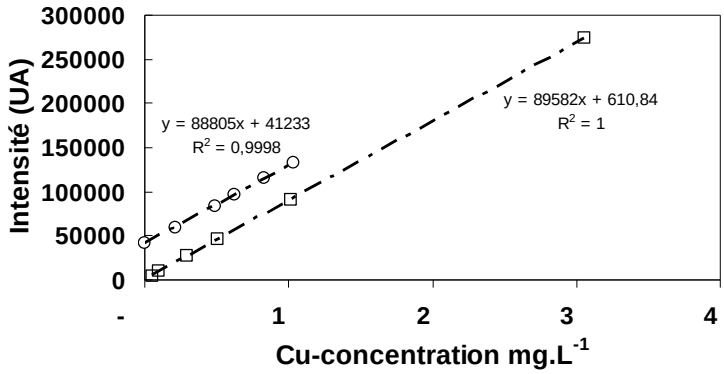


Figure II–3 Courbes de calibration des concentrations en cuivre des solutions standard déterminées par ICP-AES. Comparaison entre la gamme de calibration de la concentration en Cu total (□) à la longueur d'onde 324.75 nm et la droite d'ajout dosé en cuivre sur un échantillon pris au hasard (o).

Les échantillons de sol étant très chargés en éléments inorganiques extraits, une expérience d'ajout dosé en cuivre a été réalisée. Cette expérience a pour but de vérifier l'effet de la présence des autres éléments chimiques sur la mesure de la concentration en cuivre. C'est-à-dire d'évaluer les interférences de ces éléments sur la mesure de cuivre. La Figure II–3 montre qu'il n'y a pas d'effet de matrice sur les mesures de concentration en cuivre, puisque les pentes des deux droites sont similaires. On note aussi que les courbes de calibration de la concentration en cuivre sont totalement linéaires sur la gamme d'étude.

II-2-5-2 Spéciation du cuivre en solution

En parallèle de la concentration en cuivre lié à la matrice du sol, la concentration en cuivre échangeable au calcium en solution a été mesurée. Pour cela, des échantillons de 5 g de sol équivalent sec sont mis en suspension dans 40 mL de solution de $Ca(NO_3)_2$ à 0.14M, et agités à 250 rpm pendant 30 min. Les suspensions de sol sont ensuite centrifugées à 9'000g pendant 15 min. Le surnageant est alors prélevé pour la quantification de la concentration en cuivre échangeable au calcium (Cu_{ex}), par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES Optima 3300DV, Perkin Elmer) à ISTerre, Grenoble.

II-2-5-3 Mesure de la biodisponibilité du cuivre

Dans les sols, le cuivre peut être présent sous différentes formes, qui sont plus ou moins biodisponibles et donc toxiques pour les organismes vivants du sol. C'est pourquoi, nous avons cherché à mesurer la concentration en cuivre en solution de sol biodisponible pour les bactéries et pour les plantes.

II-2-5-3-1 Le cuivre biodisponible pour les bactéries

La mesure de cuivre biodisponible pour les bactéries (Cu_{BioB}) est réalisée sur les échantillons de la solution de sol après échange au $Ca(NO_3)_2$ à 0.14M. La concentration en cuivre biodisponible (Cu_{Bio}) a été déterminée dans la solution de sol à l'aide d'un biocapteur bactérien spécifique du cuivre développé et courtoisement fournie par O. Nybroe (Tom-Petersen et al. 2001). Le biocapteur bactérien *Pseudomonas fluorescens* (DF57-Cu15) a été sélectionné comme sensible au cuivre sur la base de sa tolérance et de sa réponse spécifique dépendante de la concentration en cuivre dans un milieu de composition contrôlée. La réponse du gène *luxAB* inséré dans le chromosome de la souche bactérienne par l'élévation de la luciférase en réponse à la présence de cuivre dans le milieu permet de quantifier les concentrations en Cu_{BioB} réellement « vues » par une bactérie. La luminescence induite a été mesurée en utilisant un luminomètre (TD20/20, Promega, France). La souche bactérienne *Pseudomonas fluorescens* DF57-Cu15 est, dans un premier temps, mise en culture à 30°C en milieu DMM (Davis minimal medium) contenant de la kanamycine à 25 $\mu g.mL^{-1}$, pour la sélection des bactéries bio indicatrices de la concentration de cuivre. La suspension bactérienne est ensuite prélevée pendant la phase exponentielle de croissance cellulaire. La suspension bactérienne est alors centrifugée à 5'000g pendant 10 min. et est remise en suspension dans du milieu DMM stérile contenant du glucose, jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} (Densité Optique à 600 nm) de 0.25 mesurée avec un spectromètre Biowave II (Serlabo technologie, Grenoble). La suspension bactérienne DF57-Cu15 (500µL) est alors mise en contact avec l'échantillon de la solution de sol (100µL) à analyser et de l'eau stérile (400µL) pendant deux heures à l'obscurité avant la mesure au luminomètre. Les concentrations en cuivre biodisponible mesurées dans les échantillons sont calculées en utilisant une droite de

calibration établie avec la mise en contact des bactéries (DF57-Cu15) avec des solutions standards de $Cu(NO_3)_2$ de concentrations connues et avec un fond ionique de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ à 0.14M (Lejon et al. 2008). Après 2 heures d'incubation, la luminescence est mesurée 2 minutes après l'ajout de 10µl de n-décanal (substrat de la réaction photochimique) homogénéisée pendant 10s par vortex. La mesure est exprimée en unités relatives de lumière (RLU : relative light unit). Les limites de détection supérieure (concentration létale) et inférieure sont de 10^{-3} et 10^{-7} M. Entre ces deux concentrations, la concentration en Cu absorbé par les bactéries est proportionnelle à l'intensité lumineuse. La quantité de cuivre détectée par les bactéries (i.e. la concentration en cuivre biodisponible dans le milieu) est directement proportionnelle à l'intensité de lumière émise par les bactéries, après activation du système rapporteur *luxAB* dans cette gamme de valeur.

II-2-5-3-2 Le cuivre biodisponible pour les plantes

Afin d'évaluer l'effet des amendements organiques du sol de Clessé sur la biodisponibilité du cuivre pour les plantes, nous avons mesuré les teneurs totales en cuivre dans une plante modèle collectée, sur tous les plots de la parcelle étudiée : Ryegrass (*Lolium perenne*). La méthode a consisté à prélever une dizaine de plants sur chaque plot pour environ 10g de tiges et racines de la plante *Lolium perenne* (durant la période de végétation, juin 2008) pour évaluer l'accumulation du cuivre dans les parties racinaires et aériennes. Les plants collectés ont été lavés deux fois avec de l'eau déminéralisée pour enlever toutes les particules de sols, puis séchés à 105°C pendant 48h et broyés mécaniquement (Warring Blender). Le cuivre a ensuite été extrait de 1g de ce matériel sec par une digestion avec un mélange de 5 mL de HNO_3 (65 %) et 10 mL de H_2O_2 (30 % v/v) à 70°C sur la nuit, protocole adapté de Brun et al. (1998). Cette solution a été ensuite filtrée à 0.45 µm avec des filtres d'acétate de cellulose (Satorius, France) et analysée par ICP-AES comme décrit précédemment pour les éléments traces métallique et le cuivre.

Figure II–4 Photo de la plante *Lolium perenne* prélevée sur l'ensemble des sous parcelles du sol sous vigne de Clessé.

II-2-6 Analyses statistiques des données.

Pour étudier les variations entre la composition chimique en éléments majeurs, les résultats sont traités par des analyses statistiques sous le logiciel R, à l'aide de l'interface ade4 (Thioulouse et al. 1997). Pour une comparaison entre les échantillons, chaque analyse requiert une analyse statistique qualitative sous forme d'Analyse en Composante Principale (ACP). Cette méthode statistique permet d'obtenir une carte des individus en fonction de leurs proximités. L'ACP consiste donc à rechercher un petit nombre de nouvelles variables Y_1, Y_2… appelées composantes principales, non corrélées entres elles et résumant le mieux possible l'ensemble de la variabilité des données.

II-3 Résultats et Discussions

II-3-1 Les propriétés du sol de Clessé

II-3-1-1 Propriétés physiques

Les propriétés physiques des cinq sols étudiés sont présentées dans le Tableau II-2. La masse volumique apparente sèche du sol ne varie pas significativement sous l'effet des traitements du sol : ρ_d = 1.35 g cm^{-3} (± 0.02).

Les résultats du Tableau II-2 montrent que les textures (les quantités de sable, limons et argiles) des cinq sols sont faiblement affectées par le traitement du sol et s'étalent entre 9.6 et 11.8 %, 56.5 et 61.5 %, 30.5 et 31.7 %, respectivement pour chaque classe granulométrique.

Tableau II-2 Principales propriétés physiques des sols contrôle et amendé du site de Clessé

Sol	Texture (%)			Masse volumique apparente sèche (ρ_d)	d_{50} (µm)	
	Sable	Limon	Argile	g.cm^{-3}	- US	30 sec US
Contrôle	11.8 ± 1.7	56.5 ± 2.7	31.7 ± 2.4	1.34 ± 0.03	43	22
Paille	11.0 ± 1.3	57.7 ± 1.0	31.3 ± 0.4	1.38 ± 0.13	58	21
Compost de Conifère	11.5 ± 1.1	61.5 ± 2.9	30.8 ± 2.7	1.33 ± 0.08	70	29
Fétuque	9.6 ± 1.2	58.7 ± 2.5	31.7 ± 3.6	1.35 ± 0.09	47	19
Trèfle	11.1 ± 1.5	58.5 ± 1.5	30.5± 2.1	1.33 ± 0.07	77	24

d_{50} : diamètre médian des particules de sol.

-US : sans ultrasons +US : avec 30sec. ultrasons

Toutefois, les amendements organiques modifient la structure du sol. Les effets des traitements (amendement organique et végétalisation) sur l'agrégation des sols ont été vérifiés par les mesures en granulométrie laser de la Distribution de Tailles des Constituants (DTC) du sol de Clessé (Figure II–5). Ces résultats montrent clairement une modification significative des courbes de DTC particulièrement entre le sol contrôle (non amendé) et les sols compost de conifère (CC) et trèfles (Ht). Ces deux traitements induisent clairement la formation de macro-agrégats (Figure II–5a). Cette effet d'agrégation des constituants du sol se manifeste par l'augmentation du volume (nombre des particules grossières) situé entre 63 et 1500 µm, et la diminution de la quantité de particules fines (<63 µm).

Les traitements Paille et Fétuque (Figure II–5) ont un effet plus faible sur l'agrégation des particules du sol (structure), mais toujours significatif au moins jusqu'à 400 µm. Ce résultat montre une forte spécificité du traitement sur l'agrégation des sols induits par la gestion organique à l'échelle du champ. Ceci semble essentiellement contrôlé par la nature de la matière organique apporté (Compost de Conifère *vs* Paille) par le type de plantes (Trèfle *vs* Fétuque), et par les quantités apportées au sol, en accord avec des études précédentes (Six et al. 2000).

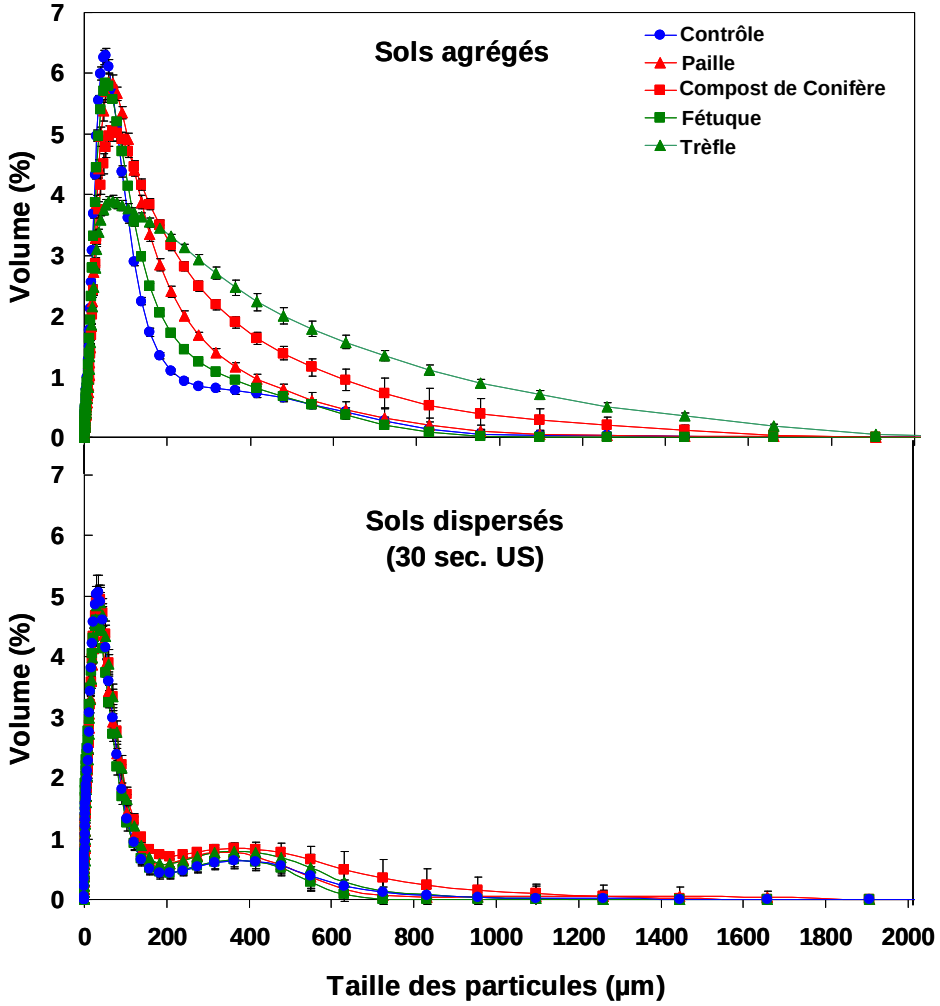


Figure II–5 Effet de l'amendement organique (Paille et Compost de conifère) et de la végétalisation (Fétuque et Trèfle) du sol de Clessé sur la distribution de tailles des constituants (DTC) comparé au sol contrôle mesurée par granulométrie laser (Mastersizer 2000, malvern) sans et avec traitement aux ultrasons pendant 30 sec.

Pour confirmer cet effet d'agrégation par les traitements organiques du sol, nous avons mesuré la distribution de tailles des particules des cinq sols après 30sec. d'ultrasons (Figure II–5b). Pour toutes les conditions, les ultrasons induisent la désagrégation totale du sol. Après 30sec. d'ultrasons, les 5 sols présentent des courbes de DTC similaires, qui par ailleurs permettent de confirmer le classement textural du sol de Clessé en tant que sol limono argileux (Lejon et al. 2008). On note la présence de particules grossières (500-1000µm) dans le sol CC par rapport aux autres sols, peut être lié à des débris de compost de conifère.

Les paramètres de forme calculés pour les courbes de DTC obtenues sans les ultrasons (Tableau II-2) montrent que le diamètre médian (d_{50}) des particules de sol passent de 43 µm (sol contrôle), à 80 et 90 µm pour les sols CC et Trèfle, respectivement. Le d_{50} des sols Paille et Fétuque est de 58 et 47 µm, respectivement, confirmant le plus faible effet de ces deux traitements sur l'agrégation du sol. Lorsque les sols sont dispersés, leur d_{50} diminue fortement jusqu'à une valeur de 22 µm ± 2 µm très similaire pour les 5 sols. De tels effets d'agrégation par l'amendement organique ou la végétalisation ont déjà été largement documentés (Andreux et al. 1980; Tisdall & Oades 1982; Oades 1988; Jocteur Monrozier et al. 1991; Six et al. 2004; John et al. 2005; Lugato et al. 2010). Ces effets sont plus souvent expliqués par l'amélioration de la stabilité des micro et macro-agrégats du sol à travers des effets direct lié à l'ajout de MO, et indirect à travers la libération progressive de matière organique au niveau de la rhizosphère des plantes (Denef et al. 2002).

II-3-1-2 Effet de l'amendement organique sur les paramètres chimiques de caractérisation du sol.

Les effets des amendements organiques sur les paramètres chimiques des cinq situations du sol de Clessé sont présentés dans le Tableau II-3. La concentration en Carbone Organique Total (COT) est variable entre les cinq sols, en relation avec l'amendement organique et le développement rhizosphérique due à la croissance des plantes. La teneur en COT dans les sols varie de 15.2 (NA) à 30.3 $g_C.kg^{-1}_{ss}$ (CC) entre les différentes conditions d'amendement organique. La teneur en COT dans les 5 sols peut être classée dans l'ordre décroissant suivant : CC > Ht > P > Hf > NA. Ce classement indique que les deux types de traitements induisent un enrichissement en carbone comparativement au sol contrôle (NA). Pour chaque type de traitement, deux niveaux d'enrichissement ont été observés : un effet fort avec l'amendement en compost de conifère et la végétalisation avec du trèfle, et un effet faible mais encore significatif a été observé avec l'amendement paille et la végétalisation avec de la fétuque. De la même manière, le contenu en azote total a varié fortement entre 1.1 et 1.9 $g_N.kg^{-1}_{ss}$ pour les cinq sols. L'impact le plus important de l'amendement organique sur la teneur en azote par rapport au sol contrôle est observé dans le sol végétalisé avec du trèfle, qui est une plante légumineuse fixatrice d'azote. Bien que les contenus en carbone et azote du sol observés augmentent, proportionnellement le rapport C/N est resté relativement constant avec une valeur moyenne de 14.4 (± 2.6).

Les concentrations en carbone de la biomasse microbienne du sol de Clessé ont été mesurées dans une étude antérieure par Lejon et al. (2007), et sont présentés dans Tableau II-3. Ces mesures ont été faite sur des échantillons prélevés à l'hiver 2004 avec les mêmes conditions de prélèvement. Ces concentrations correspondent à une fraction de la concentration en COT du sol. La teneur en carbone microbien dans le sol contrôle (NA) est de 238 $mg_C.kg^{-1}_{ss}$. Comparé au sol NA, les différents traitements augmentent la concentration de carbone microbien d'un facteur 2, avec des concentrations d'environ 450 $mg_C.kg^{-1}_{ss}$. Les amendements organiques ont un effet sur la biomasse microbienne légèrement supérieur au traitement par végétalisation du sol. Cette forte augmentation de la teneur en carbone de la biomasse est due à la présence de composés organiques facilement dégradable apportés par les différents traitements organiques.

Tableau II-3 Principales propriétés chimiques du sol de Clessé variablement amendé ou végétalisé.

	C Org. Tot.	**N Org.Tot.**	**C-biomasse***	**pH_w**	**Cu Total**	**Cu_{plante}/Cu_{Tot}**
	$g_C.kg^{-1}_{ss}$	**$g_C.kg^{-1}_{ss}$**	**$mg_C.kg^{-1}_{ss}$**		**$mg_{Cu}.kg^{-1}_{ss}$**	**(-)**
Contrôle (NA)	15.2 ± 5.1	1.1 ± 0.2	238	7,2 ± 0.03	118 ± 4	0.36 ± 0.03
Paille (P)	20.4 ± 6.7	1.5 ± 0.3	465	6,9 ± 0.03	91 ± 4	0.48 ± 0.04
Compost de Conifère (CC)	30.3 ± 3.9	1.6 ± 0.1	492	7,3 ± 0.03	102 ± 5	0.45 ± 0.04
Fétuque (Hf)	17.3 ± 4.2	1.3 ± 0.2	430	7,1 ± 0.02	89 ± 9	0.50 ± 0.05
Trèfle (Ht)	23.6 ± 3.6	1.9 ± 0.2	432	6,6 ± 0.1	106 ± 6	0.24 ± 0.04

*Les concentrations en carbone de la biomasse microbienne du sol sont issues de Lejon et al. (2007), dont les sols ont été prélevés en 2004 dans les mêmes conditions (5 cm de profondeur).

Le pH est relativement constant dans les différentes situations (pH ≈ 7.1), excepté pour le traitement au trèfle qui a induit une diminution du pH de 0.7 unité (Tableau II-3). Ce paramètre est très important en terme de comportement des éléments traces métalliques dans les sols, car il est connu pour contrôler les processus de spéciation de solubilisation et de rétention des métaux dans les sols (Sauvé et al. 1997; Buekers et al. 2007; Bonten et al. 2008; Weng et al. 2008). L'acidification observée dans le sol végétalisé avec du trèfle pourrait probablement induire des modifications de solubilité et de spéciation du cuivre (Padmavathiamma & Li 2010) et donc modifier la biodisponibilité du Cu pour la biosphère du sol (microorganismes et végétaux).

La concentration totale en cuivre [Cu_{Tot}] (lié à la matrice solide) a été mesurée sur l'ensemble de la parcelle, afin d'établir une carte de la distribution en cuivre. Les prélèvements d'échantillons de sol (+,Figure II–6) ont été réalisés de manière homogène sur la parcelle pour établir la cartographie de la concentration en cuivre total de la parcelle de Clessé par la méthode de krigeage à l'aide du logiciel R (en utilisant les calculs de variogramme). La cartographie du cuivre obtenue est présentée sur la Figure II–6. A l'issu de cette carte, la concentration moyenne en cuivre de la parcelle viticole en 2008 est de 70 $mg_{Cu}.kg^{-1}_{ss}$. Toutefois, sur les différents sous-parcelle, on observe une hétérogénéité spatiale de la répartition du cuivre sur la parcelle qui peut expliquer les variations des concentrations en cuivre natif mesurées sur chaque sous parcelle (Annexe E). Ces résultats indiquent qu'il est nécessaire de réaliser une campagne d'échantillonnage précise par type d'apport organique sur l'ensemble de la parcelle, afin d'avoir une concentration moyenne en cuivre pour chaque amendement.

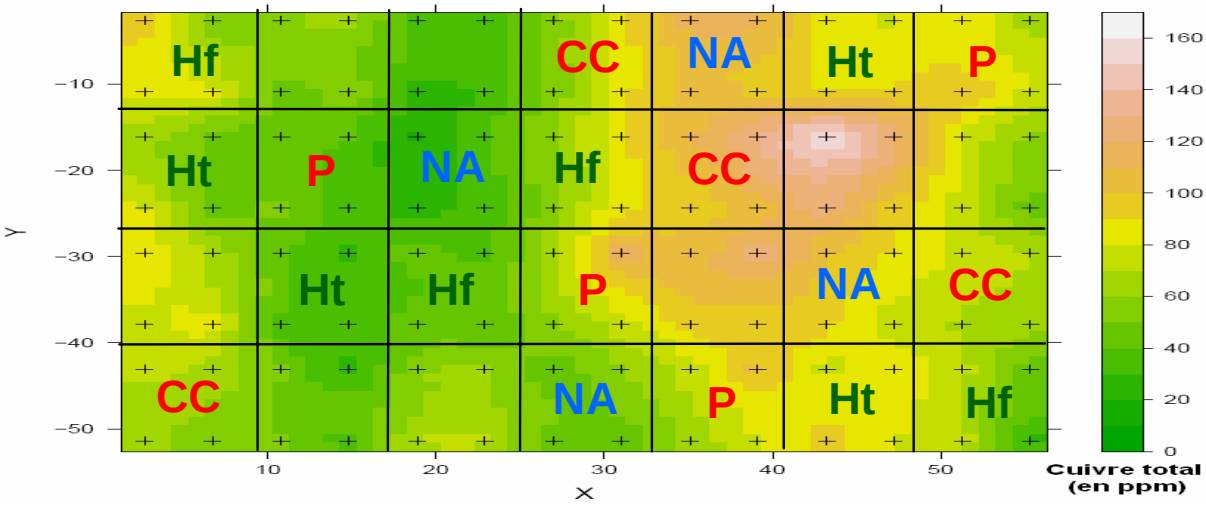


Figure II–6 : Carte de la concentration en cuivre sur la parcelle viticole de Clessé obtenu par une extrapolation des concentrations en cuivre mesurées dans le sol de chaque sous-parcelle par la méthode krigeage. NA : Non Amendé (contrôle), CC : amendé avec du Compost de Conifère, P : amendé avec de la Paille, Hf : végétalisé avec de la Fétuque, et Ht : végétalisé avec du trèfle. Les croix (+) correspondent aux points de prélèvements de sol.

Les concentrations totales en cuivre mesurées dans le sol de Clessé sous les cinq conditions de gestion de la MO varient entre 89 et 118 $mg_{Cu}\ kg^{-1}_{ss}$ (Tableau II-3). Ces concentrations correspondent à la concentration moyenne en cuivre du sol pour chaque traitement, mesurée sur 4 prélèvements effectués sur les 4 sous-parcelles de chaque condition testée, soit 16 points de mesures pour chaque condition (Figure II–1b).

Plusieurs études ont montré que dans les sols, le cuivre n'a pas le même effet sur des espèces végétales différentes (Brun et al. 2003; Ferrand et al. 2006; Padmavathiamma & Li 2010). Pour cette raison, plutôt que de collecter indifféremment les plantes trouvées sur chaque plot de la parcelle, nous avons préféré collecter sur tous les plots la même espèce

végétale et de préférence au même stade de croissance (partie aériennes d'environ 10 cm). Pour évaluer la biodisponibilité du cuivre pour les plantes, nous avons alors mesuré la quantité de cuivre dans l'ensemble (tige + racine) du plant de *Lolium perenne* (Ryegrass) rapportée à la quantité de cuivre dans le sol. Ce ratio est de 0.36 pour le sol contrôle, et pour les sols amendés en MO les valeurs sont proches de 0.5 (± 0.03), excepté dans le sol traité avec du trèfle, pour lequel ce ratio est de 0.24 (± 0.04). On observe donc une diminution significative de la bioaccumulation de cuivre dans les plantes dans les sols NA et trèfle qui indique probablement une limitation pour les plantes dans ces deux sols. Cette diminution a certainement deux origines différentes : si on prend le sol NA, comme référence, on constate que les deux amendements organiques (Paille et CC) et la végétalisation à la Fétuque, ont induit une augmentation de l'accumulation du cuivre dans *Lolium perenne*. Au contraire, pour le trèfle, la plus forte micro agrégation du sol induite par l'installation de cette légumineuse observé par granulométrie laser (cf. II-3-1-1) a plutôt limité la bioaccumulation de cuivre sans doute en limitant fortement l'accessibilité du cuivre aux racines des plantes. Ces hypothèses restent à vérifier.

Brun et al. (2001) ont montré que la teneur en cuivre dans les racines est fortement dépendante de la teneur en cuivre dans les sols alors qu'au contraire dans les tiges la concentration en cuivre est dépendante du pH du sol. Ces résultats ont été observés dans d'autres études (Brun et al. 2003; Chaignon et al. 2003; Padmavathiamma & Li 2009) pour différentes espèces de plantes. Dans notre étude nous n'avons pas différencié les teneurs dans les racines et dans les tiges, ce qui peut expliquer que malgré une variation dans les teneurs en cuivre dans les sols, c'est probablement le pH du sol qui modifie le plus la teneur en cuivre prélevé par les plantes.

II-3-2 Caractérisation des fractions granulométriques des sols

II-3-2-1 Analyse de la distribution de tailles des particules des fractions par granulométrie laser

La qualité et la reproductibilité de la procédure de notre fractionnement physique peu déstructurant ont été vérifiées par analyse de la distribution des tailles des constituants (DTC) de chaque fraction de sol obtenues par granulométrie laser. La Figure II–7 présente les résultats de cette distribution pour les cinq fractions granulométriques du sol contrôle. Des résultats très similaires ont été obtenus pour les quatre autres sols (Annexe A-1). La Figure II–7 a montré que la procédure de fractionnement est de bonne qualité puisque chaque fraction présente une distribution de taille de ces constituants monodisperse bien centrée sur la gamme théorique de taille de la fraction correspondante, excepté la fractions <2 µm (Figure II–8) qui présente une distribution bidisperse avec deux pics à 0.1 et 2 µm. Les courbes de DTC des fractions sont présentées sous forme pondérées par la masse de la fraction, pour mieux se rendre compte de l'importance relative de chaque fraction du sol. La Figure II–7 montre que les 3 fractions de taille supérieure à 20 µm, obtenues par tamisage humide du sol, contiennent encore une quantité significative de plus petites particules. Le faible chevauchement entre fractions témoigne de façon générale la bonne séparation des fractions.

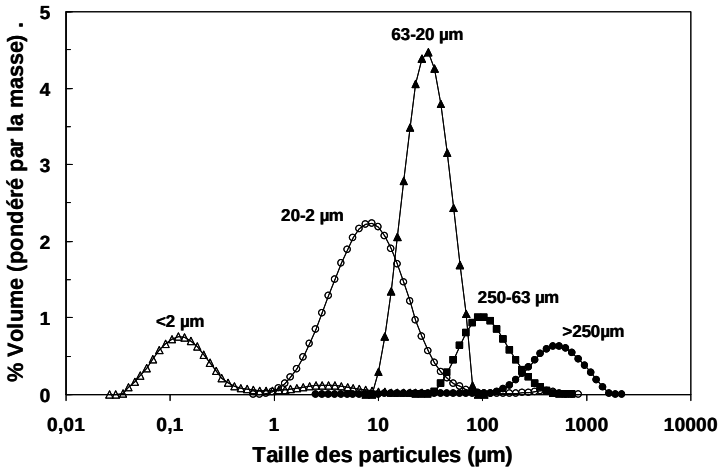


Figure II–7 Courbe de distribution de tailles des constituants (DTC) de chaque sous fraction granulométrique du sol de Clessé (exemple du sol contrôle) obtenues par granulométrie laser (Mastersizer 2000, Malvern). La distribution des constituants est pondérée par la masse de chaque fraction

La procédure de tamisage humide ne permet pas la séparation totale du matériel cohésif et des éléments plus grossiers liés à la présence d'agent de liaison transitoire. Les chevauchements un peu plus importants des fractions grossières 250-63 µm et >250 µm dépendent éventuellement d'effets connexes telle que la forme non sphérique des particules**.** En effet, la séparation de ces fractions a été réalisée à l'aide de tamis, i. e. un outil sensible à la géométrie des particules (Konert & Vandenberghe 1997; Xu & Di Guida 2003). Toutefois, cet effet représente dans tous les cas seulement un très petit volume, c'est-à-dire un faible pourcentage massique de chaque fraction et qui est très reproductible. L'étendue de chacune des fractions granulométriques est donc vérifiée par granulométrie laser.

Nous avons montré dans la Figure II–5, que les traitements des sols de long terme (amendement et végétalisation) ont induit une agrégation importante des constituants des sols. La Figure II–8 montre qu'un effet important est également visible à plus petite échelle, celle des micros agrégats, par des variations de la distribution en taille des petites particules entre les différents modes de gestions de la MO. Ces résultats sont en accord avec d'autres études comme par exemple Chenu & Plante (2006) qui ont montré que les particules de taille <2 µm sont en fait des micro-agrégats de taille variant du nanomètre au micromètre dans lesquels la MO est intimement associée aux minéraux. Comme déjà observé dans les macro-agrégats, on note une augmentation de la micro-agrégation des sols induite par le mode de gestion du sol, et notamment dans les sols trèfle, et amendé en compost. Ces deux traitements (CC et trèfle), induisent une agrégation générale des constituants des sols conduisant à une augmentation de l'ensemble de la taille des agrégats. L'amélioration de la stabilité des agrégats de sol est liée à l'apport de MO riche en sites réactifs et a donc été conservée surtout dans les fractions où le carbone s'est accumulé. Ainsi par granulométrie laser, nous n'avons pas remarqué d'effet aussi marqué des amendements sur les DTC des autres fractions (Annexe A-2).

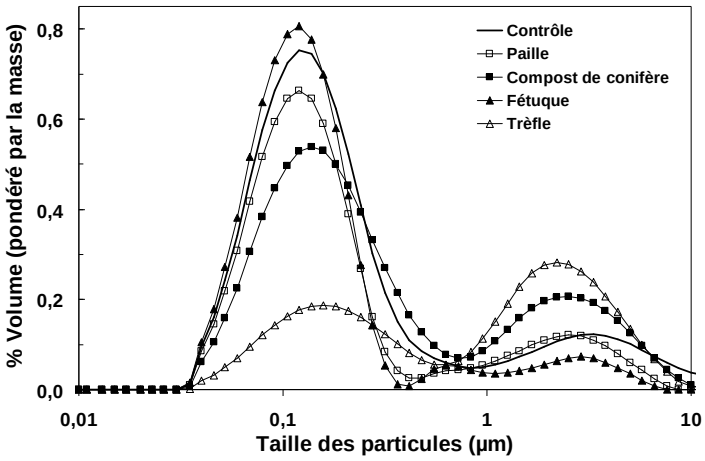


Figure II–8 Effet de l'amendement organique (Paille et Compost de conifère) et de la végétalisation (Fétuque et Trèfle) du sol de Clessé sur la courbe de distribution de taille des constituants (DTC) de la fraction <2 µm.

II-3-2-2 Distribution massique des fractions granulométriques du sol de Clessé

La procédure de fractionnement physique peu destructive des sols utilisée dans cette étude a permis de séparer les compartiments du sol de taille décroissante en fraction granulométrique. Chaque fraction correspond à un compartiment spécifique du sol présentant un fonctionnement biogéochimique particulier (Jocteur Monrozier et al. 1991). Les résultats présentés dans la Figure II–9 montrent la distribution en masse cumulée des fractions granulométriques. La méthode de fractionnement physique peu destructurante présente une bonne reproductibilité du fractionnement des sols puisque les bilans de masses sont de 99 % (± 6 %). On observe dans cette figure que la distribution massique des fractions du sol de Clessé est très proche dans les 5 sols, excepté pour le sol trèfle qui présente une forte macro-agrégation (>250 µm) par rapport au sol contrôle (NA). La fraction de sol qui a le plus évolué sous l'effet des différents traitements est la fraction >250 µm. En effet, les deux amendements organiques et les enherbements ont induit une augmentation de la quantité de matériel macro agrégé plus ou moins importante. Dans tous les sols traités, la masse de la fraction grossière (>250 µm) représente entre 10 et 20 % de la masse de sol fractionné contre seulement 6 % dans NA. Ceci indique un enrichissement en particules organiques grossières de taille correspondante, ainsi qu'une plus forte macro agrégation des particules dans les sols amendés et végétalisés. Toutefois, on n'observe pas d'augmentation significative de la masse de cette fraction (>250µm) dans le sol CC, lié aux débris organiques (de masse légère). La masse des fractions 250-63 µm est identique dans les 5 sols et représente environ 10 % du sol total. Les fractions 63-20 µm et 20-2 µm comptent pour 35 % et 30 % respectivement, c'est-à-dire près de 70 % de la masse de sol fractionné (30g), en accord avec la classification granulométrique du sol donnée précédemment. La masse de la fraction granulométrique argileuse (<2 µm) représente seulement 10 % (~3g) de la masse du sol fractionné. Les sols NA et CC présentent une distribution massique des fractions la plus similaire comparé aux autres traitements.

Le fractionnement granulométrique des sols étant peu destructif, les agrégats sont préservés et les résultats de la distribution massique des différentes fractions de sol sont différents des résultats texturaux du sol (cf. II-3-1-1). Cette procédure nous permet donc d'appréhender quantitativement la structuration du sol, c'est-à-dire son organisation en agrégats comme cela a déjà été décrit antérieurement (Tisdall & Oades 1982; Elliott 1986; Jocteur Monrozier et al. 1991; Six et al. 2004; Abiven et al. 2009).

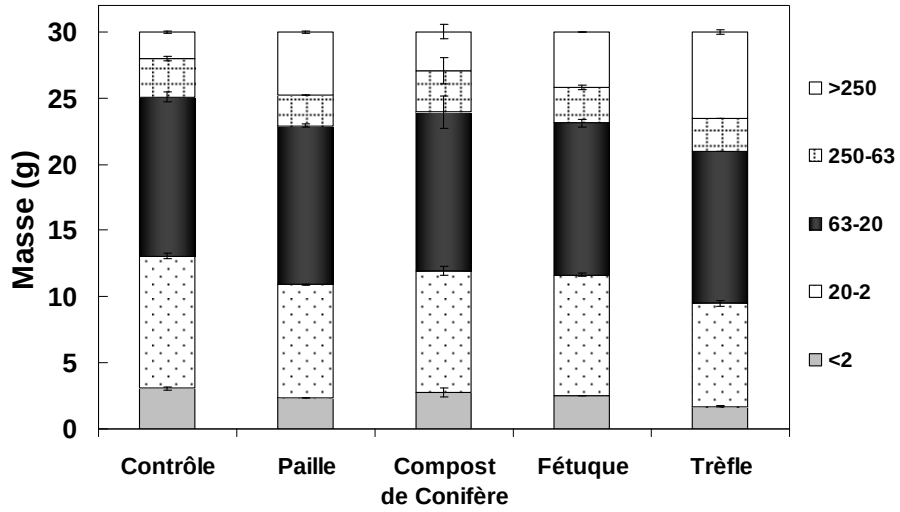


Figure II–9 Distribution massique des fractions granulométriques du sol de Clessé amendé en Paille (P) ou en Compost de Conifère (CC) et végétalisé avec de la Fétuque (Hf) ou du Trèfle (Ht) et le contrôle (non amendé NA). Les barres d'erreurs sont calculées avec des duplicats.

II-3-2-3 Propriétés physico-chimiques des fractions granulométriques des sols.

Comme nous venons de le montrer ci-dessus, chacune des fractions granulométries est bien définie par les deux paramètres physiques que sont la taille et la masse des constituants composant ces fractions. Les concentrations en éléments majeurs (C, Al, Fe, Mg, Ca, Mn, K) ainsi que la concentration en Cu sont présentés sous forme d'Analyse en Composante Principale (ACP) dans la Figure II–10. La décroissance d'explication des axes de l'ACP (centrée et normalisée), montre que les deux premiers axes expliquent une grande part de la variabilité des teneurs en éléments chimiques.

Les résultats de l'ACP comparant les différents types de MO apportées au sol de Clessé (amendement ou végétalisation) sans désunion des fractions granulométriques ne montrent pas de différence significative de la composition en éléments majeurs due à ces différents modes de gestion du sol (NA, P, CC, Hf, et Ht) (Figure II–10a). Globalement l'amendement organique ne modifie pas sensiblement la composition élémentaire globale du sol, même si les teneurs en carbone organique total sont variables.

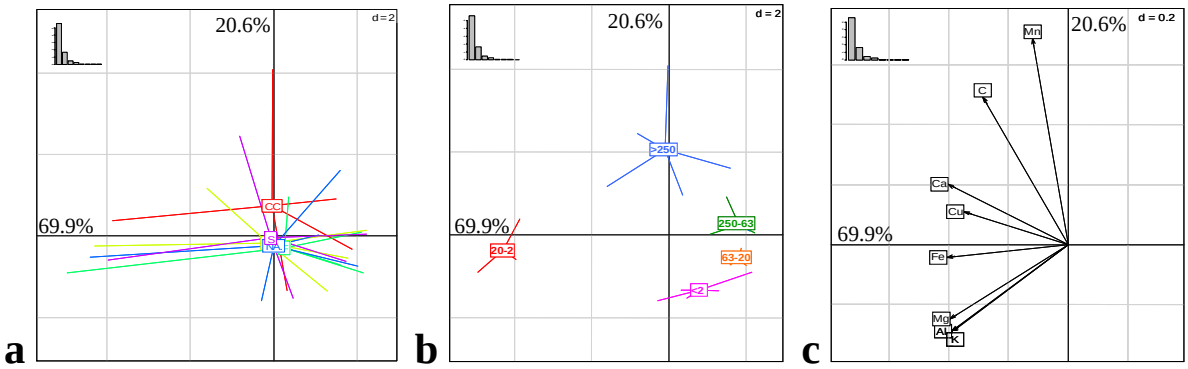


Figure II–10 Analyse en composantes principales (ACP) des concentrations en éléments majeurs (C, Fe, Al, Ca, Mg, K, et Mn) et de la concentration en Cu dans les sols traités (a) en matière organique (NA, CC, P, Hf, Ht) et dans l'ensemble des fractions (b). La figure c montre l'ordre d'explication des axes par les différents éléments analysés. Les ACP sont centrées et normailisées.

En revanche, dans la Figure II–10b qui présente l'ACP des concentrations en éléments majeurs dans chacune des fractions granulométriques montre clairement que chaque fraction est bien différentiée, ce qui nous permet de définir, que chacune des fractions des sols possède une composition chimique spécifique indépendamment du traitement qui n'a pas d'effet (Figure II–10a). La différenciation des fractions sur l'axe 1 (horizontal) est gouvernée par les concentrations en Cu, en Fe et enAl, tandis que l'axe 2 (verticale) est majoritairement dominé par les variations de concentrations en C, en carbonate (Ca et Mg) et en oxyde de Mn (Figure II–10c). La fraction 20-2 µm a la composition chimique la plus différenciée des autres fractions. Elle se différencie en particulier sur l'axe 1 qui explique la plus grande variation entre les différents éléments chimiques. Sa composition est donc très différente de celle des autres fractions et en particulier en cuivre. Pour les quatre autres fractions on observe une différenciation de leur composition principalement sur l'axe 2 bien corrélée avec une décroissance de la taille des fractions, et notamment les teneurs en C, Ca et oxyde de Mn.

L'observation de la composition spécifique des différents éléments majeurs analysés entre les 5 fractions granulométriques des sols nous ont poussé à étudier plus en détail, la distribution du C et du Cu dans les fractions granulométriques du sol, pour comprendre l'effet des traitements (amendements et végétalisations) sur la distribution spatiale du carbone à micro-échelle. Nous souhaitons aussi voir comment les différents modes de gestion du carbone organique conduisent à une modification de la distribution spatiale du fongicide dans ce sol viticole limono argileux.

II-3-3 Distribution du carbone organique total du sol de Clessé à l'échelle des agrégats.

La distribution en masse du carbone organique total (COT) dans les différentes fractions granulométriques des cinq sols est présentée dans la Figure II–11.

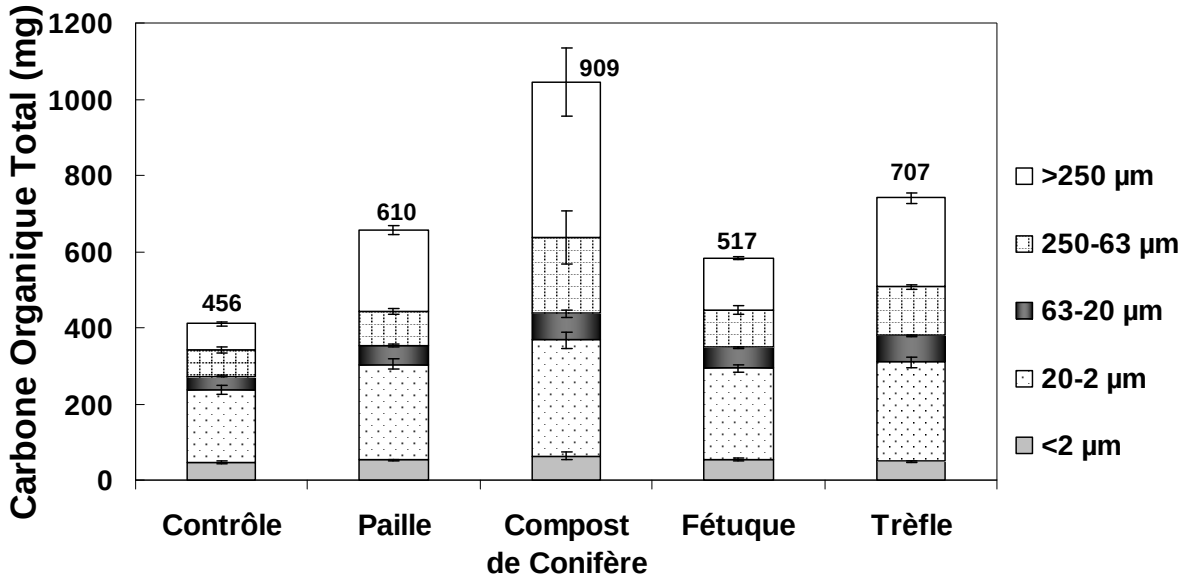


Figure II–11 Distribution massique du carbone organique total (COT) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé, contrôle (NA), amendé en compost de conifère (CC) et paille (P), et végétalisé avec de la Fétuque (Hf) et du Trèfle (Ht) (x mg de COT contenus dans 30 de sol fractionné). Les valeurs au-dessus des histogrammes représentent la masse de COT des sols non fractionné. Les barres d'erreurs sont calculées avec des triplicats.

Les résultats montrent que quelque soit le traitement, amendement ou enherbement, la teneur totale en COT est augmentée. On peut aussi observer que la distribution du COT est fortement hétérogène dans les sous fractions et entre les 5 sols. Pour l'ensemble des sols, les fractions <2 µm et 63-20 µm (cette dernière représentant la masse totale de fraction la plus abondante) présentent des teneurs en COT proches ne variant qu'entre 36 et 69 mg de C dans la fraction pour 30g de sol sec fractionné. Ceci indique que ces fractions sont insensibles aux deux types de traitements en MO. Ces deux fractions sont également les moins enrichies en carbone. Inversement, l'amendement et l'enherbement des sols ont fortement modifié la distribution du COT dans les trois autres fractions, qui présentent les contenus les plus importants en carbone organique total. Les fractions 20-2 µm des 5 sols présentent la plus grande masse de carbone qui s'étale entre 190 et 308 mg de C dans la fraction pour 30g de sol fractionné. L'amendement organique et plus particulièrement le compost de conifère induit une plus forte accumulation de COT dans cette fraction, que les traitements par végétalisation du sol. Dans la fraction 250-63 µm, seul l'amendement en compost (198 ± 70 mg) et la végétalisation en trèfle (127 ± 4 mg) ont induit une accumulation significative du carbone organique par rapport au contrôle (69 ± 7). Finalement, la fraction grossière (>250 µm) qui contient préférentiellement de larges fragments et débris de matière organique venant des amendements et des débris de plantes, est fortement enrichi en COT dans l'ensemble des situations, comparées au sol contrôle mais surtout dans le sol amendé en compost de conifère. L'addition de MO dans le sol de Clessé se répercute principalement sur la masse de COT dans la fraction grossière (>250 µm). L'enrichissement en C mesuré dans cette fraction pour les quatre modes de gestion organique, varie entre 2 pour la fétuque et 5.8 pour le sol CC, avec des enrichissements en C intermédiaire dans la paille et le trèfle avec des valeurs de 3.1 et 3.4, respectivement.

En terme de masse de carbone organique, nous pouvons donc classer par ordre décroissant ces fractions granulométriques : >250 > 20-2 > 250-63 > 63-20 ≈<2 µm.

Nos résultats sont en accord avec d'autres études utilisant d'autres techniques de séparation des constituants des sols (Besnard et al. 2001; Virto et al. 2008), puisque nous observons qu'environ 50 % de la matière organique est localisée dans les micro agrégats (<63 µm). Dans ces fractions la MO est retenue par adsorption sur surfaces minérales (argiles, limons) mais aussi à l'intérieur de ces micros agrégats (Chenu & Stotzky 2002), où le carbone organique est considéré comme protégé physiquement, et est donc plus stable et plus récalcitrant. En effet, plusieurs études (Balesdent et al. 1987; Christensen 2001; John et al. 2005) ont montré que l'âge du carbone organique augmente avec la diminution de la taille des fractions granulométriques des sols.

De nombreuses études ont contribué à montrer le rôle de la stabilisation des agrégats par la MO, qui conduit à une structure spatiale spécifique du sol par une organisation hiérarchique en agrégats (Tisdall & Oades 1982; Oades 1984; Jocteur Monrozier et al. 1991; Gale et al. 2000; Six et al. 2000; Besnard et al. 2001; Christensen 2001; John et al. 2005; Lugato et al. 2010). Nos résultats sur la distribution du COT nous indiquent que l'augmentation de la taille des particules dans les sols amendés et végétalisés est principalement liée à l'apport de MO qui joue le rôle d'agent de liaison entre les constituants fins pour former des macroagrégats. Néanmoins, dans cette étude, le type de MO apporté (direct ou via la végétalisation) modifie la stabilité des agrégats du sol. En effet, le sol CC augmente fortement la concentration en COT dans les fractions grossières (>63 µm), par l'ajout de compost dans ce sol mais pas particulièrement la masse de sol de ces fractions. En revanche, le traitement trèfle induit une très forte agrégation alors que la teneur en COT est moins élevée que dans le sol CC ce qui indique que les caractéristiques de cette MO sont plus favorables à la micro-agrégation en relation avec l'effet rhizosphérique (production très localisé d'exhudats racinaires agissant comme éléments structurants). Nos résultats sont en accord avec la littérature (Elliott 1986;

John et al. 2005; Lugato et al. 2010) montrant clairement une augmentation du contenu en C avec la taille des fractions, jusqu'à 2000 µm.

Le mode de gestion organique des sols influence donc la distribution du carbone à micro échelle mais aussi la structure spatiale du sol par la stabilisation de ses agrégats.

II-3-4 Distribution du cuivre dans les fractions granulométriques du sol de Clessé

La distribution du cuivre (en masse) dans les fractions granulométriques des 5 sols est présentée dans la Figure II–12. Les résultats de la distribution de la masse de cuivre dans les fractions sont normalisés par la masse totale de cuivre dans le sol, car les concentrations totales de cuivre étaient variables d'un traitement organique à l'autre en lien avec l'hétérogénéité spatiale de la concentration en cuivre *in situ*. Globalement, la somme des masses de cuivre contenue dans les fractions des sols varie entre 2.5 et 3.8 mg de cuivre pour 30g de sol. On peut ainsi calculer le bilan de masse du cuivre entre les différentes fractions et le sol total qui varient entre 91 et 117 %, c'est-à-dire des bilans en cuivre assez corrects.

Pour évaluer l'effet de l'amendement organique et de la végétalisation du sol de Clessé pour les différents traitements, nous avons mesuré la distribution de la masse de cuivre dans l'ensemble des fractions du sol de Clessé, pour les différents traitements (Figure II–12). La distribution du cuivre est hétérogène entre les différentes fractions, mais assez similaire entre les différents sols si on tient compte de la variabilité de la teneur totale en cuivre dans les différents sols.

Les plus forts contenus en cuivre ont été mesurés dans la fraction micro agrégée (20-2 µm) et ont varié entre 37 et 45 % de cuivre total entre les cinq sols. Pour la fraction >250 µm, les concentrations varient entre 16 et 25 %, et pour la fraction 250-63 µm entre 11 et 28 %. Dans le sol contrôle la fraction 250-63 µm est plus enrichie en cuivre que la fraction >250 µm, ce qui indique qu'elle doit être plus réactive que celle-ci. Dans les fractions 63-20 µm les concentrations ne varient qu'entre 6 et 11 % de cuivre. Finalement pour la fraction <2 µm les concentrations varient entre 8 et 14 %. Dans les deux sols végétalisés, les pourcentages de cuivre dans la fraction argileuse sont plus faibles que dans les autres fractions. Néanmoins on constate que pour tous les sols, la majorité du cuivre (>55 %) est retenue dans les deux fractions fines (<20 µm), regroupant les particules de limons fins et les argiles, qui représentent 40 % de la masse de sol.

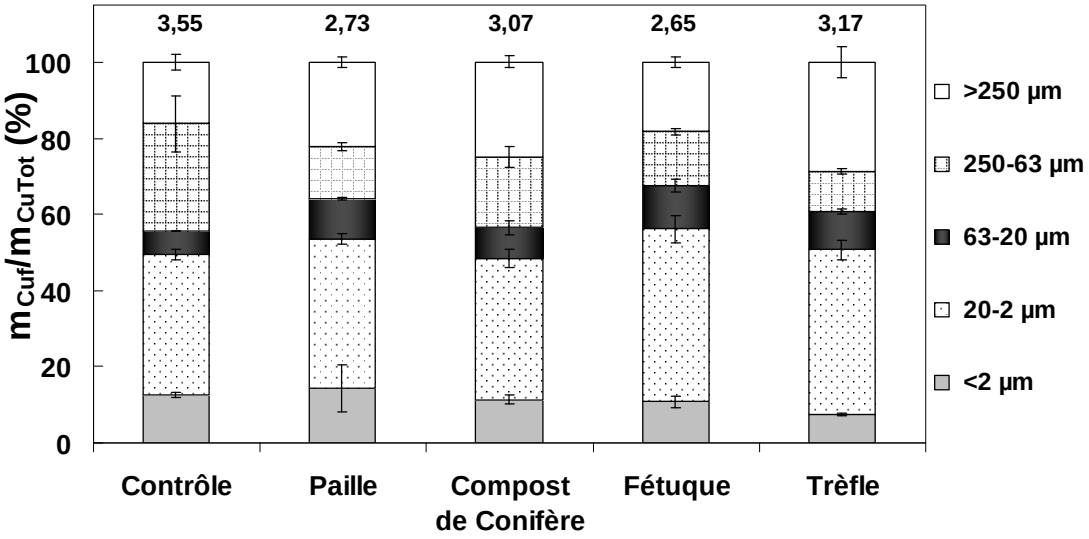


Figure II–12 Distribution massique cumulée du cuivre contenu dans les fractions granulométriques (normalisé par la masse total de cuivre dans le sol) du sol de Clessé contrôle (NA), amendé (CC et P) et végétalisé (Hf et Ht). Les valeurs au dessus des barres correspondent à la masse de cuivre dans chaque sol. Les barres d'erreurs sont calculées avec des triplicats.

Cette forte accumulation de cuivre dans les fractions (<20 µm) est bien en relation avec la forte concentration en carbone organique total dans ces fractions. La grande capacité de sorption des cations sur les argiles notamment liée à leur grande surface spécifique et à leurs nombreuses charges négatives, est sans doute responsable des fortes interactions avec le cation cuivre. Une part non négligeable de la teneur en cuivre est aussi présente dans les fractions grossières riches en composés organiques. Ainsi, la fraction >250 µm, qui ne représente que 12 % de la masse de sol, contient environ 20 % du contenu total en cuivre. Les mécanismes de rétention du cuivre sont bien sûr très différents dans cette fraction comme l'a montré A. Manceau (ISTerre, Grenoble) lors de l'analyse de la spéciation solide du cuivre par spectroscopie EXAFS (Navel et al. 2011), entre les fractions organiques et minérales. Besnard et al. (2001) ont montré aussi une forte rétention du cuivre par la MO (par différenciation des composés organiques (MOP) et inorganiques) et par les phases minérales dans les fractions fines des sols variablement amendés en MO. Dans le sol de Clessé, le cuivre est principalement lié aux particules fines et aux micro-agrégats mais aussi à la matière organique, laquelle est connue pour retenir fortement le cuivre (Parat et al. 2002; Weng et al. 2008). Dans notre étude, les amendements organiques et les végétalisations ne modifient pas significativement la distribution du cuivre solide (Figure II–12).

II-3-5 Spéciation du cuivre dans les sols de Clessé

Les concentrations totales en métal dans le sol sont un pauvre indicateur de la concentration réelle dans la solution du sol, auxquels les microorganismes sont préférentiellement exposés (Ranjard et al. 1997; Lejon et al. 2008). Comme nous l'avons vu précédemment la concentration totale en cuivre dans le sol de Clessé est très peu influencée par les apports de matière organique ou la végétalisation.

Pour évaluer le comportement du cuivre, l'effet de ces deux types de traitements sur sa spéciation et donc sa mobilisation, les différentes espèces du cuivre en solution (échangeable au calcium et biodisponible) ont été déterminées (Figure II–13). Dans une étude récente sur le

même sol, Lejon et al. (2008) ont montré que 99.9 % du cuivre ajouté reste lié à la matrice solide sans passer en phase liquide. La distribution du cuivre sur les phases porteuses (MO, oxyde de Mn, de Fe amorphe et cristallins, résiduel) varie fortement notamment avec le type d'amendement organique. Ces variations liées aux traitements des sols doivent donc aussi affecter la spéciation liquide du cuivre. C'est ce que nous avons voulu étudier ici et qui est présenté dans la Figure II–13.

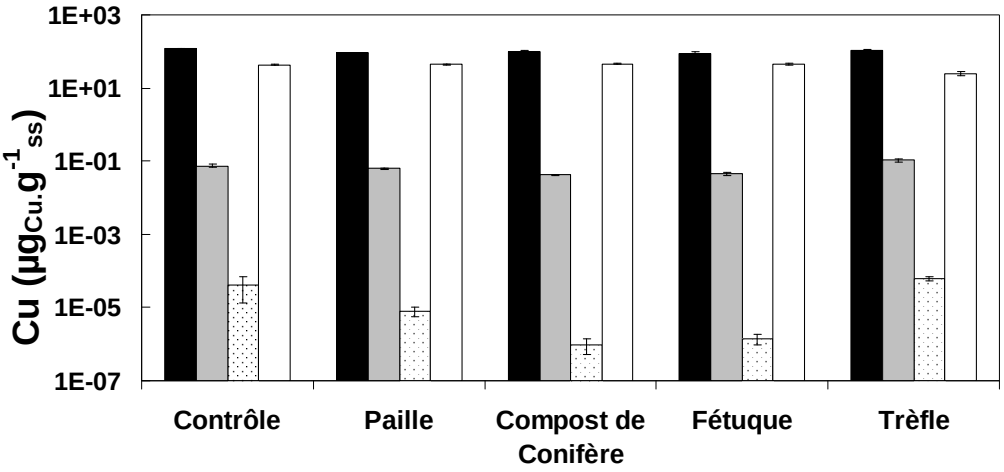


Figure II–13 Concentrations en cuivre dans la phase solide du sol de Clessé (noir), dans la phase liquide : cuivre échangeable au calcium (gris), et cuivre biodisponible (pointillé) ($\mu g_{Cu}.g^{-1}_{sol\ sec}$) ; et dans la plante *Lolium perenne* (blanc) collecté sur les cinq traitements. Les barres d'erreurs sont calculées avec des duplicats.

Les concentrations en cuivre mesurées dans la solution des différents sols sont présentées dans la Figure II–13, en comparant avec les concentrations en cuivre totales dans la phase solide des sols et dans la plante *Lolium perenne* collectée sur chacune des situations étudiées. Les résultats sont présentés en échelle logarithmique afin de pouvoir visualiser sur la même figure les différentes espèces de cuivre. Les échantillons de sols ont été prélevés avant le premier traitement en cuivre de l'année en cours. Ceci nous permet de faire l'hypothèse que les sols sont dans un état d'équilibre en ce qui concerne les réactions chimiques rapides, tels que l'adsorption des métaux par la phase solide qui est très rapide pour ce sol (Lejon et al. 2008). Les concentrations en cuivre échangeable au calcuim ($Ca(NO_3)_2$), [Cu_{ex}], dans le sol contrôle est de 0.075 $\mu g_{Cu}.g^{-1}_{ss}$. Dans les sols paille, fétuque et compost, cette concentration est de 0.063, 0.044, et 0.041 $\mu g_{Cu}.g^{-1}_{ss}$, respectivement soit des valeurs significativement plus faibles que dans le sol NA. Au contraire dans le sol trèfle, la concentration en Cu_{ex} est plus importante avec une valeur de 0.11 $\mu g_{Cu}.g^{-1}_{ss}$. Dans ce sol (Trèfle), le pH de la solution du sol a diminué de 7.2 à 6.6. Le pH est un facteur à considérer pour la rétention des métaux sur la phase solide comme cela a déjà été montré par ailleurs (Dawson et al. 2006). Ceci nous indique que l'augmentation de [Cu_{ex}] dans le sol trèfle est liée à la diminution de son pH.

Ces résultats montrent que les deux types de traitements du sol de Clessé (amendement et végétalisation) induisent des effets différents sur la spéciation liquide du cuivre et donc probablement sur sa mobilité et son impact. L'ajout de compost au sol augmente la rétention du cuivre, alors que l'enherbement avec du trèfle diminue la rétention du cuivre par rapport au sol contrôle. Bien que ces deux traitements (CC et Ht) induisent les plus fortes augmentations de teneur en carbone organique, les réactivités de ce carbone vis-à-vis du cuivre semblent différentes. Ceci doit probablement avoir un effet sur la toxicité du cuivre dans le sol.

La toxicité des métaux dans les sols est plutôt liée à sa concentration liquide et principalement à sa spéciation dans la phase aqueuse du sol (Maderova et al. 2011). Comme d'autres études (Tom-Petersen et al. 2001; Lejon et al. 2008), nos résultats montrent qu'une

très faible quantité de cuivre est vraiment biodisponible puisque les concentrations en cuivre biodisponible (Figure II–13) sont 1000 à 10000 fois plus faibles que les concentrations en cuivre échangeable pour les bactéries suivant le type de traitement. En effet, les concentrations biodisponibles extrêmes ont été mesurées dans les sols NA et CC. Dans ces sols les concentrations en cuivre biodisponibles sont de $4.2\ 10^{-5}$ et $9.7\ 10^{-7}$ $\mu g_{Cu}.g^{-1}_{ss}$, respectivement. Dans le sol trèfle la concentration en cuivre biodisponible est proche de la concentration dans le sol non amendé, en raison de la concentration similaire en Cu_{ex} dans ce sol. On observe donc une relation entre la concentration en cuivre échangeable au calcium en solution et biodisponible aux bactéries. Le type de MO et le pH du sol sont des facteurs clés affectant la biodisponibilité naturel du cuivre dans le sol de Clessé, comme dans beaucoup d'autres études (Tom-Petersen et al. 2001, 2004; Lejon et al. 2008; Nybroe et al. 2008; Giller et al. 2009).

Bien que de nombreuses études aient montré que les métaux sont fortement liés à la MO des sols, nos résultats indiquent que le mode de gestion organique du sol, c'est-à-dire la nature et probablement la quantité de MO, induit une modification significative de la spéciation du cuivre en solution. L'amendement en compost de conifère est celui qui induit la plus forte rétention du cuivre (par une faible concentration du cuivre en solution), ce qui est plutôt favorable en termes de risque potentiel. Au contraire, la végétation au trèfle qui présente par ailleurs de nombreux avantages augmente la mise en solution du cuivre via un abaissement du pH.

Pour disposer d'un autre indicateur de la biodisponibilité du cuivre, nous avons mesuré la concentration en cuivre accumulé dans la plante *Lolium perenne* collectée dans les cinq sols (parties aériennes et racines). Ce type de mesure est souvent utilisé comme indicateur de la phyto-disponibilité des métaux (Kabata-Pendias & Pendias 1992; Brun et al. 2003; Chaignon et al. 2003; Remon et al. 2005; Padmavathiamma & Li 2010). En effet, le cuivre accumulé dans les sols est responsable de la phytotoxicité à partir d'une certaine concentration, laquelle est dépendante des espèces végétales mais aussi des propriétés du sol (Hinsinger 1998). Chaignon et al. (2002) ont indiqué que la concentration en cuivre dans les plantes est un bon indicateur pour évaluer la toxicité du cuivre dans un sol. En effet, le cuivre est largement connu pour ses propriétés spécifiques d'oligo-élément essentiel à la croissance des végétaux, c'est aussi pour cela que sa concentration est un bon indicateur de la pollution du sol.

Pour renforcer la fiabilité de nos mesures, les prélèvements des plants de *Lolium perenne* ont été réalisés au même stade de croissance dans l'ensemble des situations. La teneur en cuivre mesurée dans les plants de *Lolium perenne* collectés sur le sol contrôle est d'environ 43 ± 2 $\mu g_{Cu}.g^{-1}_{ss}$. Dans le sol trèfle, cette valeur est réduite de 40 % à 25 ± 3 $\mu g_{Cu}.g^{-1}_{ss}$, alors que dans les trois autres situations (CC, paille, et fétuque) elle est restée similaire à celle du sol contrôle avec une teneur en cuivre dans la plante d'environ 45 $\mu g_{Cu}.g^{-1}_{ss}$. Dans le traitement trèfle, nos résultats ont montré une plus forte agrégation du sol de Clessé, avec une présence importante de macro-agrégats, dans lesquels les racines peuvent difficilement s'introduire. Ceci diminue probablement l'accessibilité des racines aux nutriments et particulièrement au cuivre présent majoritairement dans les micro-agrégats du sol constitutif des macro-agrégats. Comme d'autres éléments traces métalliques, tel que le Cd, le Pb et le Mn, le prélèvement par les plantes est fonction du pH et de l'amendement organique ajouté (Mench et al. 1994; Brun et al. 1998; Padmavathiamma & Li 2010).

Une nouvelle fois, nos résultats montrent que les traitements organiques du sol de Clessé ont un effet sur le comportement du cuivre en modifiant sa phytodisponibilité pour la plante *Lolium perenne*. Toutefois, ces effets sont assez différents de ceux de la biodisponibilité pour les bactéries.

II-4 Conclusion

Cette étude préliminaire avait pour objectif d'évaluer *in situ* l'effet de la matière organique apportée sous forme d'amendement organique (paille et compost de conifère) ou de couvert végétal (fétuque et trèfle) sur la dynamique solide et liquide du cuivre en relation avec le statut organique du sol de Clessé. Nos résultats nous ont permis de montrer que les différents modes de gestion de la matière organique à l'échelle de la parcelle modifient les propriétés physicochimiques du sol à l'échelle des agrégats, ainsi que la micro-distribution du cuivre. Sur cette base nous avons pu choisir l'amendement organique qui montre le plus fort impact sur les paramètres biogéochimiques de ce sol en vue de son utilisation dans une étude plus ciblée sur l'impact d'une forte dose de cuivre (Chapitre III).

Les traitements organiques augmentent globalement la teneur en carbone organique total du sol mais aussi la teneur de la biomasse microbienne. Les apports en surface ou par couvert végétal ont un effet différent sur les communautés microbiennes (Lejon et al. 2007) mais aussi sur la qualité du sol. La cartographie de la concentration en cuivre sur la parcelle viticole, a indiqué que la répartition n'était pas homogène sur l'ensemble du site, confirmant le choix de réaliser des prélèvements multiples sur l'ensemble des sous parcelles de chacune des situations étudiées. Toutefois, les traitements ont eu peu d'effet sur la spéciation solide du cuivre, au contraire de sa spéciation en solution (Cu_{ex}, Cu_{Bio}) qui apparaît fortement dépendante du mode de gestion de la matière organique sur le sol. En effet, le sol amendé en compost présente une plus forte rétention du cuivre (faible [Cu_{ex}]) par rapport au sol contrôle, contrairement aux autres traitements et en particulier l'enherbement avec du trèfle. L'effet variable des traitements sur la rétention du cuivre s'accompagne d'un impact sur sa biodisponibilité et réduit en particulier la rétention par la biocénose du sol, notamment pour les bactéries et les plantes (*Lolium perenne*). Nous avons montré en effet que les amendements organiques diminuent significativement [Cu_{Bio}], c'est-à-dire la biodisponibilité du cuivre pour les bactéries mais ont un effet inverse sur les plantes qui accumulent plus de cuivre dans les sols traités par rapport au terrain. Le traitement au trèfle est un cas à part car il induit des effets complexes sur l'écodynamique et la biodisponibilité du cuivre. En effet, on observe à la fois un effet « protecteur » pour les plantes, sans doute lié à l'augmentation de l'agrégation du sol qui diminue l'accessibilité du cuivre aux racines et une biodisponibilité du cuivre accrue pour les bactéries du sol végétalisé au trèfle, probablement induite par la baisse de pH observé dans ce sol.

Nos résultats ont montré que les traitements du sol de Clessé effectués pendant plus de vingt ans (depuis 1991) ont durablement modifié la biophysicochimie du sol, notament le COT, et en particulier celles qui contrôlent le devenir du cuivre. Ainsi, nous avons montré que tous les traitements ont augmenté l'agrégation du sol de Clessé à des degrés variables et donc leur structure spatiale à micro-échelle (fort pour le traitement au trèfle et faible pour CC).

Ces traitements ont également modifié la distribution du carbone organique au sein des micro-agrégats du sol. Les différents traitements ont permis d'apporter au sol des quantités et types de matières organiques très différents. Une quantité importante de matière organique s'accumule dans les fractions grossières du sol et semble capable d'immobiliser fortement le cuivre, jouant ainsi un rôle protecteur vis-à-vis de la biocénose du sol puisque les concentrations de cuivre en solution et biodisponible pour les bactéries sont fortement réduites. Nos résultats montrent que la méthode de fractionnement granulométrique des sols peu destructurante est adaptée pour localiser les polluants dans les microstructures des sols.

L'amendement en compost de conifère et la végétalisation en trèfle sont les traitements qui modifient le plus les paramètres biogéochimiques par rapport au sol contrôle. Entre ces

deux traitements, nous avons choisi pour la suite de l'étude le sol amendé en compost de conifère qui ne présente pas de différence avec le sol contrôle au niveau du pH, qui est un facteur chimique connu pour modifier fortement la spéciation des éléments traces métalliques. Dans les chapitres suivants, nous focaliserons donc notre étude sur la rétention, l'impact et la mobilité d'une contamination au cuivre dans le sol de Clessé amendé ou non en compost de conifère.

Chapitre III Effet d'une contamination cuprique sur la microflore bactérienne à moyen terme : rôle de l'amendement organique.

III-1 Introduction

Dans le chapitre précédant, nous avons montré que des modes différents de gestion de la matière organique exogène des sols induisent des modifications très variables et relativement importantes des propriétés biogéochimiques du sol (agrégation, statut organique et microbiologique, spéciation des métaux…) même si cela n'affecte pas la concentration totale en éléments majeurs ou en cuivre. L'utilisation depuis des décennies des produits phytosanitaires tels que le cuivre est à la fois bénéfique pour les rendements des cultures et néfaste pour la biocénose des sols. Toutefois, il existe peu d'informations sur la durée de ces effets et notamment sur la persistance ou non des impacts et des modifications des propriétés des sols. En effet, les sols sont des milieux complexes et vivants en continuelle évolution, de par les activités biologiques qui s'y déroulent.

L'utilisation des engrais et pesticides par l'homme a conduit à une anthropisation des sols, modifiant les conditions environnementales entourant l'activité de la biocénose (climat, amendements organiques, apports d'ETM toxiques…). Dans les sols sous vigne, l'utilisation à fortes doses de la bouillie bordelaise peut modifier le statut du cuivre, qui passe ainsi d'oligoélément essentiel à élément toxique, avec dans certains cas des concentrations dépassant les 1000 ppm, rendant impossible la plantation de nouveaux pieds de vigne. De nombreuses études sur l'interaction du cuivre avec les composés du sol (Baize 1997; Arias et al. 2004; Pietrzak & Mcphail 2004; Dawson et al. 2006; Ashworth & Alloway 2007; Buekers et al. 2007; Jacobson et al. 2007; Bonten et al. 2008; Komárek et al. 2010) ont montré que le cuivre s'accumule préférentiellement dans la matière organique. Le turnover de la MO est très variable dans les sols, en relation notamment avec sa localisation à micro-échelle : recyclage rapide de la MO dans les fractions grossières des sols allant de la journée à quelques mois, et stabilisation forte dans les fractions fines, avec un turnover de quelques mois à de nombreuses années (Angers et al. 1997; Monreal et al. 1997; Denef et al. 2001b). La MO joue un rôle majeur dans la rétention des ETM, ce qui rend indispensable la prise en compte de son évolution dans le sol pour comprendre son rôle dans le devenir des ETM tels que le cuivre.

Les microorganismes sont omniprésents dans les sols et présentent une grande diversité. Beaucoup de microorganismes telluriques sont sensibles aux ETM, connus pour leur toxicité qui conduit à une diminution de la biomasse microbienne des sols (Nannipieri et al. 2003; Becker et al. 2006; Lejon et al. 2008; Brandt et al. 2010). Bien que les métaux tels que le Cu, le Fe ou le Zn soient des nutriments essentiels pour les organismes (Alloway 1995), ils peuvent être toxiques à forte concentration. La toxicité de ces ETM est toutefois variable selon les organismes. La toxicité reflète en partie la formation de liaisons covalentes (de complexes très stables) avec des enzymes, alors que la fonction de ces enzymes est basée sur une complexation réversible de type liaison chimique. Ceci peut donc entraîner rapidement l'inactivation de la fonction enzymatique correspondante. Des systèmes de résistance à ces métaux existent au sein des populations microbiennes, qui leur permettent de survivre même dans des milieux fortement contaminés. La fréquence de ces systèmes de résistance aux ETM dans les sols est souvent proportionnelle aux concentrations de ces éléments toxiques. Leur impact sur les bactéries du sol et l'évolution de cet impact sur le long terme, peuvent donc être suivis par le facteur d'enrichissement du sol en bactéries résistantes à ces ETM et en particlier au cuivre (B^{Cu}). D'autres méthodes plus globales telles que celle des empreintes génétiques des communautés bactériennes (Fisher & Triplett 1999; Ranjard et al. 2000), permettent de suivre l'évolution de la structure des communautés microbiennes des sols soumises à un stress métallique. Cette dernière méthode permet de caractériser l'empreinte moléculaire des communautés bactériennes de manière rapide, sensible, robuste et

reproductible (Green et al. 2004; Ranjard et al. 2008). Elle a déjà été démontrée pertinente pour l'évaluation des modifications dans la composition des communautés des sols de statuts organiques différents (Lejon et al. 2005).

Bien que l'évolution temporelle, souvent appelé « ageing » ou vieillissement, des contaminations chroniques en ETM ou polluants organiques soit un facteur important dans la gestion des sols et des rendements des cultures sur le long terme, relativement peu d'études se sont intéressées au vieillissement des contaminations dans les sols. Pour évaluer correctement le devenir et l'impact des contaminants dans les sols, ces études d'écodynamique des métaux (spéciation, réactivité, mobilité, impact…) devraient porter, idéalement, sur une durée d'au moins une année intégrant un cycle de culture complet. Certaines études ont montré qu'il existe un impact rapide (quelques jours ou semaines) des ETM, et en particulier du cuivre, sur les populations bactériennes, mais très peu ont évalué cet impact sur le long terme (e.g. (Wakelin et al. 2010). En effet, on connaît encore mal les facteurs capables de moduler au cours du temps la réponse des populations bactériennes à la présence d'un stress métallique, qu'il soit aigu (contamination ponctuelle) ou chronique (e.g. traitement annuel en bouillie bordelaise). En particulier, on ne sait pas comment le vieillissement physicochimique de ces stress métalliques, comme celui du cuivre modifie leur toxicité sur le long terme.

C'est précisément l'objectif de ce chapitre qui avait pour but précis de caractériser la dynamique physicochimique (réactivité et spéciation) et biologique (impact et écotoxicité) du cuivre dans les sols sous vigne. Pour cela, nous avons choisi de développer une étude en laboratoire faisant appel à des mésocosmes de sol incubés en laboratoire. Nous avons choisi de travailler avec deux statuts organiques différents du sol de Clessé : non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC), qui est l'amendement qui modifie le plus le statut organique et microbiologique du sol de Clessé, tel que nous venons de le montrer dans le Chap. II. Ces sols ont été incubés en laboratoire durant deux ans en conditions parfaitement contrôlées, au cours desquels des prélèvements réguliers (tous les 6 mois) ont été effectués pour évaluer l'évolution temporelle de la rétention du cuivre dans les deux sols ainsi que son impact sur les communautés bactériennes et la dégradation de la matière organique exogène. Les sols NA et CC ont reçu une dose importante de cuivre apportée en une fois (240 ppm) ou de manière chronique (4 x 60 ppm), afin d'évaluer le rôle du statut organique du sol, du statut microbien, de la structure du sol et du mode de contamination dans l'évolution temporelle de la spéciation liquide et solide du cuivre et son impact sur la microflore du sol de Clessé. Pour cela, nous avons suivi l'évolution temporelle de :

- la concentration totale de Cu lié au solide.
- la concentration totale de Cu facilement solubilisable (échangeable au $(Ca(NO_3)_2)$.
- la concentration en Cu biodisponible pour les bactéries (biocapteur bactérien).
- la concentration totale en carbone organique total, [COT], en relation avec celle mesurée sur la parcelle viticole.
- l'impact du cuivre (dose et spéciation) sur les communautés bactériennes du sol de Clessé, à l'aide d'un indicateur cellulaire (proportion de bactéries hétérotrophes cultivables résistantes au cuivre, B^{Cu}) et d'un indicateur moléculaire (empreinte génétique par ARISA des communautés bactériennes).

III-2 Matériel et méthode

III-2-1 Description du site

III-2-1-1 Description du site viticole et campagne d'échantillonnage.

Nous focaliserons l'étude de la contamination en cuivre sur les sols contrôle (Non Amendé NA) et amendé en Composte de Conifère (CC) de la parcelle viticole de Clessé, car ils étaient particulièrement bien discriminés en terme de composition organique, structure, disponibilité du cuivre (Chapitre II) et de structure de communauté (Lejon et al. 2007).

La campagne d'échantillonnage a eu lieu le 17 février 2008 sur le site d'étude, c'est-à-dire 5 ans après le dernier apport organique, par temps froid et sec permettant une collecte optimale des sols (humidité faible). Pour éviter les problèmes d'hétérogénéité spatiale, nous avons prélevé sur chaque parcelle du même amendement environ 10kg de sol (balance de terrain) en quatre points (●) différents de chaque sous parcelle (Chap. II Figure II-1b). Lors d'une campagne d'échantillonnage en 2003, des concentrations en cuivre dans des profils de sols ont été mesurées par l'INRA de Versailles sur une parcelle non amendement (NA) et une parcelle amendée en compost de conifère (CC). On remarque une profondeur de pénétration maximale du cuivre d'environ 20 cm (Figure III–1). Cependant, le cuivre s'accumule préférentiellement dans les cinq premiers centimètres du sol. Les concentrations en cuivre mesurées entre 30 et 60 cm, nous indiquent la concentration du fond géochimique de cuivre de ce sol qui est d'environ 15 ± 5 $mg.kg^{-1}_{ss}$.

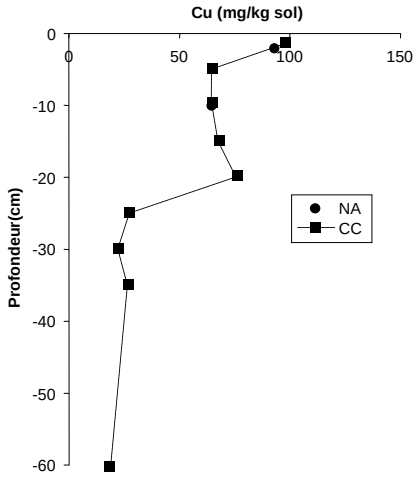


Figure III–1 Profile de la concentration en cuivre total sur la parcelle viticole de Clessé (mesure réalisé par I. LAMY, dans le cadre du projet MOBiPo-Cu)

Les prélèvements de sol ont alors été effectués à l'aide d'une pelle sur des carrés de 40x40cm entre deux pieds de vignes et sur les cinq premiers centimètres. Sur chaque prélèvement la surface a été raclée, comme indiqué en Annexe B-1, pour enlever les débris grossiers de matière organique présents en surface. Dans le cadre du suivi annuel sur la parcelle viticole, une campagne d'échantillonnage annuelle a été réalisée à la même date chaque année et suivant le même protocole. Pour chaque prélèvement réalisé sur la parcelle

viticole de Clessé, ceux-ci ont été effectués à la même période de l'année, c'est-à-dire au début du mois de Mars, quand le sol est encore froid mais non gelé. En cette saison les vignes sont au repos et les traitements du sol et des vignes n'ont pas encore été menés, c'est à dire que le sol est à l'état de repos (en terme d'ajout de cuivre). Pour avoir un témoin dynamique au champ des paramètres étudiés nous avons suivi l'ensemble des paramètres sur le sol prélevé directement sur la parcelle sans traitement intermédiaire d'incubation, mais seulement un tamisage à 4 mm pour éliminer les organismes vivants du sol les plus grands (e.g. vers de terre) et être dans les mêmes conditions du sol que dans les mésocosmes de laboratoire. Chaque année les prélèvements sont effectués sur les quatre sous blocs de la condition contrôle (non amendé, NA) et amendé en compost de conifère (CC).

III-2-1-2 Préparation des sols remaniés

Les prélèvements des deux sols NA et CC ont été réalisés sur les 4 blocs contenant l'amendement souhaité et en 4 points différents. Puis, les 4 prélèvements de chaque type de sol ont ensuite été mélangés au laboratoire dans une bétonnière après séchage homogène à l'air et tamisage à 4 mm du sol (Annexe B-1). Le matériel végétal, les cailloux et la faune visible ont été repérés et éliminés à la main avant l'homogénéisation et le séchage à l'air. L'humidité est ainsi passée de 18 % de teneur en eau massique environ à 8 %. Les sols ainsi homogénéisés ont alors été répartis par quantité de 11.1 kg et 10.5 kg de sol sec par casier lysimétrique de 20 L, pour les sols NA et CC respectivement (humidités différentes) dans des mésocosmes de dimension 390x315x175 mm. Le chargement légèrement différent entre sol NA et CC s'explique par la différence d'humidité résiduelle des deux sols. Ces casiers de sols ont ensuite été incubés entre ouvert à 20°C, et dans l'obscurité pour permettre la circulation de l'air dans une chambre thermostatée (Figure III–2) avec circulation d'air.

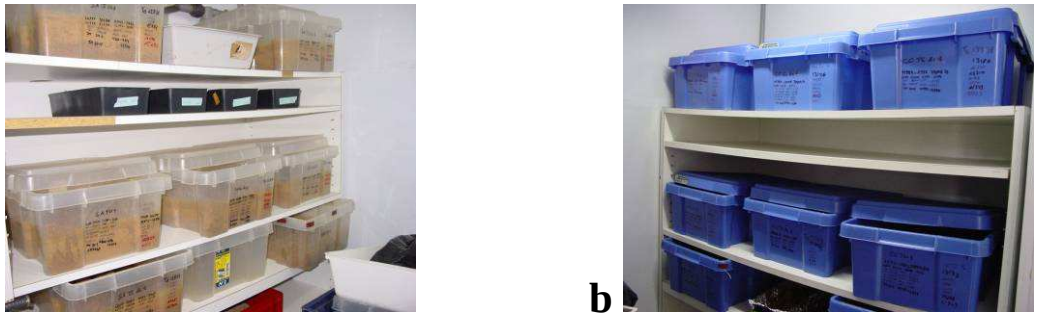


Figure III–2 Photos des mésocosmes de laboratoire du sol contrôle (NA) (a) et du sol amendé en compost de conifère (CC) (b) dans la chambre d'incubation du LTHE.

III-2-1-3 Suivi de l'humidité des sols au cours de l'incubation

L'humidité des sols a été maintenue au cours du temps entre 50 et 80 % de la capacité au champ (CAC). L'ajout d'eau a été effectué sous forme de pluie à la surface des mésocosmes de laboratoire. Ceci correspond à une variation d'humidité massique comprise entre 0,15 et 0.21 pour le sol NA, et entre 0.20 et 0.28 pour le sol CC. Un suivi hebdomadaire de la teneur en eau des mésocosmes situées dans la chambre d'incubation est effectué par pesée (variation de la masse de sol).

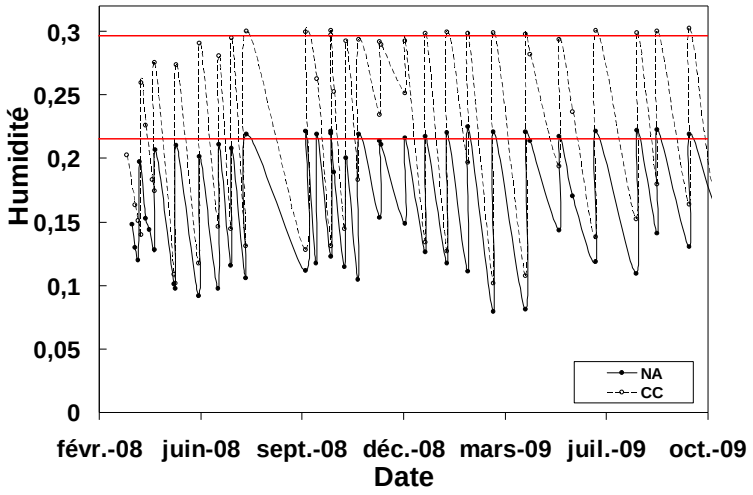


Figure III–3 Suivi de l'évolution de l'humidité massique des sols contrôle (NA) (plein) et amendé (CC) (vide) au cours des deux ans d'incubation. Les lignes horizontales (rouge) représentent les valeurs maximales d'humidité dans les NA et CC, c'est-à-dire environ 21 % et 28 % de teneur en eau massique respectivement (i.e. 80 % CAC de chaque sol).

La mesure de l'humidité massique des sols incubés a été effectuée bimensuellement par l'évolution de l'humidité relative du sol. Pour obtenir une humidité homogène dans les mésocosmes d'incubation, les sols ont été mélangés tous les mois avant l'humidification, pour ne pas favoriser la mise en place d'un gradient d'humidité dans les mésocosmes. La mise en place de cycle humectation dessiccation bimensuelle a été observée (Figure III–3). Les cycles ont une amplitude de 10 % de variation d'humidité.

III-2-1-4 Contamination des sols au cuivre et incubation

Les sols ont été contaminés par apport de 240 $mg_{Cu}.kg^{-1}_{ss}$ effectué en une fois (contamination aigue, Cu) ou en 4 fois espacés de 6mois (contamination chronique, CuCh : 4x60 ppm). Ces deux conditions de contamination ont été comparées à des conditions témoins (H_2O) où la solution de Cu a été remplacée par de l'eau. La procédure de contamination a été la même pour les trois conditions (Annexe B-2). Le sol de chaque casier est déposé en une couche fine (2cm) homogène et délimité sur une bâche. Le volume de solution à ajouter à chaque sol est déterminé de telle manière à obtenir une teneur en eau finale correspondant à 80 % de la capacité au champ du sol. La contamination des sols au sulfate de cuivre est effectuée par vaporisation directe sur le sol avec un vaporisateur de jardin. Le sol est alors mélangé à la main pour homogénéiser au mieux la contamination du sol. La contamination est apportée sous forme de sulfate de cuivre ($CuSO_4.\ 5H_2O$) pour simuler l'apport de bouillie bordelaise sur le sol viticole. La contamination chronique au cuivre a été effectuée tous les 6 mois de la même manière pour simuler les apports successifs de cuivre sur la parcelle et atteindre une contamination finale de 240 ppm identique à la contamination aigue. Les sols non contaminés ont simplement été humidifiés avec de l'eau déminéralisée non stérile. Les contaminations ont été réalisées sur les deux conditions d'amendements étudiés. La nomenclature suivante a été utilisée tout au long de l'étude :

- NAH_2O, CCH_2O : pour les sols témoins non contaminés
- NACu, CCCu : pour les sols contaminés à 240 $mg_{Cu}.kg^{-1}_{ss}$
- NACuCh, CCCuCh : pour les sols contaminés à 60 $mg_{Cu}.kg^{-1}_{ss}$ (4 fois consécutives).

III-2-2 Analyses chimiques

III-2-2-1 Du carbone et de l'azote organique totaux

Les concentrations en carbone et azote organique totaux du sol ont été déterminées en duplicata avec un analyseur élémentaire FlashEA1112/FLASH 2000 (LECA, Grenoble), sur des échantillons de 20 mg de sol sec, préalablement broyés finement et homogénéisés. La description de cette méthode est présentée dans le chapitre II (paragraphe II-2-4-1).

III-2-2-2 Eléments majeurs des sols

Les éléments cationiques ont été extraits et mesurés avec le même protocole qu'au Chapitre II (paragraphe II-2-4-2).

III-2-2-3 Caractérisation de la spéciation du cuivre.

III-2-2-3-1 Analyse du cuivre lié à la matrice solide

L'extraction et l'analyse en cuivre total solide (Cu_{Tot}) a été faite selon le même protocole que pour les éléments majeurs.

III-2-2-3-2 Analyse du cuivre libre et total échangeable en solution

Afin d'estimer le potentiel de remise en solution du cuivre après contamination nous avons quantifié, la concentration en cuivre échangeable au calcium en solution, qui correspond à la première étape de l'extraction séquentielle des métaux dans les sols (Shuman 1985). Des échantillons de 5 g de sol équivalent sec sont mis en suspension dans 40 mL de solution de $Ca(NO_3)_2$ à 0.14 M, et agités à 250 rpm pendant 30 min. Les suspensions de sol sont ensuite centrifugées à 9'000 g pendant 15 min., et le surnageant prélevé pour la quantification de la concentration en cuivre échangeable au Ca (Cu_{ex}). La concentration en Cu_{ex} dans les échantillons est mesurée par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES Optima 3300DV, Perkin Elmer, ISTerre, Grenoble).

III-2-2-3-3 Analyse du cuivre biodisponible pour les bactéries.

Les concentrations en cuivre biodisponible mesurées dans les échantillons de solution de sol NA et CC au cours de l'incubation ont été mesurées à l'aide d'un biocapteur bactérien (DF57-Cu15) émettant une luminescence proportionnellement à la concentration en cuivre en solution (c.f. II-2-5-3-1).

III-2-2-4 Mesure du pH du sol

Le pH des solutions de sol a été mesuré dans l'eau avec une électrode pH (Metrhom), calibrée au préalable (exemple de droite de calibration présenté en Annexe-G). Dans le cas où la force ionique est constante nous pouvons directement exprimer la loi de Nernst en fonction des concentrations en H^+ (Guine et al. 2007) :

$$E = E^o + k \cdot \log\left(H^+\right) = E^o{}' + k \cdot \log\left[H^+\right] \quad \textbf{[III-1]}$$

Avec :

- E le potentiel de l'électrode (mV),
- log[H+] la concentration en protons dont pH= -log[H+] ; (H^+) l'activité des protons.
- $E^{\circ'} = E^\circ + k \cdot \log \gamma_H$ représente le potentiel standard de l'électrode intégrant la correction du coefficient d'activité γ_H des protons.
- k le facteur de Nernst (k=2.303TR/F), ayant une valeur idéale de 59.157mV à 25°C, 1 bar, calculé par régression linéaire en titrage de calibration.

La mesure du pH des sols a été effectuée selon la norme NF ISO 10390 qui prend en compte un ratio sol : solution de 1:5.

III-2-3 Caractérisation de l'impact du cuivre sur la microflore bactérienne

L'impact de la contamination en cuivre sur la communauté microbienne des sols a été évalué de manière quantitative (énumération des bactéries cultivables totales et résistantes au cuivre) et qualitative (indice de l'évolution de la structure génétique des communautés). Un suivi temporel de l'impact a été effectué pour évaluer en partie sa résilience définie comme l'aptitude d'un sol à tolérer les perturbations dans sa structure, et à retrouver, après la disparition de ces dernières, un état comparable à la situation initiale.

III-2-3-1 Enumération bactérienne

Bien que dans les sols, les bactéries hétérotrophes cultivables ne représentent qu'environ 1 % des bactéries totales, elles présentent l'avantage d'être faciles à manipuler et peuvent servir d'indicateur d'impact et donner des informations pertinentes, notamment si on peut quantifier les bactéries résistantes au cuivre. Les micro-organismes ont été extraits des sols ou de leurs fractions pour leur énumération, par un broyage mécanique (blender) (Annexe D-1). Le sol est mis en suspension dans 50 mL d'une solution de NaCl à 0.8 % stérile. L'ensemble de la suspension de sol est placé dans un mixeur (broyeur électrique), pour être broyé pendant 2x30sec. La solution homogène est laissée à sédimenter pendant 2 minutes pour que les plus grosses particules sédimentent. La suspension de sol homogène a été diluée en série d'un facteur 10 dans une solution saline. L'énumération des bactéries hétérotrophes cultivables est réalisée par culture des bactéries hétérotrophes viables en boite de pétri sur un milieu gélosé nutritif spécifique. L'énumération des bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}) est réalisée par le dépôt de 100µL de suspension de sol jusqu'à la dilution appropriée (développement entre 30 et 200 unité formant colonies (UFC) par boite) en duplicata sur le milieu Luria-Bertani broth (LB) riche et non sélectif, ou sur un milieu sélectif YG-Cu contenant 2 $mmol.L^{-1}$ de $CuCl_2$ (filtré à 0.2 µm) pour l'énumération des bactéries hétérotrophes cultivables résistantes au cuivre (B^{Cu}). Les compositions de ces milieux sont présentées dans l'Annexe C. La solution de sol est homogénéisée sur le milieu gélosé par des billes de verres. De la cycloheximide a été ajoutée au milieu YG-Cu comme un agent antifongique à une concentration de 200 $mg.L^{-1}$. L'énumération a été menée à chaque temps d'incubation des mésocosmes de laboratoire. Les colonies bactériennes ont été comptées après une semaine d'incubation à température ambiante (20± 2°C) pour les bactéries B^{Tot} et deux semaines pour les bactéries B^{Cu}.

Les concentrations totales en bactéries hétérotrophes cultivables et les bactéries résistantes au cuivre dans les échantillons de sol sont obtenues par le calcul suivant :

$$C = \frac{n \cdot r \cdot f_d \cdot f_{d'}}{m_{ss}} \quad \textbf{[III-2]}$$

Avec : C la concentration en bactéries cultivables exprimée en unité formant des colonies ($UFC.g^{-1}_{ss}$) ; n le nombre de colonies sur la boite de Pétri ; r le ratio entre le volume de suspension déposée sur la boite de Pétri et le volume de l'échantillon ; f_d la dilution de la suspension ; $f_{d'}$ facteur de dilution liée à l'extraction des bactéries du sol ; m_{ss} la masse de sol sec de l'échantillon de sol analysé.

III-2-3-2 Identification des bactéries hétérotrophes cultivables totales et résistantes au cuivre.

Les bactéries hétérotrophes cultivables des deux sols NA et CC isolées sur les milieux de culture LB et YG-Cu aux plus fortes dilutions (population de bactéries dominantes) ont été analysées par séquençage de l'ADN ribosomique (ADNr) 16S. Les colonies bactériennes ont été prélevées à l'aide d'une oëse et mises en culture en milieu riche LB stérile sous agitation à 30°C, pendant une semaine. Cette culture sert alors à inoculer des boites de Pétri, où les cellules sont isolées par la méthode des stries d'épuisement. Les colonies bactériennes ainsi purifiées sont utilisées pour réaliser des stocks de bactéries conservées à -80°C dans une suspension de glycérol (32 % final) afin d'établir une banque de bactéries isolées des sols non fractionnés, de leurs différentes fractions et des effluents des sols étudiés pour une utilisation ultérieure.

Le gène codant l'ARNr 16S a été amplifié par une réaction de PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) directement à partir des colonies bactériennes isolées sur boite de culture. Les amorces utilisées sont 27f (5'-3' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) et 1492r (5'-3' GGTTACCTTGTTACGACTT), spécifiques d'une portion du gène 16S caractéristique des espèces bactériennes. Les conditions de l'amplification par PCR sont les suivantes : dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 minutes, puis répétition de 30 cycles d'amplification, et terminé par l'élongation finale de l'ADN à 72°C pendant 20 min. Chaque cycle d'amplification est constitué d'une étape de dénaturation (95°C, 30 sec), d'hybridation (56°C, 30 sec), et d'élongation (72°C, 45 sec). La qualité de l'amplification (produits PCR) a vérifié sur gel d'agarose (2 %), mais les produits n'ont pas été purifiés. Les échantillons d'ADN ont été envoyés pour séquençage à Génome express (Meylan, France) racheté ultérieurement par Beckman (Angleterre) à qui nous avons confiés les derniers séquençages. Les séquences obtenues ont été affiliées phylogénétiquement par comparaison à la base de données du NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) grâce à l'algorithme BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) lequel permet une comparaison de nos séquences de paires de bases avec des séquences connues. Un schéma récapitulatif de ce protocole d'identification des bactéries hétérotrophes cultivables est présenté en Annexe D-2.

III-2-3-3 Indice de diversité des communautés bactériennes.

La diversité des communautés bactériennes a été caractérisée par leur empreinte génétique déterminée par la méthode moléculaire ARISA (Automated Ribosomal (rRNA) Intergenic Spacer Analysis) (Fisher & Triplett 1999; Ranjard et al. 2000). Cette approche permet de

relier une empreinte génétique à la structure des communautés bactériennes en considérant les populations les plus représentées dans le sol. Le principe de l'analyse moléculaire par la méthode d'analyse ARISA, consiste à étudier les variations de la taille de l'espace inter-génique (IGS, InterGenic Spacer) situé entre les gènes 16S rrs et 23S rrl, chez les bactéries. Il s'agit d'une région non codante, non conservée, soumise à une forte pression mutagène et transmise lors de la reproduction et donc très polymorphe en terme de longueur (nombre de paires de base (bp), variant entre 50 et 1500pb). Ces différentes caractéristiques font de cet IGS un marqueur ubiquiste permettant de déterminer la structure génétique des communautés bactériennes.

La méthode d'empreinte génétique par ARISA se déroule en 3 étapes décrites ci-dessous :

1 La première étape de la méthode ARISA est l'extraction de l'ensemble de l'ADN présent dans l'échantillon de sol (Ranjard et al., 2003) ainsi que sa purification. L'extraction consiste en une lyse mécanique par agitation en présence de billes de plusieurs tailles et compositions (verre (4 mm), céramique (1.4 mm), et silice (0.1 mm)), ainsi qu'une lyse chimique à l'aide d'une solution tampon. Cette solution contient du SDS (détergent, 2 %) permettant la dénaturation des protéines à haute température (deux fois 30 minutes au bain marie à 70°C) La solution de lyse contient aussi de l'EDTA (100mM) permettant de chélater la majorité des cations bivalents, du NaCl (100mM) limitant la dénaturation partielle de l'ADN, et du Tris à pH 8.0 (100mM) pour tamponner la solution. Cette étape de lyse chimique est suivie d'une précipitation des complexes protéine/lipide-SDS (à 4°C) par ajout d'acétate de potassium (3M, pH 5.5). L'ADN « brut » est ensuite récupéré par précipitation à l'isopropanol et lavage à l'éthanol. Après évaporation le culot d'ADN est remis en suspension dans 100µL d'eau ultra pure stérile. L'ADN obtenue est enfin purifié, en deux phases i) par un tamis moléculaire sur colonne Microbiospin (Biorad) de PVPP (Polyvinyl polypyrrolidone) qui permet la réalisation d'un complexe avec les composés phénoliques et alcaloïdes), et ii) par rétention et lessivage de l'ADN sur une colonne d'exclusion (Kit Geneclean Turbo, MPBio). Cette phase est limitante dans l'analyse de la structure génétique des communautés bactériennes du sol. Au terme de cette étape, l'ADN est quantifié sur gel d'agarose à 1 % à l'aide d'une gamme étalon d'ADN de thymus de veau (Biorad).

2 La deuxième étape consiste à amplifier la région IGS des bactéries par une réaction de PCR à l'aide d'une polymérase thermostable et des amorces universelles 1522F (5'-3' TC GGG CTG GAT GAC CTC CTT) et 132R (5'-3' CCG GGT TTC CCC ATT CGG) pour cibler l'ensemble des taxons présents au sein de l'échantillon, permettant une réplication spécifique. Les amorces sont couplées avec un fluorochrome IRD800 pour permettre la détection des portions amplifiées par le séquenceur Licor (4300DNA analyseur, UMR MSE, INRA Dion). La purification de l'ADN est déterminante dans l'obtention d'un échantillon amplifiable par les techniques moléculaires usuelles (Réaction de Polymérisation en Chaîne, PCR). En effet les impuretés présentes dans les échantillons limiteront fortement l'activité de l'enzyme utilisé pour l'amplification de l'ADN. Après amplification l'ADN produit par PCR est aussi purifié en utilisant le Kit MinElute (QUIAGEN). La quantification de ces produits PCR purifiés est réalisée sur gel d'agarose 2 %. Cette étape d'amplification permet d'obtenir une quantité d'ADN représentant l'ensemble des IGS bactériens de l'échantillon de départ et qui représente la variabilité de l'ADN bactérien en termes de groupes d'IGS.

3 La troisième étape consiste à séparer l'ensemble des fragments d'ADN ayant des IGS de longueur spécifique aux espèces bactériennes, par une migration électrophorétique à

haute résolution. 2µl de produit PCR contenant la quantité d'ADN voulue sont ajoutés à une solution stop IR² (Sciencetec) contenant du formamide. L'ADN est dénaturé par chauffage à 90°C pendant 2 min. puis stocké dans la glace afin d'augmenter l'accessibilité du fluorochrome (IRD800) à la détection par le laser du Licor. Les échantillons sont déposés dans un gel de polyacrylamide à 3.7 % sur le séquenceur Licor. La migration des fragments d'ADN est plus ou moins rapide selon leur conformation et leur nombre de paires de bases (pb). Les données de fluorescence sont converties à l'aide du logiciel 1D-Scan (ScienceTec) dans un éléctrophorégramme, sous forme de spectre représentant la diversité bactérienne, où chaque pic du spectre est sensé correspondre à un type unique de bactérie. La hauteur de chaque pic a été calculée en conjonction avec l'option de filtre médian et de l'intégration de pic sous la forme Gaussienne, indiquant la proportion relative du fragment dans le produit total. La longueur des fragments (en nombre de paires de bases) a été calculée en utilisant un standard de taille, (ladder licor) préparé à l'aide de plusieurs produits PCR purifiés, de différentes tailles connues, situées entre 200 et 1659pb. La diversité bactérienne considérée ici correspond à celle de groupes d'espèces bactériennes ayant des IGS de longueur identique. Pour chaque profil de diversité, chaque bande correspond à un groupe d'espèces bactériennes ayant la même longueur d'IGS. L'ensemble des bandes caractérisant un échantillon constitue donc son empreinte moléculaire. Pour chaque échantillon, le seuil de détection est fixé entre 100 et 110 bandes, avec pour chacune d'elle l'enregistrement de son intensité calculée sous forme d'une gaussienne. Les autres bandes ne sont pas enregistrées, pour limiter le bruit de fond lié au gel, à l'appareillage, et aux espèces bactériennes très minoritaires (faibles quantités d'ADN).

Les données obtenues sont regroupées et résumées dans une table indiquant la présence de bandes (pic correspondant à un nombre de pb) et une intensité (aire Gaussienne du pic) en utilisant le programme PrepRISA (Ranjard & Richaume 2001), regroupant les échantillons. 100 bandes ont été intégrées pour chaque profil de B-ARISA avec une résolution de 2pb pour s'assurer une analyse robuste (Ranjard et al. 2003). La résolution de la méthode étant de 2pb, les groupes d'espèces bactériennes peuvent contenir 2 à 3 espèces différentes. Les données sont ensuite analysées sous forme d'Analyse en Composantes Principales (ACP), accomplie sur une matrice de covariance des échantillons à l'aide du logiciel R. A la suite de cette ACP, le taux de variation des communautés bactérienne entre différentes conditions de traitements du sol est déterminé pour chaque couple d'échantillons par la distance euclidienne notée DE entre les barycentres des différents échantillons, par l'équation suivante :

$$DE = DE_{\mathrm{int}(i,j)} - \frac{DE_{\mathrm{int}(i)} + DE_{\mathrm{int}(j)}}{2} \qquad \textbf{[III-3]}$$

Avec : $DE_{\mathrm{int}(i,j)}$ la distance euclidienne normalisée entre les barycentres des échantillons i et j, $DE_{\mathrm{int}(i)}$ et $DE_{\mathrm{int}(j)}$ la distance euclidienne entre les réplicats au sein des échantillons i et j respectivement, c'est-à-dire la distance moyenne de chaque réplicat par rapport au barycentre.

La discrimination significative de l'ensemble de ces résultats a été évaluée par un test de MonteCarlo avec 1000 permutations et une valeur de p estimée inférieure à 0.05. Un schéma récapitulatif de cette méthode est présenté en Annexe D-3.

III-3 Résultats et discussion

III-3-1 Dynamique du pH

Les valeurs de pH_w des solutions des échantillons de sols non amendé (NA) et amendé (CC) en MO de la parcelle viticole de Clessé au cours du temps sont présentées dans le Tableau III-1. Les mesures de pH annuelles sur la parcelle viticole n'ont pas marqué d'évolution significative de celui-ci pour les deux sols.

Tableau III-1 Evolution du pH_w des solutions des sols contrôle (NA) et amendé en en compost de conifère (CC) prélevé annuellement sur la parcelle viticole

Sols	Temps (mois)		
	0	12	24
Contrôle Non Amendé (NA)	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.1 ± 0.1
Amendé en Compost de Conifère (CC)	7.3 ± 0.3	7.3 ±0.3	7.2 ± 0.1

Les valeurs de pH_w des solutions des sols NA et CC contaminés (Cu) ou non (témoin eau H_2O) ont été mesurées dans l'eau déminéralisée à un ratio sol/eau de 1:5, au cours de l'incubation, sont présentés dans la Figure III–4. On observe que l'amendement organique du sol n'a pas modifié significativement le pH_w du sol dans l'eau quelque soit la concentration en cuivre. Le pH du sol étudié à l'incubation est de 7.2 et 7.3 respectivement pour le sol NA et CC dans les conditions non contaminés. L'ajout de cuivre dans les 2 sols entraîne une diminution de pH_w de l'ordre de 0.5 unités pH (30 % en plus d'ion H^+) jusqu'à des valeurs de 6.85 (NACu) et 6.8 (CCCu). Le pH des sols non contaminés diminue légèrement au cours de l'incubation. Le pH des sols contaminés reste tout au long de l'incubation plus acide que celui des sols non contaminés mais les valeurs se rapprochent au bout des deux ans. De nombreuses études (Arias-Estévez et al. 2007; Madejon et al. 2009; Bolan et al. 2010) ont montré que l'ajout d'éléments en trace métalliques aux sols diminue le pH du sol. Naturellement, des protons de surface sont libérés quand des ions Cu^{2+} sont ajoutés, complexant ainsi des sites de surface initialement protonés. La diminution constatée au cours de l'incubation est éventuellement en lien avec la respiration des microorganismes (dégagement de CO_2) qui est un processus acidifiant les sols.

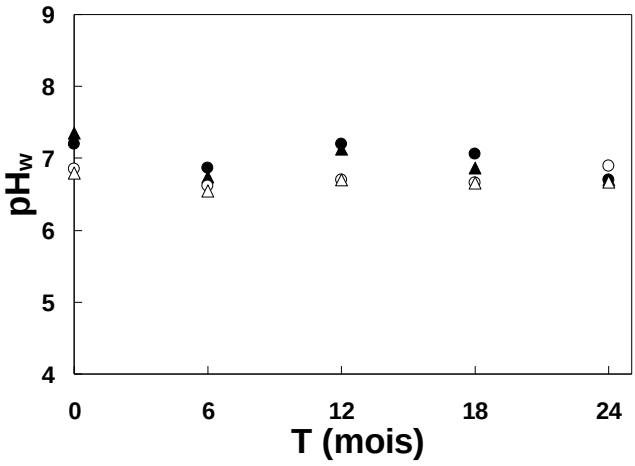


Figure III–4 Evolution du pH_w de la solution des sols contrôle NA (O) et amendé en CC (Δ), incubés en laboratoire, contaminé (blanc) ou non (noir) en cuivre à 240 ppm.

Dans les sols à contamination chronique (4 x 60 ppm), le pH diminue régulièrement après chaque ajout de cuivre (Figure III–5). Mais entre chaque temps d'incubation, le pH des sols se stabilise, observé par une légère remontée de la valeur pH après 6 mois d'incubation. Une diminution plus marquée est enregistrée après 24 mois. Bien que l'on constate une évolution du pH celle-ci est faible et reste dans une unité pH entre T0 et T2 ans.

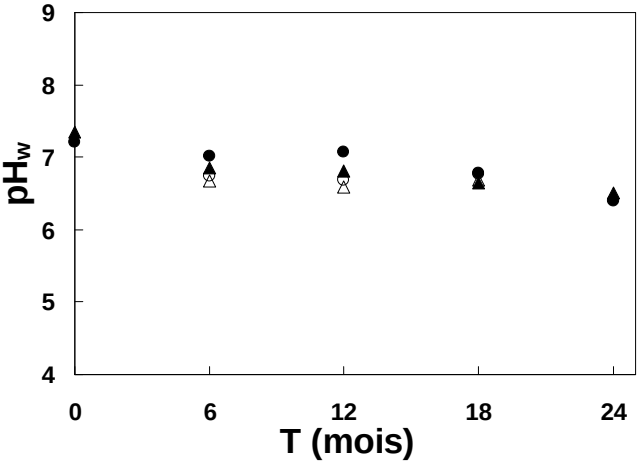


Figure III–5 Evolution du pH_w des sols contrôle NA (o) et amendé en CC (Δ) incubés en laboratoire avant (vide) et après (plein) la contamination avec des doses de cuivre à 60 ppm tous les 6 mois.

III-3-2 Composition chimique élémentaire des sols NA et CC

Les concentrations des éléments cationiques 'majeurs' des sols sont reportées dans le Tableau III-2.

Les concentrations en éléments majeurs dans les deux sols sont très similaires. Ce résultat était attendu dans la mesure que les sols CC et NA sont de même origine et ne divergent en principe que par l'apport de l'amendement organique qui représente 1.5 % de la masse totale du sol. Le sol de Clessé est riche en Fe et Al de l'ordre de 26 et 16 $mg.g^{-1}_{ss}$ respectivement pour les deux éléments. Les concentrations en Mg et K sont d'environ 2 $mg.g^{-1}_{ss}$, le Ca présente une concentration légèrement supérieure de 3 et 4 $mg.g^{-1}_{ss}$ pour les sols NA et CC. Les concentrations en Mn et Na sont relativement faibles par rapport aux autres éléments. Ces

résultats montrent que l'amendement organique ne modifie pas de façon importante la composition chimique du sol en termes d'éléments majeurs (comme déjà observé dans le chapitre II).

Tableau III-2 Concentration en éléments majeurs ($mg.g^{-1}_{ss}$) dans la matrice du sol contrôle et amendé en compost de conifère.

Sol de Clessé	Concentration en élément ($mg.g^{-1}_{ss}$)						
	Fe	**Mn**	**Al**	**Ca**	**Mg**	**K**	**Na**
Contrôle (NA)	26.2	0.7	17.7	3.2	2.6	2.3	0.03
Amendé en Compost de Conifère (CC)	27.5	0.6	15.8	4.1	2.3	1.9	0.02

III-3-3 Dynamique du carbone organique

III-3-3-1 Evolution de la matière organique sur la parcelle viticole

Le site viticole de Clessé a été amendé en différentes matières organiques ou enherbés (ENM, trèfle) depuis plus de 20 ans. La Figure III–6 présente l'évolution de la concentration en Carbone Organique Total (COT) *in situ* depuis l'arrêt des amendements en matière organique en 2003 (Sebastia 2007; Lejon et al. 2008). Les résultats observés montrent que la concentration en COT dans le sol amendé en compost (CC) diminue assez rapidement depuis la fin de l'amendement, pour se rapprocher en 2011 de la concentration en COT du sol NA. Le taux de dégradation du carbone du sol est constant dans le temps et peut être représenté par une équation linéaire. Cette diminution correspond à un taux global de dégradation en COT de MO du sol d'environ 5.6 $\mu g_C\ g^{-1}_{ss}\ j^{-1}$ entre octobre 2003 (fin de l'amendement) et mars 2011 (dernier prélèvement *in situ*). Le sol non amendé (NA) semble à l'équilibre en terme de turn-over du C, puisque la Figure III–6 ne montre pas de variation significative du COT depuis 2003. La légère tendance à l'augmentation du COT de ce sol pourrait s'expliquer par l'arrêt du désherbage annuel dans ces blocs. Les concentrations en COT dans ces deux sols tendent donc à se rapprocher bien qu'on s'attende à des natures de MO très différentes à cause de leur origine différente. En effet, contrairement au sol NA qui n'a pas été amendé pendant plus de 20 ans, le sol CC a été progressivement enrichi en MO exogène plutôt récalcitrante (de type résineux). Après l'arrêt des apports en MO, la teneur en COT dans le sol NA reste quasiment stable dans le temps. Ce résultat nous indique que les apports naturels en MO (feuille, sarment de vigne) sont proportionnels à la MO minéralisée, et peuvent être considérés comme négligeables en terme de quantité de carbone. De ce fait, la diminution du COT dans le sol CC est principalement conduite par la dégradation de la MO issue du compost de conifère. Ainsi, le taux mesuré sur la parcelle peut être considéré comme un taux 'net' de dégradation sans apport extérieur.

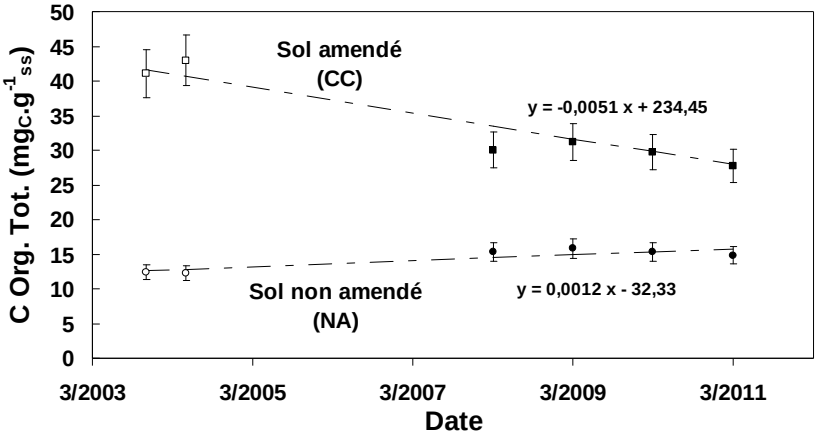


Figure III–6 Evolution in situ de la concentration ($mg.g_{ss}^{-1}$) en carbone organique total (COT) dans le sol de Clessé (0-5 cm) non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC) après l'arrêt de l'apport en matière organique jusqu'à aujourd'hui. Les points en blanc sont issus de la littérature (Sebastia 2007; Lejon et al. 2008)

Les effets à long terme de l'apport de matière organique exogène au champ sur les caractéristiques physicochimiques des sols sont bien documentés (Tisdall & Oades 1982; Oades 1988; Six et al. 2000; John et al. 2005; Li et al. 2008; Abiven et al. 2009; Lugato et al. 2010; Grosbellet et al. 2011). Ces études montrent qu'une augmentation du taux de C et de N mais aussi en nutriment du sol, modifie les paramètres biogéochimiques du sol, mais aussi sa structure spatiale, ou la structure génétiques des communautés bactériennes de son compartiment microbien (Tisdall & Oades 1982; Ranjard et al. 1997; Lejon et al. 2008; Abiven et al. 2009). Cependant, l'évolution de cette MO après l'arrêt des amendements n'est pas bien connue. Pourtant, des paramètres potentiellement évolutifs tels que la quantité, la composition et la structure et la réactivité du carbone contenu dans le sol affectent certainement l'impact d'une pollution au cuivre.

III-3-3-2 Evolution de la matière organique en conditions d'incubation en laboratoire.

L'évolution des teneurs en COT des sols dans les mésocosmes de laboratoire a été suivie tout au long de l'incubation (2 ans) sous conditions contrôlées. Les résultats de l'évolution sur deux ans d'incubation de la concentration en COT sont présentés sur la Figure III–7. Le sol amendé en compost de conifère (CC) présente une teneur en COT total 2 fois plus élevée que le sol NA, et cette différence diminue au cours de l'incubation. Le sol NA ne montre pas d'évolution significative de la teneur en COT au cours des 2 ans d'incubation, ce qui indique une stabilité de la MO de ce sol. Au contraire, dans le sol amendé (CC), on observe une rapide diminution du COT qui passe de 30 à 22.6 mg C g_{ss}^{-1} (-25 %). Le taux de dégradation de la MO au cours de l'incubation est alors de 10.9 $\mu g_C\ g^{-1}\ j^{-1}$, ce qui est deux fois plus élevé que le taux mesuré sur la parcelle (5.1 $\mu g_C\ g^{-1}\ j^{-1}$). La mise en place d'un système contrôlé (en T°C, teneur en eau) sans apport de matière organique met en évidence une augmentation de la dégradation du C organique de sol, et donc l'augmentation de la minéralisation du C dans ce sol.

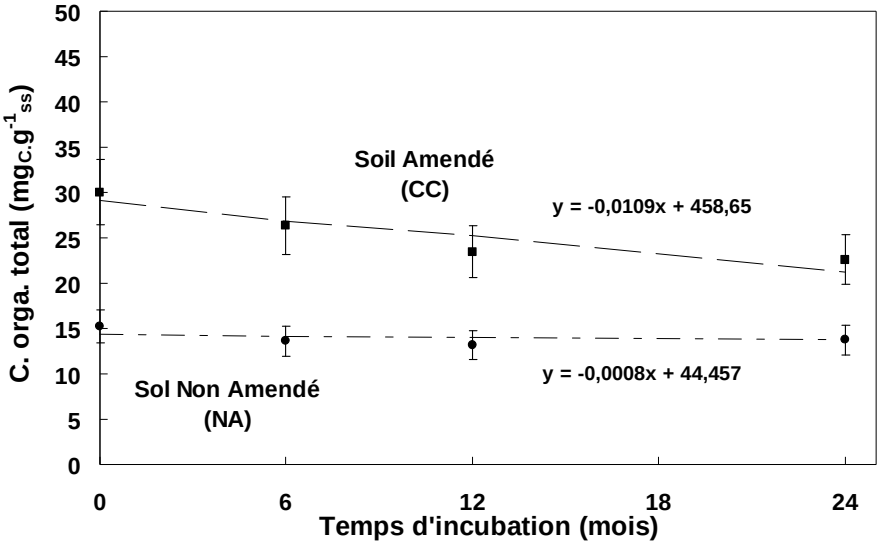


Figure III–7 Evolution de la concentration en carbone organique totale (COT) dans le sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC) dans les mésocosmes de laboratoire pendant les 24 mois d'incubation dans des conditions climatiques contrôlés.

De nombreuses études ont montré que la matière organique joue un rôle majeur dans la rétention des ETM, c'est pourquoi après avoir regardé l'évolution de la MO dans les deux conditions de sol étudiées nous nous sommes intéressés à son rôle sur la spéciation du cuivre. En effet, l'amendement du sol de Clessé en compost de conifère pendant environ 20 ans a induit une augmentation de plus du double de sa teneur en carbone organique. L'amendement en compost a également induit une modification profonde de la structure de la communauté microbienne correspondant à une adaptation à la transformation de composés organiques nouveaux issus de la biomasse de résineux apportée (Lejon et al. 2008).

III-3-4 Dynamique de la spéciation en cuivre dans le sol.

L'apport d'une contamination au cuivre sur ces deux sols aura donc sans doute un effet différencié en relation à la fois avec la différence de réactivité de la MO présente et avec la différence de structure des communautés bactériennes, c'est ce que nous avons cherché à évaluer.

III-3-4-1 Analyse de la concentration totale en cuivre dans le sol de Clessé.

III-3-4-1-1 Evolution de la concentration en cuivre sur la parcelle viticole de Clessé

L'évolution de la concentration en cuivre *in situ* durant le même temps d'incubation que les mésocosmes de laboratoire (24mois) a été suivie pour les deux sols (NA et CC). Les résultats de la concentration en cuivre total dans la matrice de sol sont présentés dans le Tableau III-3. La parcelle viticole de Clessé est traitée annuellement par plusieurs pesticides qui sont du Cursor (contient 25 %de Cu), du Trimiltox (contient 21.5 % de Cu) et de la bouillie bordelaise (CuSO4. $Ca(OH)_2$). La concentration en cuivre moyenne entre les

différentes sous parcelles d'un même amendement est de 71 et 84 $mg_{Cu}.kg^{-1}_{ss}$ pour les sols NA et CC respectivement en 2008. Les [Cu_{Tot}] sont restées relativement stables au cours du temps. Ces traitements agricoles modifient très peu la concentration en cuivre total sur la parcelle.

Tableau III-3 Evolution de la concentration en cuivre total (liée à la matrice solide) ($mg.kg^{-1}_{ss}$) *in situ* pour les sols contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC). La concentration en cuivre représente la concentration moyenne de 4 réplicats pour chaque sous parcelle des deux sols (NA et CC).

Sol	Temps (mois)		
	0	12	24
Contrôle (NA)	71±6	122±7	81±9
Amendé en compost de conifère (CC)	84±21	108±4	78±2

III-3-4-1-2 Concentration en cuivre total dans les mésocosmes de laboratoire

Les [Cu_{Tot}] dans les mésocosmes de laboratoire sont présentées dans le Tableau III-4. La concentration dans les sols non contaminés (+H_2O) sont de 71 et 84 $mgCu.kg^{-1}_{ss}$ dans le sol contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC) respectivement, identique à celle de la parcelle. Ces concentrations correspondent au fond géochimique du sol ainsi qu'au cuivre ajouté sur le site, apporté annuellement par le viticulteur. On nommera cette concentration la concentration 'native' en cuivre dans le sol. On note ici que l'apport de matière organique ne modifie pas significativement la concentration en cuivre total.

Dans les sols contaminés en cuivre (+Cu), à forte dose (240 ppm), les [Cu_{Tot}] mesurées sont de 329 et 324 ppm et représentent bien la somme entre l'apport aiguë de cuivre en laboratoire et la concentration initiale des sols. Bien que cette teneur en cuivre soit élevée par rapport aux apports annuels *in situ*, les concentrations en cuivre étudiées sont du même ordre de grandeur que celles observées sur un grand nombre de sites viticoles (Komárek et al. 2010).

Tableau III-4 Concentrations moyennes en cuivre lié à la matrice solide ($mg.kg^{-1}_{ss}$) dans le sol des mésocosmes de laboratoire incubés après une contamination aiguë (240 ppm) et après chaque contamination chronique (60 ppm) avec une solution de $CuSO_4$.

Sol	Dose de cuivre ajouté ($mg.kg^{-1}_{ss}$)					
	Témoin	Conta. aigue	Contamination Chronique			
	+H_2O	+240	+60	+120	+180	+240
Contrôle	71 ±6	329 ± 27	141 ±11	193 ±14	291 ±61	325 ±10
Compost de conifère	84 ±21	324 ± 41	166 ±35	196 ±5	259 ±11	312 ±20

Les [Cu_{Tot}] dans le sol de Clessé sont restées constantes au cours de l'incubation. Ce résultat était attendu. Les mésocosmes d'incubation étant fermés (par le fond), il n'y a pas eu de transfert de constituants porteurs de cuivre vers l'extérieur. Bien que les [Cu_{Tot}] n'évoluent pas dans les sols (NA et CC) incubés, plusieurs études (Arias et al. 2004; Arias-Estévez et al. 2007; Lejon et al. 2008) ont montré qu'il existe néanmoins une variabilité de la concentration en cuivre entre les phases porteuses solides en fonction du type de sol et du temps, mais pas de la concentration totale.

Pour une approche plus réaliste des apports annuels en cuivre sur les parcelles viticoles, nous avons voulu tester l'effet d'un apport de cuivre avec une dose finale identique à la dose aiguë précédente, soit 240 ppm apportés en 4 fois (60 ppm) à 6 mois d'intervalle. Le Tableau III-4 présente les concentrations totales en cuivre mesurées après chaque apport chronique de cuivre (60 ppm). Pour les deux sols, la concentration en cuivre total mesurée correspond bien à la somme de la teneur initiale (fond géochimique plus les apports par l'agriculteur) plus la dose ajoutée en laboratoire. Après 18 mois d'incubation, on obtient une concentration totale en cuivre proche de celle apportée en une seule dose à T0 dans les sols NA et CC pour la contamination à forte dose. Cette contamination chronique du sol a été établie pour évaluer l'effet d'un apport faible mais répété de cuivre.

III-3-4-2 Dynamique temporelle de la teneur en cuivre échangeable au calcium pour le sol de Clessé

III-3-4-2-1 Dans les sols à contamination aiguë

Les concentrations en cuivre échangeable [Cu_{ex}] dans les sols contaminés à forte dose et non contaminés sont présentées dans la Figure III–8. Elles sont faibles et représentent moins de 1 % du cuivre total du sol. Ces résultats sont en accord avec des études récentes (Fernández-Calviño et al., 2008b ; Lejon et al., 2008), qui ont montré que la concentration en cuivre liée à la matrice solide représente plus de 99 % de la concentration en cuivre total du sol. Ceci montre une très forte complexation du cuivre avec les phases organiques et inorganiques porteuses du cuivre. La Figure III–8 montre aussi des teneurs en Cu_{ex} plus élevées dans les sols contaminés (NACu et CCCu) que dans les sols non contaminés ($+H_2O$), tout au long de l'incubation, ce qui semble assez logique, et indique que le cuivre natif a eu le temps de se stabiliser.

La concentration en cuivre échangeable est liée à la concentration en cuivre dans le sol, mais aussi à la teneur en matière organique dans le sol. Immédiatement après la contamination, le sol NA présente une concentration en Cu_{ex} de 400 $\mu g.L^{-1}$ et le sol CC de 250 $\mu g.L^{-1}$. On remarque donc que le cuivre est près de 2 fois plus facilement mobilisable dans le sol NA que CC. Ce résultat indique un effet de l'amendement organique du sol sur les processus de rétention du cuivre dès son ajout au sol. L'amendement organique du sol de Clessé a induit une forte augmentation de la rétention du cuivre et donc une diminution de la concentration en cuivre échangeable au Ca en accord avec d'autres études (Arias-Estévez et al. 2007; Kumpiene et al. 2007; Madejon et al. 2009). Dans le sol CC, davantage de cuivre est fixé sur des sites réactifs forts de la matière organique diminuant ainsi les quantités de cuivre retenues sur les sites échangeables, lesquels sont présents en plus grande quantité que dans le sol NA.

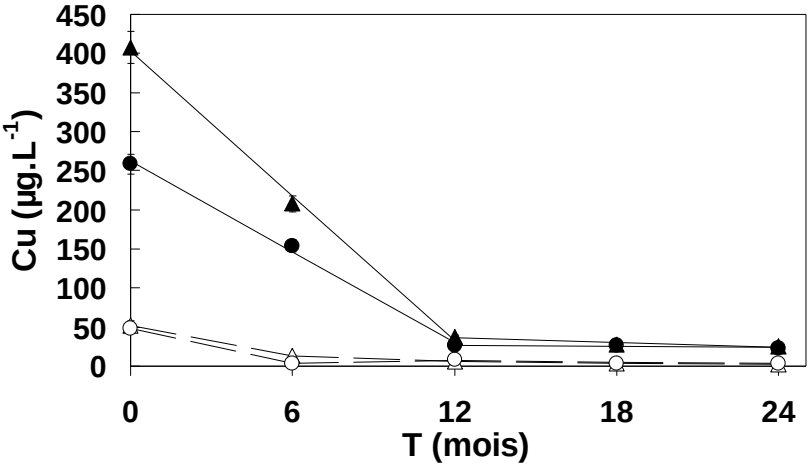


Figure III–8 Evolution temporelle de la concentration en cuivre échangeable total au calcium dans les sols non amendés (Δ) et amendés en compost de conifère (o) contaminés à 240 ppm de cuivre (noir) ou non (blanc).

La Figure III–8 montre que la concentration en cuivre échangeable diminue au cours de l'incubation, quelque soit le traitement des sols en Cu et en MO. Les concentrations en Cu_{ex} étant plus faibles dans les sols non contaminés, on observe seulement une faible diminution de ces concentrations au cours de l'incubation. Les résultats de l'évolution de la [Cu_{ex}] des sols non contaminés peuvent être considérés comme représentatifs du comportement de cuivre ayant subi un vieillissement dans le sol. Au contraire dans les sols contaminés, durant la première année d'incubation, la [Cu_{ex}] diminue 'linéairement' avec un taux de 30.9 $\mu g_{Cu}\ L^{-1}$ $mois^{-1}$ et de 19.3 $\mu g_{Cu}\ L^{-1}$ $mois^{-1}$ pour le sol NA et le sol CC respectivement. Cette décroissance du cuivre échangeable au cours de l'incubation a déjà été observée dans d'autres études (Arias-Estévez et al. 2007; Kumpiene et al. 2007; Madejon et al. 2009), utilisant une solution de $CaCl_2$ pour échanger le Cu, le Cd, et le Zn. La concentration des ions métalliques en solution est alors influencée par la nature des ligands organiques et inorganiques ainsi que par le facteur pH, qui est connu pour gouverner les processus de sorption (Bolan et al. 2010).

Cette forte diminution est suivie au cours de la deuxième année d'incubation des sols d'une diminution plus faible de la [Cu_{ex}] à un niveau proche de celui mesuré avant la contamination (témoins H_2O) soit 0.3 et 0.33 $\mu g\ L^{-1}$ $mois^{-1}$ pour les sols NA et CC, respectivement. Les concentrations restent toutefois plus élevées dans les sols contaminés que dans les sols non contaminés. Ainsi le « vieillissement » observé de la contamination au cuivre suggère un transfert du cuivre échangeable vers des phases porteuses capables de retenir plus fortement le cuivre comme cela a été suggéré par Lejon et al. (2008) dans une étude court terme en microcosmes. La Figure III–9 présente les mêmes résultats que la Figure III–8, dont les [Cu_{ex}] sont exprimées avec une échelle logarithmique. Ces résultats nous permettent de mieux analyser l'évolution de la concentration en cuivre sur le long terme. Pour la deuxième année, on observe une diminution continuelle et similaire des [Cu_{ex}] que le sol soit contaminés (+Cu) ou non (+H_2O) en cuivre, mais avec un facteur 10 entre les [Cu_{ex}] des sols contaminés et non contaminés qui est stable dans le temps. Ce résultat suggère qu'une fois vieilli, le sol échange toujours de la même façon le cuivre, mais indépendamment de la concentration totale en cuivre dans le sol.

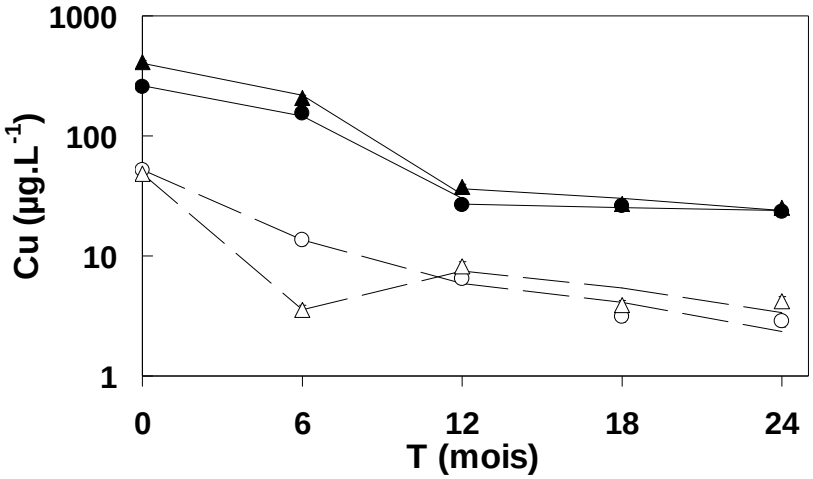


Figure III–9 Evolution temporelle de la concentration en cuivre échangeable totale au calcium dans les sols non amendé, NA (Δ) et amendé en compost de conifère, CC (o) contaminés à 240 ppm de cuivre (symbole plein) ou non (symbole vide).contaminés représenté en échelle logarithmique.

Globalement le « vieillissement » observé de la contamination au cuivre montre que le cuivre est de plus en plus fortement retenu sur le substrat solide. Cela suggère qu'il y a sans doute une migration du cuivre échangeable vers des phases porteuses capables de retenir plus fortement le cuivre solide comme cela a été suggéré par Lejon et al. (2008). De façon similaire, Arias-Estévez et al. (2007) ont suggéré à l'issue de leur étude que le vieillissement d'une contamination au cuivre peut s'expliquer par le transfert du cuivre depuis des sites d'échange cationique de faible énergie vers des sites de liaisons plus forts. Pietrzak & Mcphail (2004) sont aussi arrivés à la conclusion que le cuivre 'actif' (libre, échangeable et adsorbé) dans les sols vieillis est immobile et ne change pas de phase au cours du temps caractérisée par des mesures d'extraction séquentielle. Cette analyse rejoint nos résultats dans la mesure où nos sols témoins (H_2O) présentent des [Cu_{ex}] très faibles. Dans les sols contaminés, les [Cu_{ex}] élevées permettent le transfert de quantités substantielles de cuivre entre phases porteuses, mais ce potentiel diminue avec la diminution de [Cu_{ex}] au cours du vieillissement de la contamination. La concentration en cuivre échangeable semble donc représenter un facteur clef de la distribution du cuivre entre les phases porteuses.

III-3-4-2-2 Contamination chronique au cuivre.

L'évolution des concentrations totales en cuivre échangeable dans les sols NA et CC qui ont reçu une dose de cuivre de 240 ppm répartie en quatre apports sur 2 ans est présentée dans la Figure III–10. Les concentrations ont été mesurées avant et après l'ajout de cuivre. Les mesures à T0 indiquent que la concentration en cuivre échangeable dans les sols NA et CC juste après la première contamination est maximale mais largement inférieure à la concentration mesurée lors de la contamination du cuivre à forte dose (Figure III–10). Juste après la contamination, dans le sol CC, l'ajout de 60 ppm de cuivre ne modifie pas particulièrement la concentration en cuivre échangeable par rapport aux sols non contaminés (Figure III–10), au contraire du sol NA où l'ajout de cuivre même à faible dose induit une augmentation de la [Cu_{ex}]. On observe donc une forte rétention du cuivre par la MO ajouté au sol, même à faible dose de cuivre ajouté.

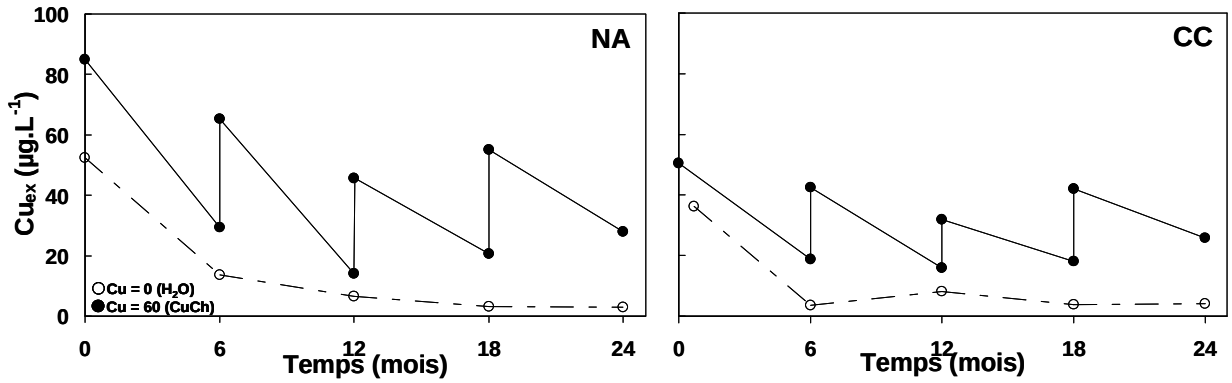


Figure III–10 Evolution de la concentration en cuivre échangeable au calcium, [Cu_{ex}], dans le sol de Clessé non contaminé (H_2O) ou contaminé à 240 ppm de cuivre apporté en une fois à T0 ou en 4 fois (60 ppm, CuCh) à T0, T6, T12, et T18.

Tout d'abord, on remarque une évolution en dent de scie de la concentration en cuivre échangeable [Cu_{ex}] similaire pour les sols NA et CC. Après chaque contamination au cuivre (60 ppm), la [Cu_{ex}] augmente, puis diminue. Sur ce point, cette observation rejoint celle effectuée pour les sols à contamination aiguë (240 ppm). Après la deuxième contamination, on n'observe pas d'évolution significative du ratio entre la concentration en cuivre échangeable mesurée avant et après contamination à 60 ppm. Ce ratio est de 2.2, 3.2, et 2.6 pour le sol NA et de 2.2, 2.0, et 2.3 pour le sol CC à T6, T12 et T18mois. On peut donc calculer un ratio moyen de 2.6 ± 0.5 et 2.2 ± 0.2 pour les sols NA et CC, respectivement. A chaque temps d'incubation la concentration en cuivre échangeable est plus importante dans le sol NA que dans le sol CC. Pour des faibles doses de Cu, on observe aussi cet effet de l'apport de matière organique (amendement organique uniquement dans le CC) sur la rétention du cuivre. Globalement, les [Cu_{ex}] sont toujours inférieurs à la [Cu_{ex}] à T0, et diminuent au cours de l'incubation. On observe donc une cinétique de réduction des [Cu_{ex}] sur les sols « chroniques ». Après 24 mois d'incubation les concentrations totales en cuivre [Cu_{Tot}] des sols « chroniques » sont similaires à celles des sols à apport unique en cuivre (240 ppm). A ce temps, on observe dans les sols NA et CC, une concentration [Cu_{ex}] semblable d'environ 26 $\mu g.L^{-1}$ et très proche des concentrations mesurées à T24m dans les sols à contamination aiguë (240 ppm).

Pour les deux sols, les concentrations en cuivre échangeable pour un ajout de 60 ppm de cuivre sont similaires quelques soit la teneur en cuivre total du sol. Le niveau d'équilibre de la [Cu_{ex}] semble indépendant de la concentration totale de cuivre dans le sol. Par contre l'impact sur les organismes sera probablement différent.

III-3-4-2-3 Concentration en cuivre échangeable biodisponible pour les bactéries.

Pour étudier l'impact de la contamination en cuivre en solution sur les populations bactériennes, nous avons mesuré la concentration en cuivre biodisponible pour les bactéries [Cu_{Bio}] dans la solution de sol après échange au calcium. Cette mesure permet de quantifier quelle est la part de la [Cu_{ex}] qui est biodisponible pour les populations bactériennes. La Figure III–11 présente les résultats de la comparaison de la concentration en cuivre échangeable [Cu_{ex}] et biodisponible [Cu_{Bio}] pour les deux sols à T0 et T24 mois. A T0, la [Cu_{Bio}] est comparable à la [Cu_{ex}] pour le sol NA, alors que dans le sol CC la [Cu_{Bio}] est inférieure à la [Cu_{ex}]. On observe que l'amendement en MO modifie la spéciation du cuivre en solution. Après 24 mois, la [Cu_{Bio}] est très faible pour les deux sols. On observe que la

[Cu_{Bio}] représente une part plus faible de la [Cu_{ex}] pour les deux sols. Ces résultats indiquent un vieillissement de la concentration en cuivre ajouté au sol et une modification de sa spéciation au cours de l'incubation. L'augmentation de la concentration en MO dans le sol induit une diminution de la biodisponibilité du cuivre pour les bactéries, ce qui montre un effet protecteur de la MO pour les bactéries car le cuivre est moins biodisponible. Ces résultats sont en accord avec Lejon et al. (2008) qui ont aussi montré une diminution de la [Cu_{Bio}] avec l'apport de MO sur le même sol lors de la contamination.

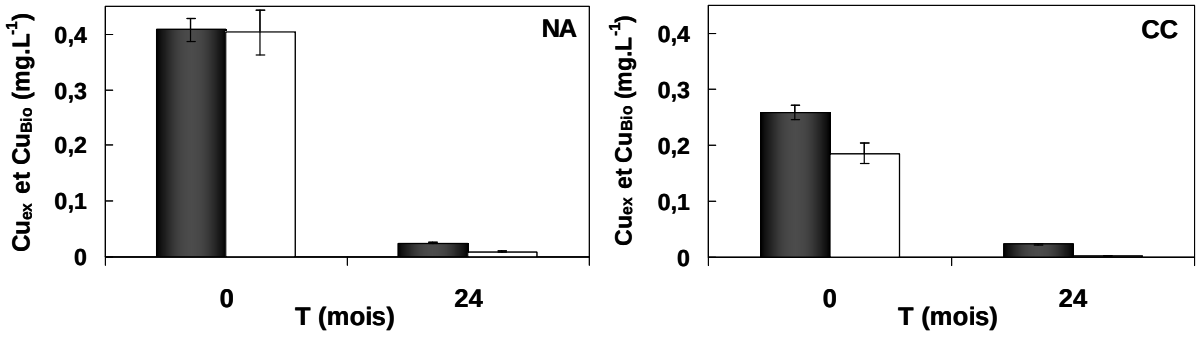


Figure III–11 Comparaison de la concentration en cuivre échangeable (noir) avec la concentration en cuivre biodisponible (blanc) à T0 et T24mois pour le sol contrôle non amendé (NA) et le sol amendé en compost de conifère (CC).Les barres d'erreur représente l'écart type entre les duplicatas.

III-3-5 Impact du cuivre sur les communautés bactériennes.

III-3-5-1 Impact du cuivre sur les populations bactériennes cultivables dans le sol de Clessé.

Pour étudier l'impact du cuivre sur les bactéries du sol et son évolution sur le long terme, nous avons suivi le facteur d'enrichissement en bactéries résistantes au cuivre (B^{Cu}). Nous avons donc suivi au cours de l'incubation l'évolution du ratio de la concentration en bactéries hétérotrophes cultivables résistantes au cuivre [B^{Cu}], et de la concentration en bactéries cultivables totales [B^{Tot}], (B^{Cu}/B^{Tot}). Ce ratio peut être un indicateur pertinent de l'impact d'une contamination (Ranjard et al. 1997; Rasmussen & Sorensen 2001; Brandt et al. 2010; Lejon et al. 2010).

Les résultats de l'évolution du facteur d'enrichissement sur 2 ans sont présentés dans la Figure III–12 uniquement pour les sols contaminés en cuivre à forte dose (240 ppm). Pour les deux sols, la [B^{Tot}] est d'environ 10^8 UFC.g_{ss}^{-1} et la [B^{Cu}] est d'environ 10^5 UFC.g_{ss}^{-1}. Comme montré par Lejon et al. (2010), la teneur en bactéries B^{Cu} ne représente qu'un faible pourcentage de la teneur en bactéries cultivables B^{Tot}, soit 0.1 et 0,25 %, respectivement pour NA et CC. Toutefois, ce ratio varie au cours du temps en relation avec la contamination en cuivre.

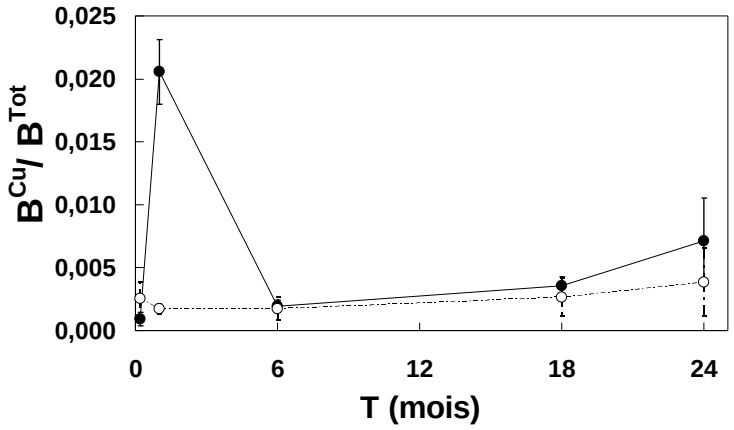


Figure III–12 Evolution temporelle du ratio de la concentration en bactéries hétérotrophes cultivables résistantes au cuivre (B^{Cu}) sur les bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}), dans les sols contaminés au cuivre à 240 $mg_{Cu}.kg^{-1}_{ss}$ (Cu). Les symboles pleins correspondent aux résultats du sol contrôle (NA) et les symboles vides correspondent au sol amendé en compost de conifère (CC). Les barres d'erreurs correspondent à la variation entre les réplicats.

Tout d'abord, les deux sols ne présentent pas la même évolution du facteur d'enrichissement en bactéries B^{Cu}, car le cuivre n'induit pas le même impact sur les bactéries cultivables en fonction du sol. Le paramètre principal qui diffère entre les deux conditions de sol est l'amendement en matière organique dans le sol CC. La concentration en bactéries cultivables des deux sols, ne varie pas de la même façon après la contamination cuprique et au cours de l'incubation.

Dans le sol NA, on observe un impact du cuivre important après un mois d'incubation, mais qui est transitoire puisque l'on observe rapidement un retour au niveau initial après 6 mois d'incubation. L'impact du cuivre sur les bactéries cultivables est maximum après un mois d'incubation. Dans le sol amendé en compost de conifère (CC), la [B^{Cu}] est plus élevée à l'état initial que le sol NA. Le taux de bactéries cultivables résistantes au Cu ne varie pas significativement tout au long de l'incubation, même si on observe une tendance à l'augmentation du taux de bactéries B^{Cu} au long terme comme dans le sol NA. L'amendement en MO n'affecte donc que l'impact du cuivre à court terme.

Pour les bactéries cultivables B^{Tot} et B^{Cu}, l'effet de la contamination au cuivre sur ces populations bactériennes montre un impact différent à court et à long terme, lequel dépend à la fois du taux de matière organique et du vieillissement de la contamination. Nos résultats sur l'impact du cuivre sur les populations bactériennes à court terme sont en accord avec ceux de Rasmussen & Sorensen (2001) qui ont montré une forte augmentation de la concentration des populations résistantes au Hg jusqu'à 3 mois d'incubation après la contamination pour un sol ayant environ la même teneur en carbone que le sol NA. De plus, nos résultats montrent un effet de la matière organique sur l'évolution de la concentration en bactéries cultivables résistante [B^{Cu}], qui peut s'expliquer par un effet de l'amendement sur la biodisponibilité du cuivre. Ceci est en accord avec Saison et al. (2006) qui ont montré que l'effet protecteur de l'amendement organique pour l'impact du cuivre sur les bactéries est principalement dépendant des caractéristiques physicochimiques du sol.

Cet enrichissement des sols en bactéries B^{Cu} mis en évidence avec le ratio B^{Cu} /B^{Tot} est aussi très bien relié avec l'évolution de la concentration en cuivre échangeable (Figure III–8). En effet, la [Cu_{ex}] évolue différemment entre les deux sols au début de l'incubation, car le sol NA a une concentration beaucoup plus importante, ce qui est lié avec un fort enrichissement en B^{Cu} dans le sol NA. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études (Kunito et al. 1999b; Tom-Petersen et al. 2001; Piotrowska-Seget & Kozdroj 2008).

Au long terme, l'augmentation de la [B^{Cu}] pour les sols NA et CC, peut être en relation avec une nouvelle mise en contact du cuivre avec les populations bactériennes, par la dégradation de la MO, par des changements de phase minéralogique du cuivre lié son vieillissement (changement de type de site de sorption), et par une diffusion du cuivre dans les micro-agrégats de sol lié à la hiérarchisation du sol en agrégats.

Pour mieux caractériser les populations bactériennes cultivables nous avons identifié les souches bactériennes B^{Tot} et B^{Cu} dominantes extraites des sols. Pour cela, nous avons sélectionné les différentes souches bactériennes dominantes sur les boites de Pétri de la plus faible dilution d'énumération (Figure III–13).

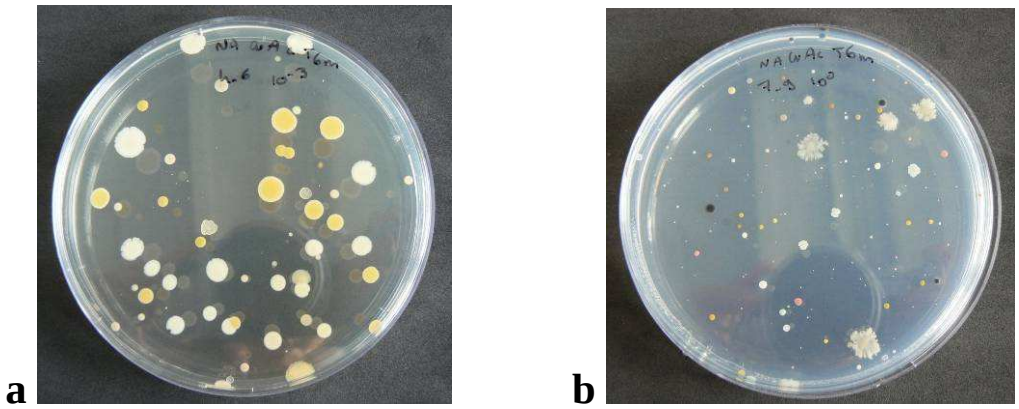


Figure III–13 Photos des bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}) sur le milieu nutritif LB (a), et résistantes au cuivre (B^{Cu}) sur le milieu de culture spécifique YG-Cu (b).

L'identification de ces bactéries par le séquençage du gène de l'ADN ribosomique (ADNr) 16S, nous a permis de mettre en avant les genres dominants des populations cultivables B^{Tot} et B^{Cu}. Pour le sol CC, nous avons observé une dominance des genres *actinobacteria* et pour le sol NA une dominance des bactéries des genres *actinobacteria* et *firmicutes*. Pour les bactéries cultivables B^{Cu}, on a observé une majorité d'espèce bactérienne du genre *α-proteobacteria* pour les deux sols. Cette étude préliminaire de l'identification des souches bactériennes ne nous permet encore de mettre en avant la différence de populations bactériennes dominantes entre les sols contaminés et non contaminés, car nous n'avons pas encore séquencé les souches bactériennes aux différents temps d'incubation.

III-3-5-2 Impact du cuivre sur la dynamique des communautés bactériennes.

III-3-5-2-1 Caractérisation des communautés bactériennes à T0

La migration sur gel d'acrylamide permet de visualiser l'hétérogénéité des communautés bactériennes dans chacun des échantillons (Figure III–14) pour les deux sols (NA et CC). L'analyse visuelle de ces gels montre que la localisation et l'intensité des bandes de taille d'ADN sont différentes entre le sol contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC) même si les empreintes génétiques sont proches. Ainsi, la bande la plus foncée (qui contient beaucoup d'espèces similaires) est située au même niveau pour les deux sols. Les différences d'empreinte génétique observées entre les échantillons d'un même sol peuvent être liées à l'hétérogénéité de la distribution des communautés à l'échelle locale mais aussi à l'extraction de l'ADN des sols.

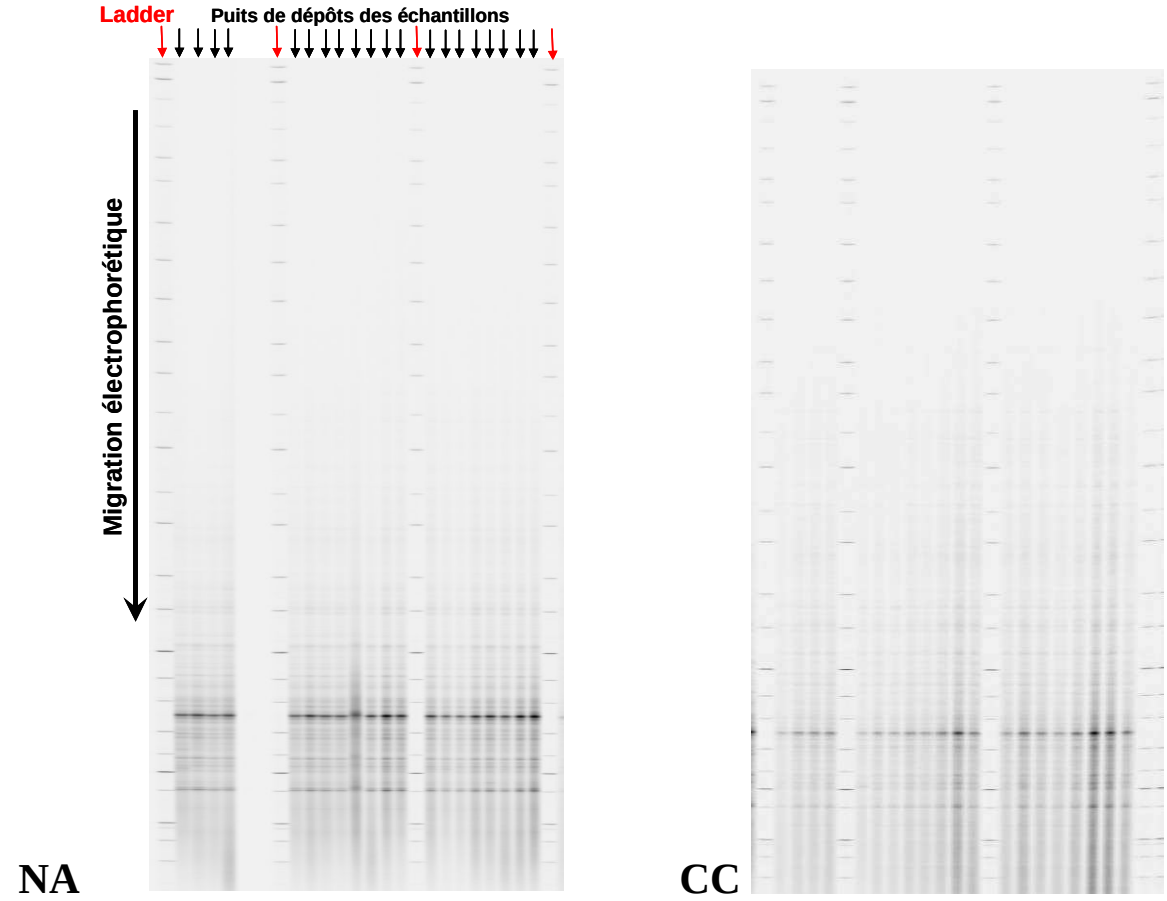


Figure III–14 Empreintes génétiques des sols contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC) à T0 obtenues sur gel d'acrylamide après l'extraction de l'ADN des sols, purification et PCR.

Pour mieux appréhender les variations de la structure des communautés bactériennes les empreintes génétiques sont présentées après un traitement des données de l'image de l'éléctrophorégramme sur le gel d'acrylamide sous forme d'analyse en composante principale (ACP) (Figure III–15). L'ACP permet d'analyser de manière relative les résultats entre les échantillons. Chaque point de l'ACP présente un échantillon d'ADN, et les échantillons d'un même sol sont présentés avec la même couleur. Les résultats obtenus montrent qu'à T0, les sols NA et CC ont des structures de communautés bactériennes différentes puisque les échantillons sont bien distincts surtout selon l'axe 1 de l'ACP qui explique le plus de variance. L'amendement du sol avec du compost de conifère induit une modification dans la composition des communautés bactériennes par rapport au sol contrôle non amendé. Bien que les apports en MO soient arrêtés depuis plus de 7 ans, il existe toujours un effet de cette MO, plutôt récalcitrante sur la structure des communautés bactériennes. Chemidlin Prevost-Boure et al. (2011) ont aussi montré l'importance de la quantité de la litière apportée au sol sur la structure des communautés. Des études antérieures (Marschner 2003; Saison et al. 2006; Bastida et al. 2008; Lejon et al. 2008; Remenant et al. 2009) ont également montré une influence du statut organique des sols sur la composition et la structure des communautés bactériennes qu'ils contiennent.

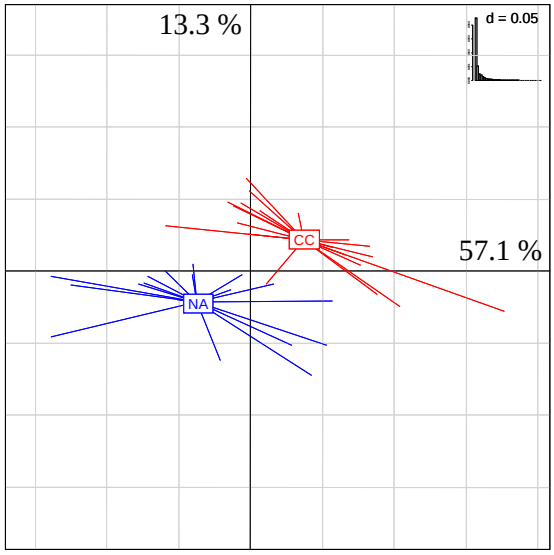


Figure III–15 Analyses en composantes principales (ACP) des empreintes génétiques (ARISA) des communautés bactériennes du sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC) à T0. Axe 1 : horizontale (57.1 %) ; axe 2 : verticale (13.3 %).

III-3-5-2-2 Effet du cuivre sur la structure des communautés bactériennes du sol de Clessé.

L'impact du cuivre dans le sol de Clessé a également été étudié par l'analyse de l'évolution de la structure des communautés bactériennes à l'aide des empreintes génétiques (ARISA) des deux sols. Pour cela, nous avons suivi l'évolution de l'amplitude des modifications des communautés bactériennes entre les sols contaminés et non contaminés au cours de l'incubation. Nous avons alors calculé la distance euclidienne entre les échantillons des sols contaminés et non contaminés au Cu (corrigés par la distance euclidienne entre les réplicats des échantillons) à partir des résultats obtenus sous forme d'ACP (Annexe F) et ces distances euclidienne sont projetées graphiquement pour chaque temps d'incubation (Eq. III-3). Ces distances euclidiennes peuvent être interprétées comme l'amplitude des modifications communautés bactériennes induites par la contamination et sont présentées sur la Figure III–16. Pour que les changements de diversité bactérienne soient significatifs, il faut que la distance inter-échantillons des sols soit supérieure à la distance intra-échantillons d'un même sol, ce qui était le cas dans notre étude. Le test de MonteCarlo réalisé pour l'évolution temporelle de la structure des communautés entre les sols contaminé et non contaminés, nous indique que l'évolution temporelle des communautés bactériennes est significative ($p<0.05$). Du fait que notre stratégie d'échantillonnage implique peu de points de mesure en raison de la lourdeur et du coût des analyses effectuées au cours des deux ans d'incubation, nous n'avons pas pu tripliquer tous les points de mesure. Pour cette raison, et compte tenu du fait que les distances peuvent être entachées d'une certaine erreur due à l'hétérogénéité des sols, nous avons préféré représenter les amplitudes de modification de la strucutre génétique des communautés bactériennes (distance euclidienne) des sols contaminés (240 ppm) par rapport aux sols témoins non contaminés (Figure III–16) au cours des deux ans d'incubation.

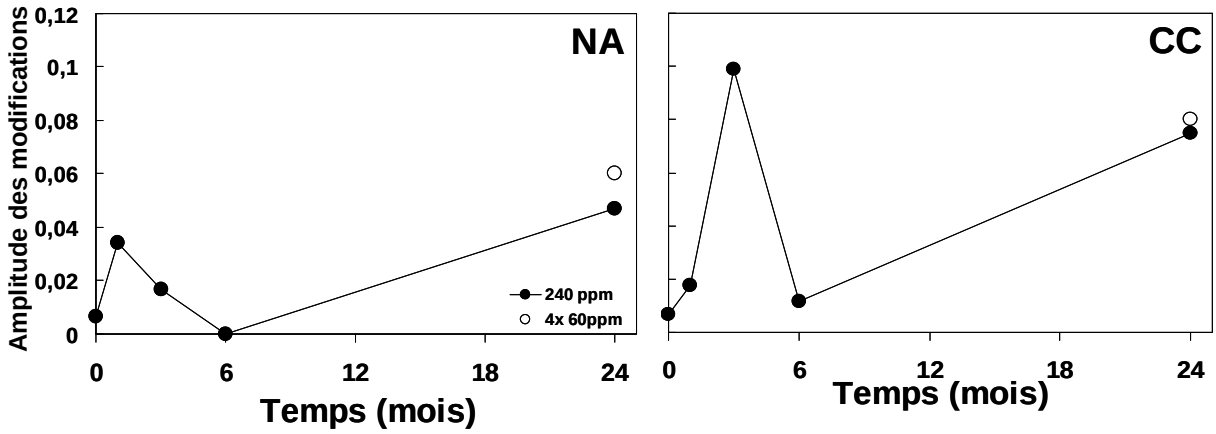


Figure III–16 Evolution temporelle de l'amplitude des modifications de la structure génétique des communautés bactériennes (distance euclidienne entre les empreinte génétiques) du sol de Clessé contaminé à forte (240 ppm, •) et faible dose (4x60 ppm, ○) de cuivre ou non pour le sol non amendé (NA) et amendé (CC).

A T0, la structure de communautés bactériennes est la même dans les deux sols, contaminés ou non, car les communautés n'ont pas eu le temps d'être impactées par le cuivre. Cependant, pour les deux sols, nous avons observé à T0 une légère différence de structure des communautés bactériennes entre les sols contaminés et non contaminés, alors que les échantillons ont été congelés immédiatement après contamination. Ceci indique un effet de la méthodologie et permet au passage d'estimer l'erreur globale due à la technique, qui est faible : 0.006 et 0.007 pour NA et CC, respectivement, valeurs que nous avons prises pour T0. Nos résultats sont en accord avec d'autres études (Marschner 2003; Saison et al. 2006; Lejon et al. 2007, 2008) qui ont aussi montré que les amendements organiques sous forme de compost modifient la composition des communautés bactériennes, mais aussi la taille et l'activité des communautés bactériennes.

La Figure III–16 montre une évolution des distances euclidiennes pour les deux sols au cours de l'incubation. Ce résultat indique que la structure des communautés bactériennes est impactée par le cuivre, et que l'amplitude de cet impact varie avec le temps et le vieillissement de la contamination au cuivre dans les deux sols. On observe ainsi pour les deux sols (NA et CC) une augmentation de l'amplitude des modifications de la structure génétique des communautés à court terme, maximale dès un mois pour NA et après 3 mois pour CC. Cet impact est transitoire puisque après 6 mois d'incubation, l'amplitude des modifications par rapport aux sols non contaminés est très faible et proche de celle de T0. 24 mois après la contamination en cuivre, l'amplitude des modifications de la structure des communautés bactériennes des sols est à nouveau très élevée, indiquant un nouvel impact à long terme et ce dans les deux sols. Ces résultats sont plutôt en accord avec les résultats d'évolution temporelle des taux de bactéries cultivables B^{Cu}, excepté pour l'impact à court terme dans CC. L'indicateur d'impact basé sur l'évolution de la structure génétique des communautés bactériennes permet donc de mettre en évidence un impact non observé avec l'indicateur des bactéries cultivables (B^{Cu}/B^{Tot}). Ceci peut s'expliquer facilement par le fait qu'il peut y avoir un remodelage des populations bactériennes sous l'effet du cuivre sans que la quantité globale de bactéries B^{Cu} ne varie significativement. Nos résultats sont en accord avec Brandt et al. (2010) qui ont aussi montré un très fort changement dans la structure des communautés bactériennes après une contamination au cuivre. L'amendement du sol a donc modifié la cinétique d'impact du cuivre sur les changements des communautés bactériennes.

Comme observé dans les résultats obtenus avec l'indicateur d'impact [B^{Cu}], l'indicateur de la structure des communautés bactériennes montre que le cuivre présente un impact court terme rapide (1 mois pour le sol NA) et qui peut être retardé par l'amendement du sol

compost (3 mois pour le sol CC), et un impact observé à plus long terme similaire pour les deux sols. Le premier impact est transitoire alors que le second semble stable. Ces deux types d'impact correspondent à des processus différents qui peuvent être expliqués au moins partiellement par nos résultats de spéciation du cuivre. En effet, à court terme, le cuivre est très facilement échangeable et biodisponible et donc toxique. Il représente donc un impact rapide et fort sur les populations bactériennes. La réduction rapide de la [Cu_{ex}] (quelques mois) et la [Cu_{Bio}] rend alors le cuivre moins toxique ce qui permet la résilience de l'impact observé avec nos deux indicateurs. L'impact du cuivre à long terme est plus difficile à expliquer car plusieurs processus (au mois deux) peuvent être impliqués sans que nous puissions les discriminer ici. Comme nous l'avons observé dans la Figure III–7, la MO du sol de Clessé qui a fixé une quantité importante de cuivre est dégradée durant l'incubation ce qui implique un contact rapproché entre la MO et les microorganismes par une modification de la spéciation du cuivre. Ce qui induit un impact potentiel du cuivre sur les bactéries lors de la dégradation de la MO qui se fait tout au long de l'incubation. Une autre explication à l'impact long terme du cuivre sur les communautés bactériennes est un effet physique lié à la diffusion progressive du cuivre à l'intérieur des micro-agrégats des sols induisant ainsi une certaine cinétique de mise en contact du cuivre avec les populations bactériennes des micro-agrégats.

Au long terme (24 mois), nous avons aussi étudié l'impact du cuivre sur la structure des communautés bactériennes dans les sols contaminés en plusieurs doses (4 x 60 ppm) uniquement après les deux ans d'incubation. Après 24 mois d'incubation, on observe une amplitude de modification de la structure des communautés similaire à celle des sols à contamination aigüe (240 ppm). Toutefois, ce résultat ne nous permet pas de montrer qu'il s'agit de communautés bactériennes similaires dans les sols des différentes contaminations. Pour étudier l'impact du cuivre entre les différents traitements en cuivre, il aurait été intéressant de faire l'analyse de la structure des communautés avant et après chaque contamination.

Pour identifier précisément les processus contrôlant l'impact du cuivre à long terme, il est nécessaire d'étudier l'évolution de la structure des populations bactériennes en présence de cuivre, à l'échelle des micro-agrégats hébergeant ces populations. Seule une caractérisation quantitative et qualitative à micro-échelle de la distribution du cuivre et des bactéries permettra de comprendre les relations bio-physicochimiques entre le polluant, les cellules bactériennes et leur microhabitat. C'est ce que nous proposons d'étudier dans le chapitre IV suivant.

III-4 Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif d'évaluer le devenir et l'impact du cuivre dans le sol de Clessé (sous culture de vigne) sous deux statuts organiques différents sélectionnés sur la base des résultats du Chap. II. La restriction à l'étude de deux sols (amendé en compost de conifère et sol contrôle, Non Amendé), nous a permis d'étudier de manière approfondie l'évolution temporelle d'une contamination au cuivre à faible et forte doses.

Comme nous l'avons montré au Chap. II, le taux de carbone organique total est beaucoup plus élevé dans le sol CC que dans le sol NA bien que les apports en MO sur ce sol aient été arrêtés cinq ans avant notre échantillonnage. L'incubation du sol de Clessé en chambre thermostatée a induit une augmentation significative de la dégradation du carbone dans le sol amendé (CC), alors que dans le sol NA, celui-ci est resté stable. Les mêmes tendances ont été mesurées sur la parcelle viticole, mais avec une cinétique de minéralisation environ deux fois plus lente, qui s'explique par des conditions optimales d'incubation des sols en laboratoire.

Nos résultats ont montré que la spéciation du cuivre est un paramètre primordial pour évaluer son impact sur les communautés bactériennes des sols. En effet, le solide retient fortement le cuivre et contrôle de ce fait les concentrations de cuivre en solution. La concentration en cuivre facilement solubilisable et toxique (échangeable au calcium, $[Cu_{ex}]$), ne représente qu'une faible part du cuivre total du sol (<1%). Pour le sol de Clessé, contaminé avec une seule dose de cuivre (240 ppm), $[Cu_{ex}]$ diminue rapidement au cours du temps jusqu'à atteindre en moins d'une année la même valeur que dans les sols non contaminés. Ceci met en évidence un changement rapide de spéciation du cuivre en solution et sur le solide. De plus, $[Cu_{ex}]$ est clairement inférieure dans le sol CC que dans le sol NA, montrant ainsi le fort pouvoir complexant (donc protecteur) de la MO pour le cuivre. Nous avons aussi montré que le cuivre apporté au sol à forte dose en une fois (240 ppm) ou de manière chronique (4 x 60 ppm) présente un vieillissement identique (avec toutefois des amplitudes différentes) avec des valeurs $[Cu_{ex}]$ similaires après deux ans d'incubation, confirmant ainsi la nécessité de mieux comprendre le rôle de la spéciation liquide et solide du cuivre dans les sols pour mieux prédire son comportement et son impact.

Ainsi, nous avons évalué l'impact de cette contamination au cuivre sur les populations bactériennes du sol de Clessé à l'aide de deux indicateurs, l'enrichissement en bactéries résistantes au cuivre ($[B^{Cu}]$), et l'évolution de la structure génétique des communautés bactériennes (empreintes génétiques ARISA) donnant des informations très complémentaires. Avec les deux indicateurs, nous avons mis en évidence un impact du cuivre proportionnel au taux de MO dans le sol. L'impact du cuivre est particulièrement marqué dans le sol NA, le plus pauvre en MO, confirmant l'effet protecteur de celle-ci. Cet impact est rapide mais transitoire, et disparaît environ un mois après la contamination. Dans le sol CC, cet impact transitoire est retardé (effet protecteur de la MO) et disparaît après 6 mois. Cet impact rapide du cuivre sur les communautés bactériennes est fortement corrélé à la concentration en cuivre échangeable et biodisponible mesurées durant la même période (première année d'incubation).

Sur le long terme (24 mois), un deuxième type d'impact du cuivre a été observé sur les populations bactériennes des deux sols, ce qui se traduit par une augmentation des $[B^{Cu}]$ et un changement de la structure génétique des communautés bactériennes, alors qu'en parallèle, les concentrations en cuivre en solution (totales et biodisponibles) sont restées très faibles durant la même période. Cette étude montre donc que, sur le long terme, l'impact du cuivre n'est pas lié à la concentration du cuivre en solution, contrairement à ce qui a été observé à court terme. Ceci montre la complexité du système sol étudié, qui semble contrôlé par la structure spatiale

du sol, la matière organique ainsi que de leur évolution temporelle. En particulier, l'impact du cuivre semble lié à l'évolution de la MO (biodégradation) et de la spéciation solide du cuivre (rétention sur des sites réactifs de plus en plus forts), ce qui suggère un contact évolutif des bactéries avec le cuivre au cours du temps.

Nos résultats indiquent par ailleurs que la dégradation de la MO labile des sols doit être prise en compte pour une meilleure compréhension du système sol-cuivre étudié et, en particulier, pour mieux prendre en compte le vieillissement de la contamination au cuivre, c'est-à-dire ses changements de phases et de spéciation.

Les résultats obtenus dans ce chapitre montrent clairement la nécessité de connaître la co-distribution à micro-échelle des microorganismes et du cuivre, ainsi que la spéciation de ce dernier, pour mieux comprendre le rôle de la structure spatiale des sols dans le contrôle de l'impact (accesibilité et biodisponibilité) du cuivre. Ceci fera l'objet du Chapitre IV, dans lequel nous proposons d'évaluer l'impact du cuivre dans chacun des sous compartiments granulométriques de nos deux sols à l'aide d'une approche par fractionnement granlométrique peu déstructurant.

Chapitre IV Impact d'une contamination cuprique à l'échelle de l'agrégat de sol : caractérisation et évolution.

IV-1 Introduction

Les études sur l'évolution des paramètres biogéochimiques des sols ont contribué à mieux comprendre le fonctionnement global du sol face aux pollutions métalliques. Comme nous venons de le montrer dans le chapitre précédent, une contamination au cuivre dans un sol viticole peut impacter à plusieurs niveaux et avec des cinétiques variables la structure des communautés bactériennes ainsi que la proportion de bactéries résistantes en relation notamment avec la présence de matière organique exogène.

Les sols sont connus pour être des milieux complexes à cause de la diversité et la réactivité de leurs constituants. Néanmoins, le sol peut être décrit sur la base de paramètres globaux tels que la texture, la teneur en eau, la capacité d'échange cationique, la teneur en nutriments (P, C, N, K, Na), ou la densité bactérienne globale. Mais il est évident que ces descripteurs globaux ne permettent pas de comprendre et de décrire précisément le fonctionnement du sol. En effet, la hiérarchisation spatiale en agrégats des sols rend difficile la description globale de leur fonctionnement car chaque macro ou micro-agrégat peut constituer un micro-compartiment indépendant (Tisdall & Oades 1982; Oades 1988; Jocteur Monrozier et al. 1991, 1993; Six et al. 2004). C'est donc surtout depuis que l'on a pu mener des études à l'échelle des micro-agrégats de sols impliquant une séparation de leurs constituants que la compréhension fine du fonctionnement des sols s'est améliorée.

Ces approches par fractionnement physique peu déstructurant des sols ont été largement utilisées pour comprendre l'organisation des sols mais aussi le rôle de la matière organique dans cette organisation. La matière organique est un composé essentiel des sols qui contrôle de nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques dont la stabilité des agrégats de sol (Carter & Stewart 1996). Le turnover du carbone dans les sols est principalement contrôlé par la teneur en eau et la température du sol, mais certains facteurs tels que la composition physicochimique du sol, la nature de la MO, le contenu et l'interaction en argile et en biomasse microbienne modifient les cinétiques de minéralisation du carbone des sols (Oades 1988; Bronick & Lal 2005; Grosbellet et al. 2011).

Les agrégats des sols sont aussi considérés comme des habitats microbiens présentant des conditions environnementales particulières. A cette échelle, les populations bactériennes sont majoritairement localisées dans les micro-agrégats du sol (<20 µm), qui sont les habitats les plus favorables à la vie bactérienne (Heijnen & van Veen 1991; Jocteur Monrozier et al. 1991; Kabir et al. 1994; Ranjard et al. 1997; Kandeler et al. 2000; Sessitsch et al. 2001; Ranjard & Richaume 2001; Chotte et al. 2002; Fall et al. 2004; Mummey & Stahl 2004; Mummey et al. 2006; Zhang et al. 2007; Ruamps et al. 2011). Cette distribution hétérogène des microorganismes dans les sols s'accompagne d'une hétérogénéité de distribution des polluants comme le cuivre à micro-échelle mais aussi à la surface des sols. Jacobson et al. (2007) par une approche de spectroscopie EXAFS ont montré que le cuivre se distribue de manière hétérogène mais non aléatoire dans les sols. Ceci indique que des approches globales sur les sols non fractionnés sont moins informatives sur les concentrations réellement rencontrées par les organismes du sol à l'échelle microscopique. Ceci montre la nécessité d'étudier la distribution du cuivre sur les constituants du sol à micro-échelle en même temps que celle des microorganismes, si on veut obtenir une compréhension fine des processus de mise en contact Cu/microorganismes et donc de l'impact des ETM dans les sols.

L'objectif principal de ce chapitre est précisément de mieux comprendre les relations existantes à micro-échelle entre la distribution du cuivre, sa spéciation et son impact sur les communautés bactériennes. Pour étudier ces relations il est nécessaire de préserver la

structure spatiale du sol, c'est-à-dire de préserver les micro-environnements du sol. Le fractionnement physique du sol apparaît être une méthode appropriée de séparation de ces micro-environnements. Même si elle ne permet pas de maintenir intact les macrostructures, cette méthode est en tout cas bien acceptée et utilisée depuis plusieurs décennies en science du sol. Nous avons donc choisi d'appliquer dans cette étude un protocole de fractionnement granulométrique partiellement déstructurant des sols tel que décrit dans le chapitre II. Un fractionnement déstructurant aurait détruit les micro-environnements. Nous avons donc étudié la distribution du cuivre et son impact sur la microflore bactérienne dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en matière organique et contaminés ou non en cuivre. Les échantillons de sol ont été prélevés tous les 6 mois dans les mésocosmes de laboratoire, où les sols ont été incubés en conditions contrôlées pendant 2 ans. A chaque pas de temps et pour les deux sols, nous avons :

- caractérisé la distribution massique des fractions.
- caractérisé la distribution du cuivre (solide et en solution), du carbone organique total et des populations bactériennes dans les fractions granulométriques.
- caractérisé l'impact du cuivre dans chacun des micro-habitats.
- caractérisé la réactivité aux protons des fractions granulométriques.
- évalué la contribution des constituants réactifs (organique et minéral) à la réactivité globale des sols pour chacune de leurs fractions.
- modélisé la rétention du cuivre échangeable en solution dans les fractions granulométriques à l'aide du logiciel PhreeqC.

La première partie de ce chapitre traite des paramètres biologiques, physiques et chimiques nécessaires à la caractérisation des fractions granulométriques des sols, et de l'impact du cuivre dans ces fractions. La deuxième partie traite de l'évolution temporelle à micro-échelle de cette contamination en cuivre autant en termes de distribution, de spéciation que d'impact.

IV-2 Matériel et Méthodes

IV-2-1 Fractionnement granulométrique du sol de Clessé

IV-2-1-1 Protocole de Fractionnement physique peu déstructurant

Les fractions granulométriques du sol de Clessé ont été obtenues avec le protocole de fractionnement physique peu déstructurant adapté de Jocteur Monrozier et al. (1991). Cette méthode repose sur différentes étapes de dispersion du sol, tamisage humide et sédimentation. La méthode de fractionnement utilisée est un tamisage humide, ce qui permet de mieux préserver la structure en agrégée du sol (Christensen 2001). Cette méthode a été présentée en détail au paragraphe II-2-2 du Chapitre II. Les 5 fractions granulométriques du sol étudiées dans ce chapitre sont les mêmes que celles décrites dans le Chapitre II, qui présentait la gamme de taille suivante : >250 µm, 250-63 µm, 63-20 µm 20-2 µm et <2 µm.

IV-2-1-2 Caractérisation physique des fractions granulométriques.

IV-2-1-2-1 Caractérisation de la distribution de tailles des fractions granulométriques du sol de Clessé par granulométrie laser

Pour vérifier la distribution de tailles des fractions granulométriques du sol de Clessé, nous avons utilisé le même protocole de granulométrie laser que celui décrit dans le Chap. II.

IV-2-1-2-2 Caractérisation par microscopie électronique à balayage

Les cinq fractions granulométriques du sol ont aussi été caractérisées en microscopie électronique à balayage (MEB) pour visualiser leur structure. Pour connaître la composition chimique globale et qualitative des fractions, quelques analyses par microanalyse EDX (energy dispersive X-Ray) ont été réalisées sur celles-ci en couplage avec les analyses MEB. Pour conserver la structure de chaque fraction, le protocole spécifique suivant a été appliqué : les échantillons sont dispersés dans de l'eau ultra pure sous agitation douce. Une goutte de cette solution de sol est mise à sécher dans une étuve à 105°C pendant 15h, afin d'obtenir un échantillon complètement sec. L'échantillon est ensuite transféré sur un scotch double face en carbone (conducteur), le surplus de particules est éliminé avec de l'air comprimé. L'échantillon est finalement recouvert d'une couche mince de carbone conducteur nécessaire pour les observations au MEB. Les analyses ont été effectuées avec un MEB Jeol JSM 6400 couplé à un spectromètre EDX, équipement localisé dans le consortium des moyens technologiques communs (CMTC, UJF-INPG).

IV-2-2 Caractérisation chimique des fractions granulométriques du sol de Clessé.

IV-2-2-1 Mesure du pH dans les fractions granulométriques

Le pH_w des fractions granulométriques a été mesuré avec une électrode pH (Metrohm), préalablement calibrée. Les mesures ont été effectuées dans une suspension de chaque fraction avec un rapport sol/solution de 1 :5.

IV-2-2-2 Titrage acide base des fractions granulométriques

Les méthodes titrimétriques permettent d'évaluer la capacité d'échange de protons d'un composé en solution aqueuse. Les sols sont composés de constituants réactifs de nature minérale (argile, oxyde, …), organique (e.g. acides humique) ou biologique (bactéries et champignon) susceptibles d'échanger des protons avec la solution, depuis la surface ou l'intérieur du solide. L'explication détaillée des réactions mises en jeu lors des titrages acides bases est présentée dans l'Annexe G.

Une courbe [Hs] tracée en fonction du pH du milieu exprime la capacité d'échange de H^+ d'une surface. L'absence de déprotonation, c'est-à-dire une réactivité nulle sera alors caractérisée par une courbe de [Hs] horizontale. Inversement, une courbe [Hs] de pente élevée correspond à un fort échange de protons, c'est-à-dire une réactivité élevée. La pente de la courbe exprime le pouvoir tampon du substrat étudié. Dans le cadre de ces travaux il s'est avéré nécessaire d'exprimer au mieux la réactivité globale aux protons d'une phase (ici une classe granulométrique) étudiée par titrage. La différence de [Hs] mesurée entre pH 4 et pH 10, permet d'exprimer de façon efficace cette différence de réactivité des fractions entre elles. En effet, en dessous de pH 4 et au dessus de pH 10, les concentrations en H^+ et en OH^- libres deviennent trop grandes par rapport à [Hs], rendant difficile la quantification de cette valeur avec une précision suffisante (Guine et al. 2007). On obtient ainsi un barème de comparaison de la réactivité d'un solide par la mesure de [Hs]. L'avantage de ce procédé est qu'il permet de s'affranchir des incertitudes liées aux modèles de titrages qui certes expriment une réactivité totale allant d'un pH très bas à un pH très haut, mais qui sont toujours associés à une incertitude expérimentale importante par rapport aux conditions limites de concentration aux pH extrêmes étudiés (Guine et al. 2007; Lenoir & Manceau 2010).

Dans la suite de notre étude, la réactivité globale aux protons, notée ΔHs, exprimera donc la différence de concentration en protons libérés par les fractions du sol entre pH 10 et pH 4 suivant l'équation:

$$\Delta Hs = Hs(pH10) - Hs(pH4) \qquad \textbf{[IV-1]}$$

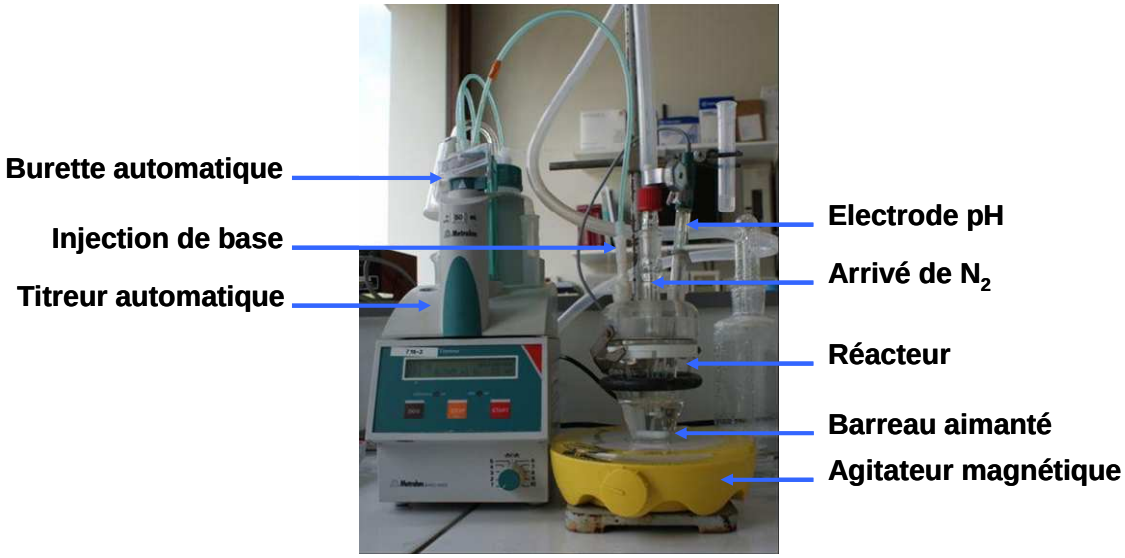


Figure IV–1 Photo du banc de titration acide base utilisé pour le sol de Clessé.

Les titrages des fractions granulométriques ont été réalisés avec une unité de titrage Metrohm (pH-mètre, électrode pH Aquatrode 6 02531 100, burette automatique Titrino 716) pilotée par le logiciel Tiamo (Metrohm), et dont l'électrode pH est calibrée (à 20 ±2 °C) avant chaque titrage (Figure IV–1).

Lors d'un titrage, 1g d'échantillon de sol humide (d'humidité connue) est inséré dans 30 mL d'une solution 5 mM HNO_3 dans un réacteur fermé sous agitation à l'aide d'un barreau magnétique et maintenu à température constante de 20 ±2°C, lequel est titré avec une solution basique NaOH de 10 mM, par ajout successifs de volumes de 0.25 mL. L'équilibre chimique est considéré atteint quand la variation du potentiel de l'électrode est inférieure à 0.5 $mV.min^{-1}$. Toutes les solutions ont été préparées dans un milieu de force ionique constante de 0.1M $NaNO_3$. Les variations de force ionique au cours du titrage sont inférieures à 0.01 M, ce qui permet de considérer les coefficients d'activité comme constants. Par convention [Hs] désignera la concentration de protons libérés de la surface vers la solution.

IV-2-2-3 Composition chimique des fractions granulométriques du sol de Clessé.

Les teneurs en COT, Ca, Mg, K, Fe, Al, Mn et Cu, en Cu_{ex}, ont été obtenues pour caractériser les fractions granulométriques selon les mêmes protocoles que ceux décrits dans les Chapitres II et III.

Les teneurs en COT dans les fractions granulométriques sont obtenues avec un analyseur FlashEA1112/FLASH 2000 (LECA, Grenoble), après broyage à sec des fractions granulométriques. Les concentrations totales des différents éléments chimiques dans les fractions des sols après extraction à l'eau régale, et les concentrations en cuivre échangeable au calcium, Cu_{ex}, après échange du cuivre avec une solution de $Ca(NO_3)_2$, sont mesurées par ICP_AES (Perkin Elmer Ltd, ISTerre, Grenoble).

La modélisation de la concentration en cuivre échangeable dans les fractions granulométriques du sol de Clessé a été effectuée avec le logiciel PHREEQC Interactive – version 2.15.06 (Parkhurst & Appelo 1999). Ce logiciel permet de calculer les équilibres chimiques en milieu homogène et hétérogène (solution en présence de gaz et solides et

d'interfaces réactives). La procédure de calcul pour effectuer cette modélisation est présentée en Annexe I.

IV-2-3 Caractérisation biologique des fractions granulométriques.

Nous avons étudié l'impact du cuivre sur les populations bactériennes par l'énumération des bactéries hétérotrophes cultivables (B^{Tot} et B^{Cu}), et par l'étude de l'évolution de la structure génétique des communautés bactériennes (ARISA) selon les mêmes protocoles que ceux décrits dans le Chapitre III. L'évolution temporelle de la proportion de bactéries cultivables résistantes au cuivre et des empreintes génétiques des communautés bactériennes des fractions granulométriques ont été utilisées pour caractériser l'impact du cuivre sur les communautés bactériennes.

IV-3 Résultats et Discussions

IV-3-1 Caractérisation physique des fractions granulométriques

IV-3-1-1 Distribution et évolution de la masse des fractions granulométriques

La distribution massique des fractions granulométriques du sol de Clessé non amendé (NA) et amendé (CC) est donnée dans la Figure IV–2. Cette distribution massique des constituants des sols par leur taille est différente de la texture du sol dans la mesure où la méthode de fractionnement est peu déstructurante et permet de préserver partiellement l'agrégation des sols.

La fraction 63-20 µm est la fraction la plus abondante avec une masse de 10.4 et 10.6 g respectivement pour le sol contrôle (NA) et le sol amendé en compost (CC). La fraction micro-agrégée 20-2 µm est aussi très abondante et représente quant à elle, une masse légèrement inférieure de 9.4 et 9.1 g, respectivement pour les deux sols. A elles deux, ces fractions (63-20 et 20-2 µm) représentent plus de 65 % de la masse totale du sol et correspondent aux micro-agrégats stables des sols (Tisdall & Oades 1982). La fraction 250-63 µm est également agrégée mais de manière moins stable car contenant des sables fins et des débris végétaux. Cette fraction représente 4.0 ou 4.4g de la masse totale du sol (soit ≈15 % du sol), respectivement pour les deux sols. La fraction la plus grossière (>250 µm) des sols NA et CC, avec des masses de 3 et 3.3 g, respectivement, soit environ 10 % de la masse du sol, peut être considérée comme la fraction macro-agrégée contenant aussi des débris végétaux grossiers. Les deux fractions grossières (>250 et 250-63 µm) sont légèrement plus abondantes dans le sol CC que dans le sol NA. A l'opposé la fraction la plus fine, dite argileuse (<2 µm), a une masse de 3 et 2.5 g (≈10 %) pour le sol NA et CC, respectivement. Selon le concept de hiérarchisation structurale des sols, la fraction fine se compose d'associations argileuses (avec des structures monominérale de taille <0.2 µm) et de complexes argilo-humiques générant des structures de taille 0.2-2 µm (Edwards & Bremner 1967; Christensen 2001).

La Figure IV–2 montre que la distribution massique des fractions granulométriques des deux sols est semblable. Bien que non significative, on note tout de même une légère diminution de la masse des fractions fines (<20 µm) au profit des fractions grossières (>63µm) dans le sol amendé (CC) suggérant un effet structurant de l'apport du compost. De façon similaire la contamination au cuivre n'affecte pas la masse des fractions (données non présentées). On rappelle ici (c.f. Chap. II paragraphe II-3-1-1) que les sols NA et CC ont la même texture et que leur seule différence provient de l'amendement en matière organique (CC) effectué sur le sol entre 1991 et 2003. L'amendement organique en compost de conifère modifie peu la structure du sol car les résidus organiques ont été probablement fortement dégradés depuis le dernier apport en 2003.

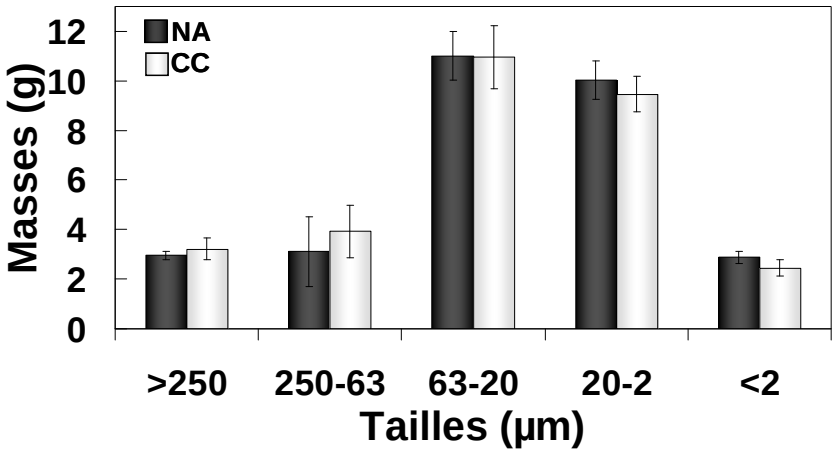


Figure IV–2 Distribution massique des fractions granulométriques du sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en compost (CC). Les barres d'erreurs ont été calculées avec quatre réplicats.

Les rendements du fractionnement physique non déstructurant ont été vérifiés par le calcul des bilans de masse (Tableau IV-1). On note que les bilans de masse sont très bons et proches de 100 ± 4 % tout au long de l'incubation, attestant de la bonne qualité des données acquises. Ces bons résultats ont été obtenus grâce à l'optimisation du mode opératoire et notamment la vitesse d'agitation lors de la phase de dispersion des sols qui affecte fortement la stabilité structurale des agrégats, par la forte diminution de la masse des fractions macro agrégées (>250 et 250-63 µm) au profit des fractions micro-agrégées et argileuses.

Tableau IV-1 Bilans de masse du fractionnement physique du sol non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC) contaminé ou non en cuivre (240 ppm) à chaque temps de prélèvement (en mois). Fractionnement de 30g de sol sec.

Temps (mois)	Condition de contamination			
	NAH_2O	NACu	CCH_2O	CCCu
0	102	99	102	93
6	104	104	99	100
12	99	102	101	104
18	100	103	99	101
24	103	100	101	99

La Figure IV–3 présente l'évolution de la distribution massique des fractions granulométriques des deux sols qui a peu évolué au cours des deux ans d'incubation. Ces résultats montrent que la structure du sol est relativement stable. On observe une légère augmentation de la masse de la fraction 63-20 µm (4 à 5 % de la masse totale du sol). Au contraire la masse des fractions 20-2 µm et 250-63 µm diminue légèrement au cours de l'incubation. Pour finir, les fractions >250 µm et <2 µm ont une masse qui est stable voir légèrement augmenté (<2 µm) avec le vieillissement. On observe une déstabilisation des agrégats de la fraction 250-63 µm (dégradation de la MO) au profit de la fraction 63-20 µm ainsi qu'une diminution de la masse de la fraction 20-2 µm au profit de la fraction <2 µm.

Notre faible évolution de l'agrégation des sols est donc déterminée davantage par un effet mécanique des cycles humectation/dessiccation imposés aux sols, et du remaniement mensuel qui peut stimuler l'activité microbienne, plutôt que par le changement de teneur et de composés organiques.

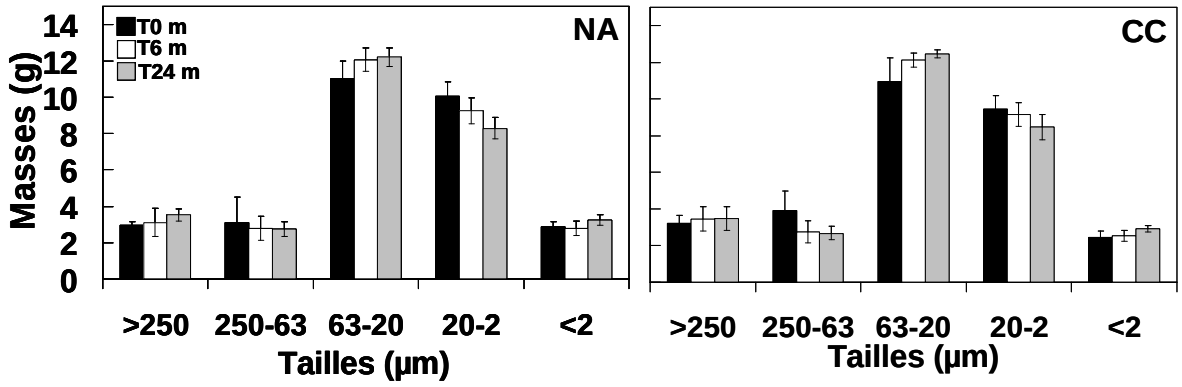


Figure IV–3 Dynamique de la distribution massique des fractions granulométriques dans le sol contrôle (NA) et dans le sol amendé en compost de conifère (CC) à chaque temps d'incubation (T0, T6 et T24 mois). Les incertitudes sont calculées avec quatre réplicats.

Dans les fractions grossières (>250 et 250-63 µm), une part importante de la matière organique se présente sous forme de matière organique particulaire (MOP). Cette forme de carbone s'ajoute à celle plus évoluée contenue dans les agrégats des fractions (Christensen 2001). Dans le cadre du projet MOBiPo-Cu, les MOP (2000-200, 200-50 µm) de notre sol ont été analysé en taille et en concentration par Isabelle LAMY (Laboratoire PESSAC, INRA de Versailles). Ces résultats qu'elle nous a aimablement fournis sont présentés dans le Tableau IV-2.

Tableau IV-2 Quantification de la concentration de Matière Organique Particulaire (MOP) dans les fractions grossières du sol de Clessé non amendé (NA) et amendé (CC). La concentration en MOP dans le sol est présenté par [MOP] en $(m_{MOP})/(m_{ss})$ et la concentration en MOP dans les fractions de taille correspondantes est présenté en $[MOP_f]$ en $(m_{MOP})/(m_f)$.

Fractions granulométriques		**Masse de fraction (m_f)**	**Proportion de la masse de fraction (m_f/m_{ss})**	**[MOP]* $(m_{MOP})/(m_{ss})$**	**$[MOP_f]$ dans la fraction $(m_{MOP})/(m_f)$**
	Taille (µm)	**g**	**%**	**$mg_{MOP}.g^{-1}_{ss}$**	**$mg_{MOP}.g^{-1}_{f}$**
Contrôle (NA)	**>250**	3.07	10.2	3.3	32.2 (3.2 %)
	250-63	4.01	13.4	6.8	50.8 (5.1 %)
Amendé (CC)	**>250**	3.37	11.2	7.3	64.9 (6.5 %)
	250-63	4.41	14.7	13	88.5 (8.9 %)

*Les valeurs des concentrations en MOP dans le sol de Clessé prélevés dans les mésocosmes de laboratoire ont été obtenues par I. LAMY (Martins et al. 2010).

Les MOP ne représentent qu'une fraction faible de la masse totale des sols. Comme anticipé, la concentration des MOP est plus élevée dans le sol CC que dans le sol NA quelque soit leur taille, en cohérence avec l'ajout de MO grossière au sol de Clessé durant plus de 20 ans. Cinq années après la fin de l'amendement les MOP des sols sont seulement 2 fois plus importantes dans le sol CC que dans le sol NA. On observe environ deux fois plus de MOP de petite taille (6.8 et 13 $mg_{MOP}.g^{-1}_{ss}$ pour NA et CC respectivement) que de MOP grossière (3.3 et 7.3 $mg_{MOP}.g^{-1}_{ss}$ pour NA et CC respectivement). Au niveau des fractions granulométriques des sols, les $[MOP_f]$ ne représentent qu'un faible pourcentage de la masse des fractions, soit entre 3 (>250 µm) et 5 % (250-63 µm) pour NA et 6.5 et 8.9 % pour CC. L'amendement en CC induit donc une augmentation des deux types de tailles granulométriques des MOP dans le

sol de Clessé. La différence de [MOP] est faible dans le sol de nos mésocosmes probablement en lien avec la faible différence de teneur en COT entre les deux sols, suite à la dégradation de la MO depuis l'arrêt des apports sur la parcelle.

IV-3-1-2 Distribution de la taille des fractions granulométriques par granulométrie laser.

Dans le chapitre II, la vérification de la taille granulométrique des fractions a été réalisée par granulométrie laser. Les distributions de la taille des constituants des fractions granulométriques pour les sols NA et CC en fonction du pourcentage de la masse de la fraction dans le sol sont présentées dans l'Annexe A-1. Dans le Chapitre II, la vérification de la granulométrie a montré que quelque soit l'amendement en matière organique apportée, la méthode de fractionnement physique non déstructurant est reproductible et efficace pour séparer les constituants de tailles variables. L'étendue de chacune des fractions granulométriques est donc vérifiée par granulométrie laser, et confirme bien leur distinction.

IV-3-1-3 Distribution des tailles des constituants des fractions granulométriques par microscopie électronique.

Les fractions ont été analysées individuellement au microscope électronique à balayage (MEB). Une photo représentative de chaque fraction est présentée dans la Figure IV–4. La photo de la Figure IV–4a montre une composition très hétérogène de la fraction grossière (>250 µm). Celle-ci, est principalement constituée de débris organiques recouverts ou non par endroit par des argiles, et de macro agrégats (Figure IV–4b) plus complexes où sont associés matière organique, cristaux de quartz et des phases minoritaires telles des oxydes de Fer liés par les argiles. Ces débris végétaux représentent la matière organique particulaire (MOP). Dans les sols, on trouve des débris organiques de toutes tailles (Ducaroir & Lamy 1995; Chenu & Plante 2006), mais les MOP sont définies de façon opérationnelle comme ayant une taille >50 µm ce qui correspond dans cette étude aux fractions >250 et 250-63 µm. Les observations indiquent qu'une fraction importante, sinon prédominante de la matière organique des fractions grossières est présente sous forme de MOP. Les observations conduites au MEB, confirment que cette matière organique est soit libre soit occluse dans les agrégats.

Dans la fraction 250-63 µm (Figure IV–4c), la répartition des grains est plus homogène. Les débris organiques sont plus petits et moins visibles, et la structure en agrégats apparaît aussi clairement. Les grains plus foncés représentent les grains enrichis en MO. La fraction 63-20 µm (Figure IV–4d) se caractérise par la présence dominante de grains de taille homogène et anguleux, de composition chimique principalement minérale. Les cristaux de quartz facilement reconnaissables sont très abondants. Les oxydes de Fer sont reconnaissables du fait de leurs structures arrondies. Les micro-agrégats, caractérisés par l'agglomération des argiles et la matière organique sont difficiles à détecter.

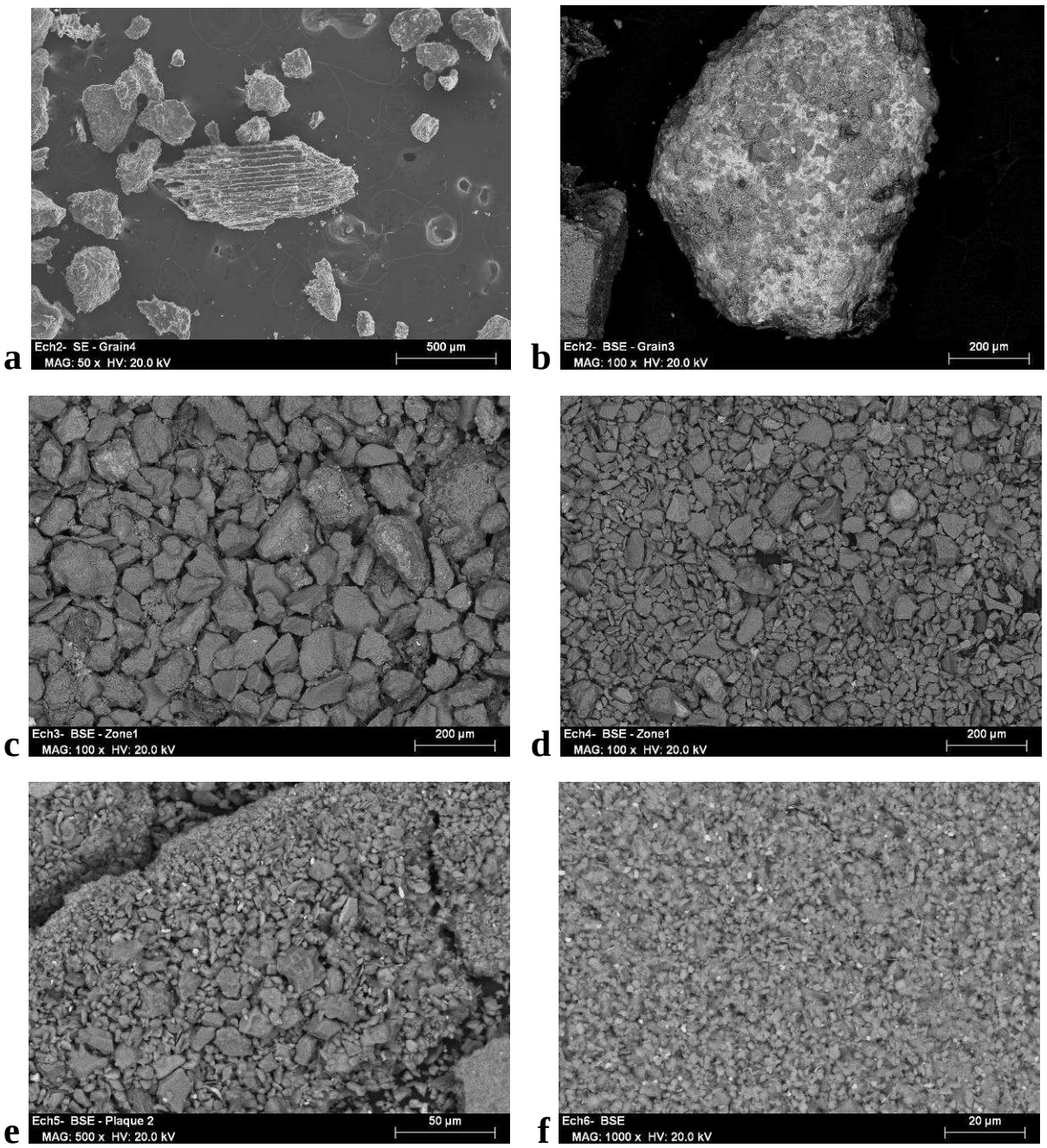


Figure IV–4 Observations au microscope électronique à balayage (MEB) des cinq fractions granulométriques du sol de Clessé obtenues par fractionnement physique non déstructurant : >250 (a), exemple d'agrégat de la fraction >250 µm (b), 250-63 µm (c), 63-20 µm (d), 20-2 µm (e), <2 µm (f). Les images ont été obtenues sur MEB au CMTC de G-INP.

La fraction 20-2 µm (Figure IV–4e), est plus homogène lorsqu'on l'observe en microscopie à cause de la limite de résolution du MEB utilisé. Cette fraction est majoritairement constituée d'argile agrégée formant de petits conglomérats. Dans cette fraction, on constate une forte présence d'agrégats mixtes de très petite taille et des minéraux primaires. Les éléments de la fraction fine (<2 µm) apparaissent trop petits pour être bien différentiés à cette résolution. Néanmoins, le signal chimique moyen porte la signature des argiles prédominantes dans cette fraction (Figure IV–4f). Globalement le MEB met bien en évidence les différences structurales et texturales de l'ensemble des fractions granulométriques étudiées.

IV-3-2 Caractérisation chimiques des fractions granulométriques

IV-3-2-1 Composition chimique des fractions granulométriques du sol de Clessé

Les concentrations totales en éléments représentatifs des majeurs (Ca, Mg, K, Na), des oxydes (Fe, Mn) et des argiles (Al) sont présentées dans le Tableau IV-3, afin d'étudier la composition chimique en cations majeurs du sol de Clessé. Nous avons réalisé l'ensemble de ces analyses pour caractériser la distribution des cations majeurs dans les fractions granulométriques.

Tableau IV-3 Concentrations en éléments majeurs ($mg.g^{-1}_f$) extraits à l'eau régale dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère.

Sol	Fractions	Concentration en éléments ($mg.g^{-1}_f$)							
	µm	Fe	Mn	Al	Ca	Mg	K	Na	Cu
Contrôle (NA)	>250	52.25	4.80	9.87	9.55	1.25	1.08	0.02	0.28
	250-63	25.02	1.17	16.29	5.92	2.35	2.21	0.03	0.25
	63-20	7.38	0.20	4.01	0.81	0.69	0.52	0.002	0.02
	20-2	30.03	0.65	18.86	3.47	3.15	2.51	0.03	0.13
	<2	58.97	0.72	43.46	5.37	5.0	5.46	0.06	0.15
Compost de Conifère (CC)	>250	31.37	4.25	7.63	9.79	1.39	0.79	0.02	0.26
	250-63	20.43	1.10	8.76	6.48	1.21	0.99	0.02	0.17
	63-20	7.03	0.23	3.47	1.19	0.67	0.41	n.d.	0.02
	20-2	27.95	0.61	17.81	4.45	2.89	2.22	0.02	0.12
	<2	57.23	0.67	40.47	5.81	4.85	4.74	0.06	0.12

n.d. : non déterminé car valeurs sous la limite de détection.
Les concentrations normalisées sont présentées en pourcentage en Annexe K

Comme attendu, la composition chimique en ces éléments majeurs et métalliques est globalement similaire entre les deux sols. L'apport de matière organique ne modifie que faiblement la distribution de ces éléments, excepté pour le Fe, l'Al, et le K des fractions grossières. Mais les concentrations en ces éléments varient fortement entre les fractions granulométriques.

L'élément Al, qui est considéré représentatif des argiles, est le plus concentré dans la fraction <2 µm, comme attendu, avec des teneurs de 43 et 40 $mg.g^{-1}_f$ pour les sols NA et CC, respectivement. Sa concentration est la plus faible dans la fraction 63-20 µm (4 $mg.g^{-1}_f$) et moitié moins concentrée dans la fraction 20-2 µm (environ 18 $mg.g^{-1}_f$) par rapport à la fraction <2 µm. La concentration en Al est 3 à 5 fois plus faible dans les fractions >250 et 250-63 µm, indiquant que ces fractions riches en matière organique, contiennent des quantités significatives d'argiles présentes sans doute impliquée dans la macro-agrégation.

Globalement, le Fer est l'élément le plus abondant des éléments analysés. Sa concentration est la plus élevée dans les fractions >250 et <2 µm. Ceci indique que cet élément peut

développer une réactivité non négligeable sous forme d'oxyde, principalement dans les fractions grossières. Dans les fractions fines, cet élément est vraisemblablement intégré dans le réseau cristallin des argiles ou sous forme d'oxyde et d'hydroxyde. On observe que la concentration en Fe (lié aux constituants solides) est plus faible dans le sol amendé. En effet, l'ajout de compost diminue la concentration en Fe dans les fractions grossières par l'augmentation de sa solubilité par les chélates organiques.

La concentration en Manganèse (Mn) est maximale dans les deux fractions grossières (>250 µm et 250-63 µm) (Tableau IV-3). Le Mn est présent à l'état natif dans les sols, mais il est aussi fortement utilisé comme fertilisant pour améliorer l'efficacité de la vitamine B1 des plantes. Ceci induit donc une forte introduction du Mn dans les végétaux (plant de vigne), et sa présence majoritaire dans les fractions riche en débris végétaux peu dégradés.

Pour les concentrations en Na et K, on constate une forte concentration dans la fraction <2µm de ces éléments qui sont probablement principalement associés aux argiles, ce qui explique les fortes teneurs dans cette fraction et que l'amendement en MO ne modifie pas ces concentrations.

Les concentrations en Ca sont plus importantes dans les deux fractions grossières probablement en lien avec son origine biologique. Les concentrations en Mg sont moins élevées que le Ca. Le Mg se distribue principalement dans les fractions fines (20-2 et <2 µm) en relation avec son association des argiles concentrées.

La concentration en Cuivre (Cu) est similaire pour les deux sols. Les deux fractions grossières (>63 µm) présentent les concentrations maximales en cuivre, en relation avec la matière organique du sol. Dans les deux fractions fines (<20 µm), les concentrations en Cu sont élevées mais légèrement inférieures à celle des fractions grossières. Dans ces fractions, le cuivre est probablement principalement associé aux argiles. La fraction intermédiaire (63-20 µm) présente des concentrations faibles en cuivre.

La fraction 63-20 µm est la plus pauvre en tous les éléments analysés. Celle-ci est principalement constituée de tectosilicates insensibles à l'attaque à l'eau régale, ce qui confirme la présence abondante de quartz et plus généralement de phénocristaux de minéraux primaires déjà constatée en microscopie électronique à balayage (Figure IV–4c), et donc très peu d'agrégat.

IV-3-2-2 Distribution et dynamique du Carbone Organique Total (COT) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé.

En 2008, au moment du prélèvement des sols, les teneurs globales en COT mesurées étaient de 15.3 et 30 $mg.g^{-1}_{ss}$ dans les sols NA et CC respectivement en accord avec l'amendement organique. Les concentrations en carbone organique total (COT) dans les fractions granulométriques sont présentées dans la Figure IV–5.

De la même manière que dans les sols non fractionnés (Chap. III), on observe que les concentrations en COT dans toutes les fractions granulométriques du sol CC sont supérieures à celles des fractions du sol NA. La concentration en COT est minimale pour la fraction 63-20 µm (4 $mg.g^{-1}_{ss}$), intermédiaire pour les deux fractions fines (20-2 et <2 µm, 19 et de 22 $mg.g^{-1}_{ss}$ pour les sols NA et CC, respectivement) et maximales pour les fractions grossières (>250 et 250-63 µm). La concentration en COT de la fraction >250 µm est de 34.7 et 107.6 $mg.g^{-1}_{ss}$, et pour la fraction 250-63 µm de 23.6 et 51.1 $mg.g^{-1}_{ss}$ pour les sols NA et CC, respectivement. Dans ces deux dernières fractions, l'apport de matière organique a induit une forte augmentation de la teneur totale en carbone. Les concentrations en COT dans le sol CC de ces fractions sont respectivement trois fois (fraction > 250 µm, 107.6 versus 34.7 $mg.g^{-1}_{ss}$) et deux

fois (fraction 250-63 µm, 51.1 versus 23.6 $mg.g^{-1}_{ss}$,) plus élevées que dans le sol NA. Ces résultats montrent que la MO ajoutée au sol se distribue principalement dans les fractions grossières (>63 µm). Les résultats acquis au cours de cette étude sont en bon accord avec la littérature, puisque de nombreuses études ont montré que la concentration en carbone augmente avec la taille des agrégats et ce particulièrement dans les sols sous cultures (Six et al. 2000; Christensen 2001; John et al. 2005; Oorts et al. 2007; Lugato et al. 2010). Les teneurs en COT des fractions les plus fines n'augmente que très peu sous l'effet de l'amendement, indiquant la présence dans ces fractions d'une MO plus évoluée avec un temps de dégradation plus long. Ces résultats indiquent que dans les fractions fines des sols le carbone présent dans les micro-agrégats est stable et sous forme de complexes argilo humique, qui sont donc des sites majeurs de la stabilisation de la MO. Dans ces complexes le carbone est soit adsorbé sur les argiles et les limons, soit piégé sous forme de très petites particules organiques (Virto et al. 2008).

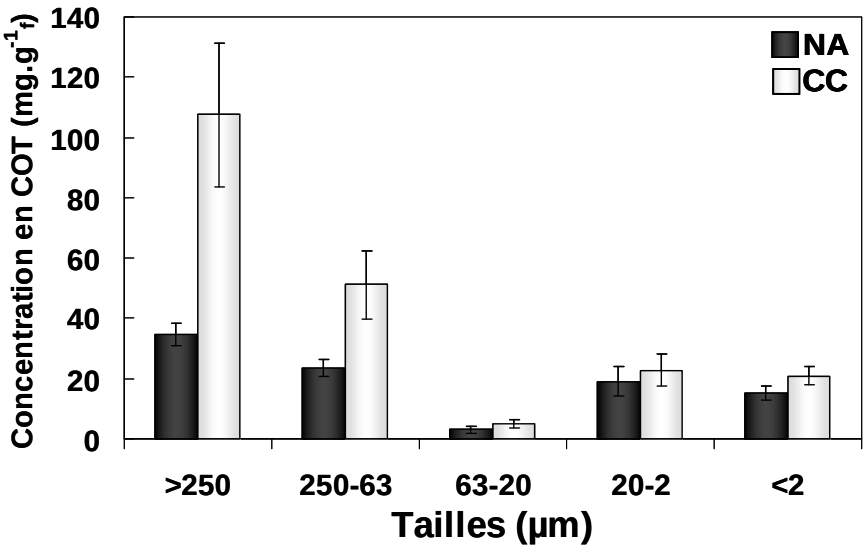


Figure IV–5 Concentration en Carbone Organique Total (COT) des fractions granulométriques ($mg.g^{-1}_{f}$) du sol de Clessé amendé (CC) en compost de conifère ou non (NA).

Dans les macro-agrégats des sols, on trouve à la fois des micro-agrégats et des constituants de grande taille (organique ou minérale) liées ensemble par des agents organiques tels que des polysaccharides bactériens ou exsudats racinaires, AH, AF, …(Tisdall & Oades 1982; Elliott 1986; Six et al. 2000; John et al. 2005). Cette organisation spatiale implique donc une augmentation de la teneur en COT avec la taille des fractions granulométriques comme on l'observe particulièrement dans le sol amendé en MO, en accord avec le concept de la hiérarchisation spatiale des sols en agrégats.

L'évolution de la concentration en COT et son taux de dégradation dans les fractions granulométriques des deux sols NA et CC est présentée dans la Figure IV–6. Le calcul des taux de dégradation du C a été effectué à partir de l'Eq IV-3 en faisant l'hypothèse que la dégradation du COT est constante au cours des deux années d'incubation en conditions contrôlées et constantes. Les valeurs négatives du taux de dégradation du COT signifient que l'accumulation de carbone dans ces fractions est supérieure à sa dégradation.

$$T_C = \frac{[COT]_{final} - [COT]_{initial}}{T} \qquad \textbf{[IV-2]}$$

Avec : T_C : le taux de dégradation du COT, $[COT]_{initial}$ et $[COT]_{final}$ les concentrations en COT au début et à la fin de l'incubation en mésocosmes de laboratoire, et T le temps (année) d'incubation.

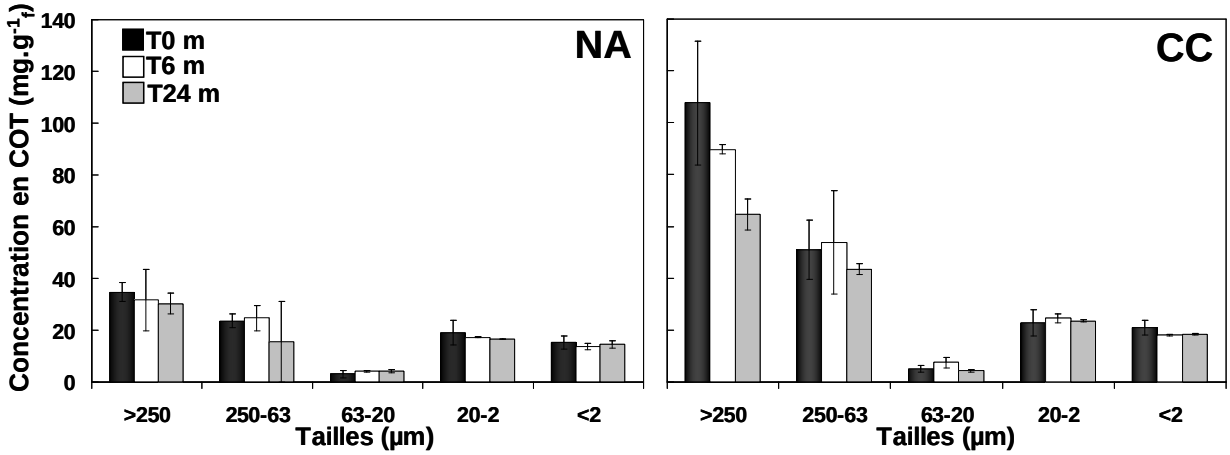


Figure IV–6 Evolution de la distribution du carbone organique total (COT) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé non amendé (NA) ou amendé (CC) en compost de conifère, au cours des 2 ans d'incubation (0, 6, et 24 mois) en conditions contrôlées (mésocosmes de laboratoire). Les incertitudes son calculés à partir des mesures de réplicats.

Comme dans le sol non fractionné, la concentration en COT dans toutes les fractions granulométriques du sol contrôle n'évolue pas significativement. Par conséquent les taux de dégradation annuels, de la MO présente dans chaque fraction, sont faibles au cours de l'incubation. De ce fait, le sol contrôle (NA) semble dans un état d'équilibre en terme de turnover du C organique, sur les deux années d'incubation. Nous associons la diminution du COT dans les fractions fines (22 %) à la minéralisation du C par les microorganismes.

Au contraire dans le sol CC, on observe une évolution temporelle de la teneur en carbone organique propre à chaque fraction granulométrique (Figure IV–6b). Les teneurs en C de l'ensemble des fractions du sol CC restent supérieures à celles du sol contrôle, même après les deux années d'incubation.

La fraction grossière (>250 µm) présente la dégradation du C organique la plus élevée, passant de 107.6 à 64.5 $mg.g^{-1}_{ss}$ soit un T_C de 21.5 $mg.g^{-1}_{ss}.an^{-1}$. Cette dégradation importante et préférentielle de la MO des fractions grossières a déjà été observée par Grosbellet et al. (2011) pour différents types de MO et sur le même temps d'incubation. Au contraire, la teneur en COT de la fraction des micro-agrégats (20-2 µm) reste stable.

Nos résultats montrent que le turnover de la MO est plus important dans les fractions grossières que dans les fractions fines, lié à sa nature chimique différente et la présence de MO « libre » dans le sol. La MO des fractions fines est plus intimement liée aux autres constituants des sols (notamment argiles) ce qui limite son accessibilité aux microorganismes notamment aux champignons. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui a largement démontré la plus grande stabilité temporelle de la MO des fractions fines des sols agrégés (Ladd et al. 1993; Chenu et al. 2000; Rumpel et al. 2004).

La dégradation importante du COT dans la fraction grossière du sol CC est certainement en lien avec la nature spécifique du carbone dans cette fraction. Or le carbone de cette fraction est caractérisé par la présence de MOP. Dans les sols, les MOP ne représentent qu'une forme parmi d'autres du carbone, puisque la MO existe également sous forme d'acides humiques (AH) et fulviques (AF), plus dégradée, ou encore sous forme de complexes argilo-humiques,

plus stable. Les résultats indiquent que les MOP 'fraîches', qu'on peut apparenter en première approche à des morceaux de bois et de feuilles peu dégradés, se dégradent plus vite que les autres types de matière organique présents dans le sol.

Ces résultats nous conduisent à quantifier la teneur en MOP dans cette fraction par un calcul indirect. Le taux de carbone dans les MOP, c'est-à-dire la masse de carbone contenue dans les MOP divisée par la masse des MOP a été déterminé dans le sol de Clessé en 2003, l'année du dernier amendement apporté aux sols (Sebastia et al. 2008). Le taux était alors de 36 % pour les $MOP_{2000\text{-}200}$ (sols NA et CC), et de 30 % (CC) et 19 % (NA) pour les $MOP_{200\text{-}50}$. Les MOP ont été extraits sur les mêmes parcelles et avec le même protocole que ceux extraits en 2008 (I. LAMY, (Martins et al. 2010)). En supposant les mesures de 2003 applicables à notre campagne d'échantillonnage, nous proposons l'équation suivante pour calculer le pourcentage de carbone intégré dans les MOP collectées en 2008 :

$$\frac{C_{MOP}}{C_f} = \frac{\frac{m_c}{m_{MOP}} \times [MOP_f]}{COT_f} \qquad \textbf{[IV-3]}$$

C_{MOP} la masse en carbone issu des MOP, C_f la masse de carbone de la fraction, m_C la masse du carbone dans les MOP de la fraction, m_{MOP} la masse des MOP de cette fraction, $[MOP_f]$ la concentration des MOP ($mg_{MOP}.g_f^{-1}$) et COT_f la concentration en carbone dans la fraction.

Les résultats correspondants sont présentés dans le Tableau IV-4. Ces calculs indiquent qu'en 2008, dans la fraction 250-63 µm des sols NA et CC 50 % du carbone était présent sous forme de MOP, et l'autre moitié du carbone était intégrée dans les macro-agrégats. La fraction >250 µm contient moins de carbone sous forme de MOP : 20 % et 33 % pour les sols NA et CC du carbone seulement (Tableau I-5). Ce résultat indique que la dégradation des MOP de la fraction >250 µm est rapide, et génère des petits fragments intégrant la fraction 250-63 µm. Les $MOP_{200\text{-}50}$ ainsi accumulées dans la fraction 250 à 63 µm ont un turnover plus lent, expliquant ainsi leur accumulation relative par rapport à la fraction plus grossière.

Tableau IV-4 Récapitulatif de la masse de MOP, la concentration en COT, et la proportion de carbone de la fraction issu des MOP (C_{MOP}/C_f), dans les fractions grossières du sol de Clessé.

Sols	Fraction (f) (µm)	% $[MOP_f]$* $mg_{MOP}.g^{-1}_f$	COT_f $mg_C.g^{-1}$	% m_C / m_{MOP} mg_C/mg_{MOP}^{-1}	% C_{MOP}/C_f $g_{CMOP}.g^{-1}_{Cf}$
Contrôle (NA)	>250	3.22 %	34.7	36 %	33.4 %
	250-63	5.08 %	23.6	19 %	41 %
Amendé (CC)	>250	6.49 %	107.6	36 %	22 %
	250-63	8.85 %	51.12	30 %	52 %

*Les valeurs des concentrations en MOP dans le sol de Clessé ont été obtenues par I. LAMY prélevé dans les mésocosmes de laboratoire.

Nos résultats montrent que l'évolution du carbone semble spécifique à chaque fraction granulométrique du sol car contrôlée par des processus différents. Ainsi, la MO localisée dans les micro-agrégats est plus stable car difficilement accessibilité aux microorganismes et soumise à des conditions physiques non favorables à la minéralisation (anoxie, forte adsorption sur les minéraux des sols) (Chenu & Stotzky 2002). Dans toutes les fractions du

sol CC, la teneur en C diminue ou est stable en accord avec la baisse du taux de carbone dans le sol non fractionné.

IV-3-2-3 Caractérisation et dynamique du pH dans les solutions des fractions granulométriques du sol de Clessé

Le pH_w des fractions granulométriques de sol est présenté dans la Figure IV–7. Avant la contamination le pH_w des fractions granulométriques des sols varie entre pH 6.5 et 7.1, les fractions grossières, les plus riches en MO étant les plus acides. La variation en pH est donc globalement plutôt faible entre les fractions. De façon générale, le pH augmente avec la diminution de la taille des fractions. De plus, l'amendement organique modifie faiblement le pH des fractions granulométriques.

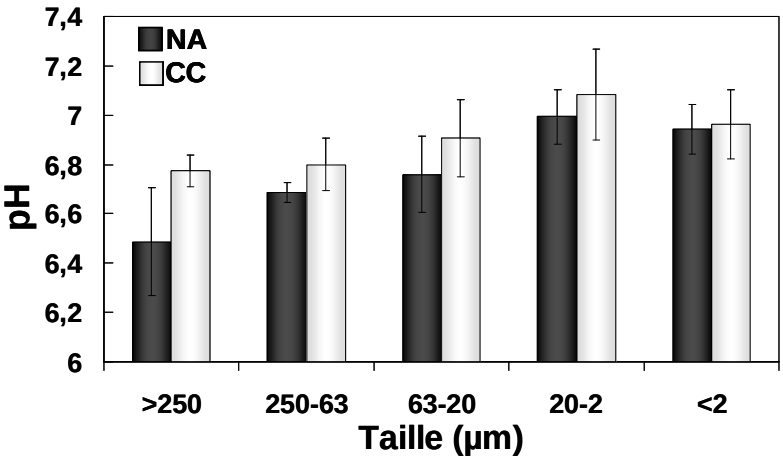


Figure IV–7 pH_w à l'eau des fractions granulométriques du sol de Clessé avant la contamination au cuivre dans le sol contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC). Les barres d'erreurs ont été calculées avec des duplicats.

Le pH des fractions granulométriques a évolué au cours du temps et de façon différente entre les fractions (Figure IV–8). Globalement, l'évolution du pH dans les fractions est similaire entre les deux sols, l'amendement en compost ayant un effet faible sur le pH des fractions. Dans les fractions fines (20-2 µm et <2 µm), le pH montre une tendance à l'augmentation dans les deux sols sur 24 mois, et reste autour des valeurs de pH du sol non fractionné proche de 7. La fraction 63-20 µm présente une diminution de son pH au cours des 6 premier mois (principalement pour le sol CC) puis se stabilise à une valeur d'environ 6.5 pour les deux sols.

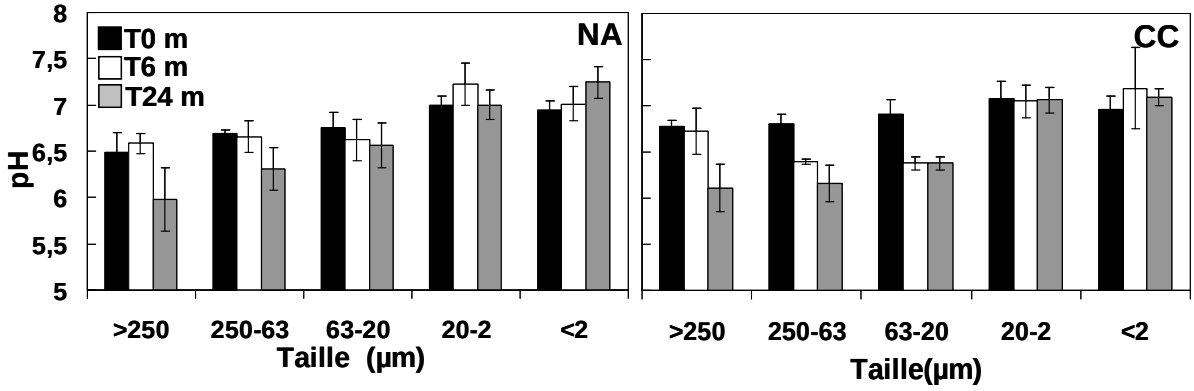


Figure IV–8 Dynamique du pH dans les fractions granulométriques du sol contrôle (NA) et du sol amendé (CC) au cours de l'incubation à T0 (noir), T6mois (blanc) et T24mois (gris). Les barres d'erreurs sont calculées comme l'écart type entre les réplicats.

En revanche, le pH des fractions grossières (>63 µm) diminue tout du long de l'incubation. Les plus grandes variations de pH sont observées principalement dans la fraction >250 µm, et surtout dans le sol CC. Dans cette fraction, le pH passe de 6.5 à 6.0 et de 6.8 à 6.1 pour les sols NA et CC, respectivement. Le taux de minéralisation de la MO calculé (Eq IV-3) était important dans cette fraction et dans le sol CC. On observe une corrélation entre l'évolution du COT et celle du pH de ces fractions. La dégradation de la MO grossière du sol induit une acidification des fractions grossières probablement en lien avec l'augmentation de la respiration microbienne lié à la plus forte concentration en nutriment dans cette fraction (production de CO_2 acide).

Malgré une stabilité des pH dans les sols non fractionnés au cours de l'incubation (Figure III–4), les profils de pH changent avec une amplification de l'acidité des fractions grossières (riche en MO qui est dégradée et induit une libération de protons), et une amplification de l'alcalinité des fractions fines (enrichissement en OH, stabilisation de la MO), la fraction 63-20 µm est relativement stable.

IV-3-2-4 Capacité d'échange protonique des fractions granulométriques du sol de Clessé.

Les résultats des titrages potentiométriques des fractions granulométriques du sol de Clessé sont présentés dans la Figure IV–9 et le Tableau IV-5. On constate une augmentation de la réactivité dans toutes les fractions du sol amendé en matière organique par rapport aux fractions du sol NA. Les résultats montrent que le sol amendé échange plus de protons que le sol non amendé et la réactivité aux protons de chaque fraction, exprimée ΔHs (Eq. [IV-5]), dépend donc de l'amendement par l'augmentation générale mais variable dans les fractions mais aussi et surtout de la nature de la fraction granulométrique.

Ainsi, la réactivité est maximale pour les fractions, < 2, 250-63, et > 250 µm, plus faible pour la fraction 20-2 µm, et presque nulle pour la fraction 63-20 µm. Par rapport à ces variations la réactivité du sol non fractionné est intermédiaire à celle des fractions, comme attendu représentant une réactivité moyenne de l'ensemble des fractions. La fraction 63-20 µm de faible réactivité aux protons, apparaissait déjà en MEB comme celle contenant le moins de matière organique et d'argiles. Le titrage acide-base confirme donc la faible teneur de ces composés hautement réactifs dans cette fraction.

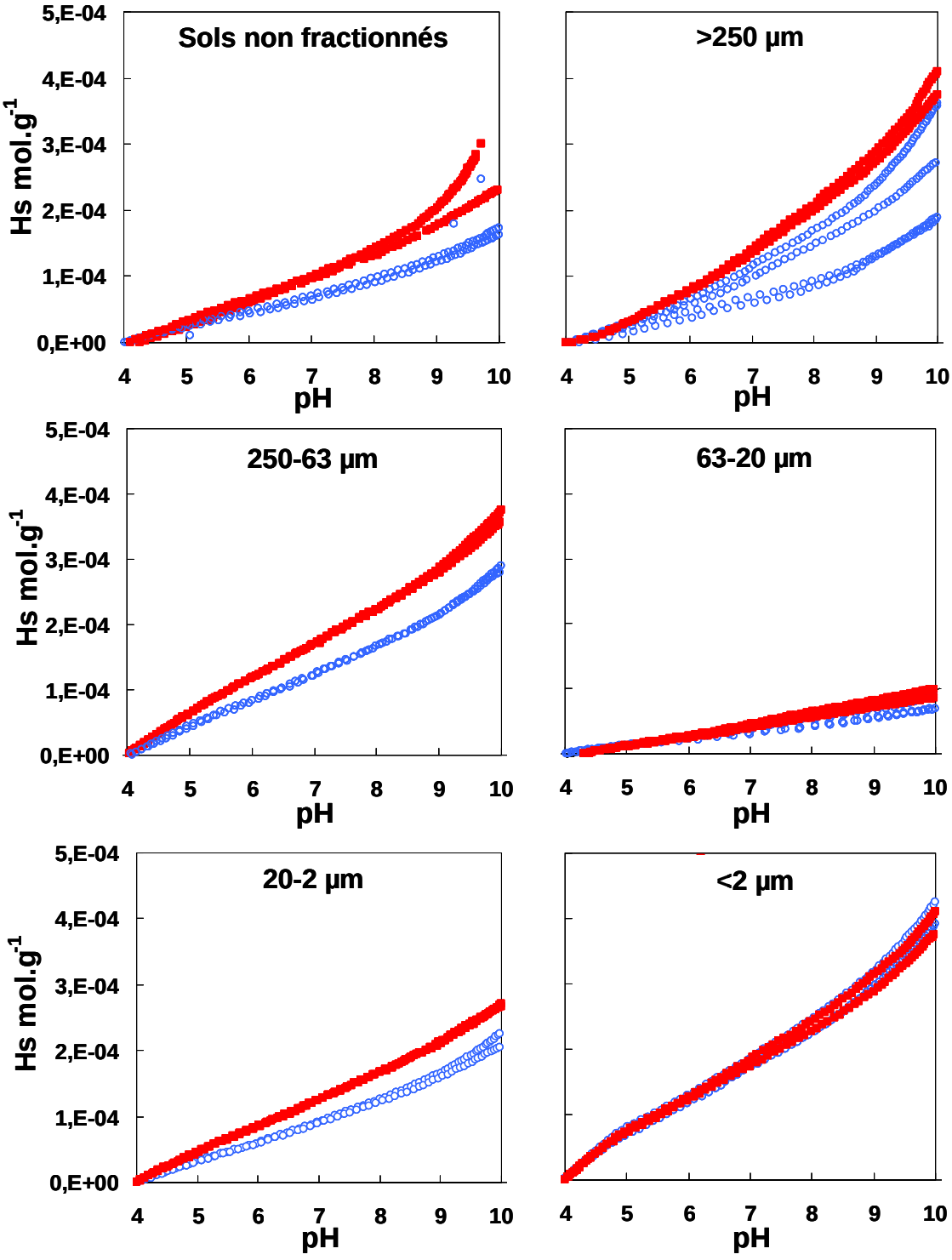


Figure IV–9 Courbes de titration acide base des fractions granulométriques du sol de Clessé, non amendé (NA, bleu vide) et amendé en compost de conifère (CC, rouge plein), entre les pH 4 et 10. Les différentes courbes correspondent aux différents échantillons analysés.

La réactivité de la fraction <2 µm dans les sols NA et CC sont très proches, par rapport aux autres fractions, indiquant que l'amendement en compost n'a pas affecté cette fraction. En effet, on observe des valeurs de ΔHs de 0.41 $mmol.g^{-1}_{ss}$ et 0.40 $mmol.g^{-1}_{ss}$ pour le sol NA et CC, respectivement. Bien que la réactivité aux protons dans cette fraction est la plus importante car elle concentre les argiles et les complexes argilo humique stable.

La fraction siliceuse (63-20 µm) présente également une réactivité aux protons faible et stable malgré l'amendement organique, avec la réactivité ΔHs la plus faible de toutes les fractions de 0.08 mmol.g^{-1}_{ss} et 0.10 mmol.g^{-1}_{ss} pour NA et CC respectivement, en accord avec les faibles teneurs en MO et argiles de cette fraction.

Les autres fractions ont des réactivités variables entre les sols NA et CC indiquant un enrichissement en matière organique en lien avec l'amendement organique. La réactivité de la fraction 20-2 µm est intermédiaire par rapport aux autres fractions, mais significativement différente entre le sol NA (0.22 mmol.g^{-1}_{ss}) et CC (0.27 mmol.g^{-1}_{ss}). En effet, comme constaté précédemment, cette fraction est composée à la fois de micro-agrégats et de particules siliceuses peu réactives, ce qui explique sa réactivité moyenne par rapport aux autres fractions ainsi que la faible (mais significative) différence de réactivité entre les deux sols.

Tableau IV-5 Réactivité aux protons (ΔHs) en mmol.g^{-1}_{ss} des fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère.

Sol	Taille des fractions granulométriques (µm)					
	ST*	**>250**	**250-63**	**63-20**	**20-2**	**<2**
Contrôle (NA)	0.18	0.25	0.28	0.08	0.22	0.41
Amendé (CC)	0.21	0.39	0.37	0.10	0.27	0.39

*ST : Sol non fractionné

La fraction >250 µm présente un ΔHs très élevé (proche de celui de la fraction <2 µm). L'observation de cette fraction grossière en microscopie électronique (MEB) nous a permis de voir qu'elle est riche en débris végétaux comme cela a déjà été observé dans d'autres études (Besnard et al. 2001; Dumat et al. 2006; Sebastia et al. 2008). La différence de réactivité des fractions >250 µm des deux sols (NA et CC) est bien marquée et incontestablement liée à la différence de COT. Ceci indique que dans cette fraction, la réactivité est essentiellement due à la MO et peu ou pas aux argiles. Par ailleurs, on constate pour cette fraction des variations relativement importantes entre les replicats, sans doute en relation avec l'hétérogénéité de cette fraction et à la prise d'échantillon par rapport à la taille de ses constituants.

La fraction 250-63 µm présente un ΔHs très proche de celui de la fraction grossière >250 µm, malgré une teneur en COT deux fois plus faible (Figure IV–5). La réactivité de cette fraction est aussi essentiellement contrôlée par la MO. Besnard et al. (2001) et Sebastia et al. (2008) ont montré que la concentration en MOP (donc en carbone) diminue avec la taille des fractions, mais que la réactivité de ces MOP augmente avec la diminution de leur taille en relation avec l'augmentation de leur surface spécifique et de leur biodégradation. Ces auteurs ont ainsi mis en évidence que les MOP sont beaucoup plus réactives que les minéraux, à cause de leur forte concentration en site réactifs de type OH, COOH, NH, capables d'échanger des protons. Nous supposons que c'est la raison pour laquelle la fraction 250-63 µm, qui a une plus faible concentration en carbone, est aussi réactive que la fraction >250 µm.

Nos résultats montrent donc que la réactivité des fractions grossières est surtout liée à la MO et que celle des fractions fines est liée aux argiles et la MO très évoluée. Chaque fraction granulométrique du sol de Clessé présente donc une capacité d'échange protonique différente ce qui leur confère sans doute une réactivité variable avec le cuivre.

Pour étudier plus précisément l'impact de l'amendement en MO sur la réactivité aux protons des fractions granulométriques, nous avons calculé le ratio entre la concentration en

proton et la concentration en carbone de chaque fraction granulométrique à T0 mois (Figure IV–10).

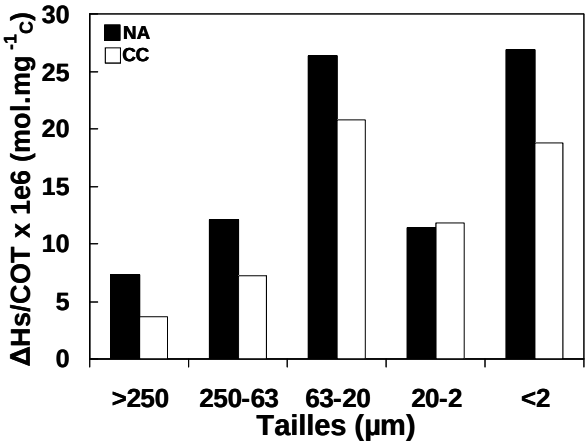


Figure IV–10 Valeurs du ratio ΔHs/COT dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère.

L'évolution du rapport ΔHs/COT est inversement proportionnelle à la taille de la fraction granulométrique, si on ne tient pas compte de la fraction 63-20 µm, qui est faiblement concentrée à la fois en Cu et en MO pour les deux sols. Le rapport ΔHs/COT devrait être constant si (i) la matière organique était la seule à échanger des protons avec la solution, et si (ii) la MO de toutes les fractions avait la même réactivité acide-base. Les valeurs élevées de ce rapport dans les fractions fines (<20 µm) indiquent que d'autres substrats (e.g. les argiles) contribuent à l'échange acide-base, ou que la MO de ces fractions est beaucoup plus réactive. Les argiles ne peuvent contribuer à l'échange de protons que par leurs sites en bordure de feuillet d'argile (Tournassat et al. 2004). Les sites en bordure de feuillet des argiles peuvent ainsi contribuer à l'augmentation de ce rapport, tel qu'observé dans la Figure IV–10. Les complexes argilo-humiques peuvent aussi contribuer à la réactivité acide-base des fractions, et ainsi augmenter ce rapport grâce à la forte réactivité de leur MO.

Pour les fractions grossières (>250 et 250-63 µm), on constate que le sol NA présente des rapports ΔHs/COT plus élevés que le sol CC, ce qui indiquent que la MO du sol CC est plus réactive que celle du sol NA, puisque nous avons montré que les fractions contiennent moins de carbone dans le sol NA que dans le sol CC. Donc soit la MO du sol CC est plus réactive que le sol NA, soit la part non organique dans ces fractions (présent dans les macro-agrégats) contribue davantage à la réactivité aux protons. De manière plus détaillé, on peut observer que le rapport ΔHs/COT augmente fortement de la fraction >250 µm à la fraction 250-63 µm et de manière plus marquée dans le sol CC que dans le sol NA. Cette augmentation ne peut pas être associée à une forte augmentation de la concentration en argile entre ces deux fractions. Nous supposons donc qu'une augmentation de la réactivité de la MO dans la fraction 250-63 µm, et probablement en relation avec l'enrichissement en MOP de cette fraction.

La réactivité des fractions aux protons est donc fortement dépendante de la composition chimique des fractions. Nous avons alors essayé de voir si la composition (chimie et réactivité) des fractions granulométriques modifie la distribution et la spéciation du cuivre.

IV-3-2-5 Modélisation de la réactivité des fractions granulométriques du sol de Clessé

La capacité d'échange de H^+ des fractions granulométriques a été mesurée par titrage et quantifiée par la différence de concentration en protons entre pH 4 et 10 (Tableau IV-5). De plus l'analyse du ratio ΔHs/COT, présentés ci-dessus, nous a indiqué que la réactivité des fractions granulométriques est contrôlée principalement par deux substrats, la MO et les argiles.

L'élaboration d'un modèle de distribution de la réactivité entre les fractions requiert la connaissance de la composition élémentaire des MOP. Cette composition est susceptible d'évoluer durant leur dégradation. On peut considérer que les MOP de très grande taille (celles présentes dans la fraction > 250 µm) sont apparentées à la matière dont ils sont issus (bois et aiguilles pour les conifères), et que les MOP de petite taille se situent dans un état intermédiaire entre la matière d'origine et celle macromoléculaire de type AH et AF. Il s'agit donc de déterminer les compositions chimiques de ces deux extrêmes de dégradation.

La composition élémentaire massique du bois sec est plutôt stable quel que soit le bois considéré, elle est donnée à 50 % C, 6 % H et 44 % O (Goyal et al. 2008). On ne considère pas alors les hétéro-atomes (S, N…) et les cendres qui représentent moins de 1 % de la masse sèche. Cette composition massique est bien présentée par une composition élémentaire molaire C : H : O de 3 : 4 : 2. Nous avons donc fait l'hypothèse que la formule chimique élémentaire des MOP non dégradées est de $C_3H_4O_2$.

Dans un premier temps, nous proposons de définir une stœchiométrie pour cette matière organique nécessaire pour la modélisation. Les stœchiométries sont toutefois assez variables, car dépend de toute évidence de l'état de dégradation de la matière organique. Les acides humiques, normalement plus abondants dans les sols que les acides fulviques, contiennent proportionnellement moins d'oxygène. Sur cette base, nous avons retenu comme stœchiométrie modèle de la matière organique réactive du sol pour la modélisation le rapport C : H : O de 2 : 2 : 1 soit $C_{2n}H_{2n}O_n$ (Ghabbour & Davies 2005).

Les formules calculées, des modèles d'acides humiques (AH) et fulviques (AF), repris de (Matynia et al. 2010), tels que $C_{73}H_{49}N_3O_{32}$ (Stevenson 1994) et $C_{368}H_{501}N_{23}O_{89}$ (Schulten & Schnitzer 1993) pour les AH, et que $C_{27}H_{26}O_{18}$ (Buffle 1977) et $C_{37}H_{35}NO_{32}S$ (Alvarez-Puebla et al. 2006) pour les AF, se rejoignent dans le sens qu'ils montrent qu'il y a environ autant de carbone que de protons (voir un peu plus de H^+), mais moins d'oxygène que de carbone. On perçoit que les rapports élémentaires, doivent être similaires à ceux du bois sec. Plus concrètement, la Suwannee River NOM [4](Natural Organic Matter), considérée comme un standard de la matière organique dégradée (acide humique), présente un rapport molaire élémentaire calculé C : H : O de 2 : 2 : 1.2 ce qui est très proche de celui du bois. Ceci montre que le rapport élémentaire de la matière organique ne change que très faiblement entre l'état initial et celui macromoléculaire tel qu'existant sous forme d'AH et AF dans le sol. Dans ce contexte, il nous est donc possible de considérer une seule composition chimique pour toute la matière organique polynucléaire du sol.

Le taux de carbone présent dans les MOP prélevées en 2008 a pu être estimé (Sebastia et al. 2008). En revanche pour représenter la part exclusivement organique des MOP dans la modélisation nous nous baserons sur le taux de carbone calculé à partir de la composition théorique des matières organiques avec un rapport C : H : O unique de 3 : 4 : 2 qui exprime correctement le taux de carbone dans la matière organique aussi bien évoluée que brute.

[4] ***http://www.ihss.gatech.edu/ro_nom.html***

La capacité d'échange de protons est exclusivement liée à la réactivité acide-base de la MO. Dans un premier temps, on émet l'hypothèse forte, que la réactivité de la MO est proportionnelle à sa teneur en COT. La réactivité plus élevée s'observera ainsi dans le sol à teneur COT plus élevée, i.e. le sol amendé en composte (CC). En considérant la matière organique comme seule composante réactive on peut calculer une réactivité théorique par le rapport entre ΔHs et COT, de 0.176 ÷ 0.015= 11.7 $mmol.g^{-1}_C$ pour le sol NA et de 0.213 ÷ 0.030 = 7.1 $mmol.g^{-1}_C$ pour le sol CC. La réactivité théorique de la MO est 1.6 fois plus faible dans le sol CC que dans le sol NA. Ces valeurs sont certes surestimées dans la mesure où toute la réactivité du sol est associée au carbone, et donc que toutes les autres phases (argiles, oxydes de Fer) sont considérées comme non réactives. Ces réactivités sont proches de celles typiquement constatées pour les titrages d'acides humiques et fulviques (Matynia et al. 2010). Plus concrètement, et à titre d'exemple, la réactivité des acides fulviques extraits en 2003 sur la MO de ce sol était de 7.2 et 6.7 mmol/gC pour les sols NA et CC, respectivement (Sebastia et al. 2008). Ces valeurs sont très proches des réactivités moyennes calculées du sol. Ceci indique donc bien que la matière organique est un des principaux substrats réactifs dans ce sol, de réactivité moyenne proche de celle des AH et AF.

Cette comparaison nous permet également d'estimer la densité de sites réactifs sur la matière organique. Cette réactivité théorique peut être représentée par une unité structurale $C_6H_8O_4$ pouvant échanger un proton (ou un métal). En effet, cette unité théorique réactive compte 144 masses élémentaires, et présente donc une réactivité de 6.9 mmol/g de matière organique. Cette réactivité correspond bien à celle constatée des AH et AF (Matynia et al. 2010). Ainsi 1 carbone sur 6 porterait un groupe fonctionnel réactif. Cette première estimation met ainsi en évidence la réactivité élevée du carbone dans le sol, pointant ainsi le caractère macromoléculaire de la MO réactive du sol.

Sur ces bases, il est possible d'établir un modèle de réactivité aux protons des fractions. Le carbone, surtout concentré dans les fractions grossières, contribue à la réactivité globale principalement dans ces fractions et minoritairement dans les fractions fines. Les argiles surtout concentrées dans les fractions fines contribuent à la réactivité principalement dans ces fractions et minoritairement dans les fractions grossières. La fraction 63-20 µm contenant très peu de carbone et très peu d'argiles est ainsi peu réactive. En première approche, nous supposons que les phases représentatives de la réactivité au cuivre seront le carbone pour la MO et la concentration en Al pour les argiles. La réactivité de la MO et des argiles est ainsi censée se distribuer proportionnellement à la distribution du COT et des ions Al (lié au solide), respectivement. Pour la MO, la corrélation supposée entre COT et réactivité est acceptée, même si on a observé des différences de réactivités du carbone entre les sols NA et CC. Pour les argiles, nous assimilons leur proportion avec la concentration en Al dans les fractions car l'eau régale utilisée pour l'extraire du sol n'attaque que faiblement les minéraux primaires contenant de l'aluminium tels les Feldspath. La concentration en Al diminue avec la taille des fractions granulométriques du sol de Clessé (Tableau IV-3) ce qui est en accord avec les observations MEB-EDX attestant l'existence d'agrégats argileux dans ces fractions, et une concentration très faible dans la fraction 63-20 µm, qui est pourtant riche en minéraux primaires.

La réactivité acide-base (ΔHs) des fractions mesurées a ainsi été reconstruite simplement par combinaison linéaire des concentrations relatives en Al et COT dans les fractions. Les premiers essais ont montré une reconstitution raisonnablement sur l'ensemble des fractions excepté pour la fraction 63-20 µm qui apparaît moins réactive que ce qui est mesuré et la fraction >250 µm du sol CC pour les raisons évoquées ci-dessous. La fraction 63-20 µm (Figure IV–9), en accord avec ses faibles teneurs en carbone et en aluminium (et donc en argiles réactives dans le modèle), présente une réactivité ΔHs faible. Toutefois, ces faibles taux ne permettent de reconstituer que 50 % de la réactivité ΔHs mesurée. On peut donc

considérer que des composés de concentration et donc réactivité mineure, tels les oxydes de Fer, constituent un 'fond' réactif non négligeable dans cette fraction de faible réactivité générale. Nous avons ainsi défini un 'résiduel' de réactivité protonique correspondant au déficit de réactivité constaté dans cette fraction. Nous prenons ainsi en compte un troisième substrat qui permet de combler le déficit de réactivité. Nous considérons que sa contribution à la réactivité globale est la même dans toutes les fractions. Elle sera donc faible pour les fractions plus réactives.

Nos contraintes de modélisation sont rappelées ci-dessous :

- La part modélisée de la réactivité liée à la MO, ΔHs_{MO}, est calculée en multipliant la concentration en COT de la fraction par la concentration en sites réactifs par gramme de carbone dans la fraction. La MO est considérée avoir une réactivité unique moyenne en accord avec Matynia et al. (2010). La réactivité ΔHs_{MO} modèle est ajustée aux valeurs ΔHs des fractions, en présence des autres contributions de la réactivité (ΔHs_{Al}, ΔHs_{Res}) en multipliant la concentration en COT des fractions par un même facteur multiplicateur (6.9 $mmol_{site}.g^{-1}_{C}$, pour une unité élémentaire de $C_6H_8O_4$).
- Comme la MO, les argiles sont considérées avoir une réactivité unique qui est proportionnelle à la concentration d'Al dans les fractions. La modélisation de la réactivité protonique des argiles inclue celle issue des complexes argilo-humiques dans la mesure que ceux-ci se distribuent fort probablement de la même façon que les argiles dans les fractions. La concentration ΔHs_{Al} est ajustée en multipliant la concentration d'Al des fractions par un même facteur multiplicateur fixé à 200000.
- Pour la part résiduelle de la réactivité protonique dans la fraction 63-20 µm nous faisons l'hypothèse que chaque fraction contient une concentration fixe de sites réactifs, ΔHs_{Res}, reflétant un 'fond réactif' de minéraux de réactivité mineure par rapport à la réactivité totale du sol lié à la MO et aux argiles. ΔHs_{Res} est calculé par différence de la réactivité constatée de la fraction 63-20 µm et de la réactivité calculée de la MO et des argiles. Elle est fixée à 0.0045 $mmol.g^{-1}_{ss}$.

La Figure IV–11 présente les résultats de cette modélisation considérant les trois contributions à la réactivité totale mesurée. Les valeurs numériques du modèle sont présentées dans l'Annexe H. Les réactivités calculées des fractions granulométriques du sol de Clessé représentent entre 90 et 132 % des réactivités mesurées quelque soit le sol, ce qui constitue une assez bonne reproduction de la valeur mesurée. Pour la fraction >250 µm du sol CC, la modélisation n'est pas très bonne car la réactivité totale modélisée représente 211 % de la réactivité mesurée.

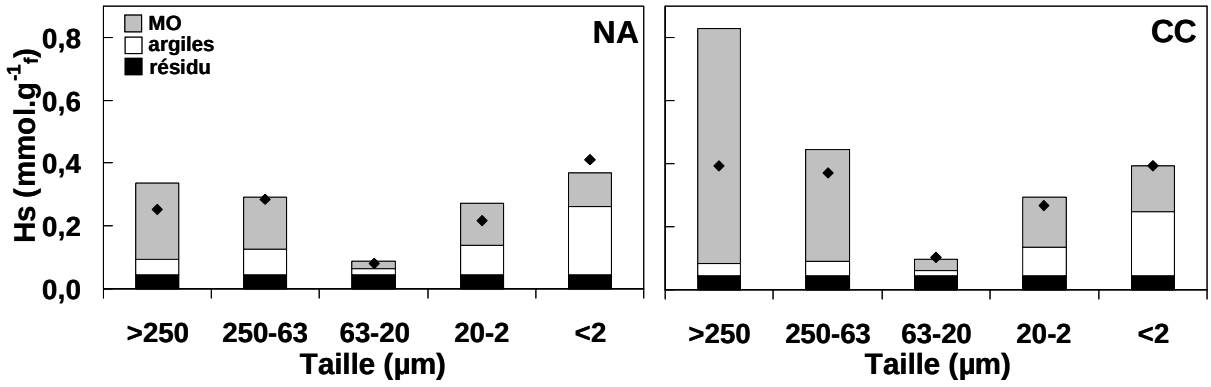


Figure IV–11 Modélisation de la répartition de la capacité d'échange de protons théorique entre la MO (gris), les argiles (blanc) et les autres composés (résiduel) du sol (noir) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé non amendé (NA) ou amendé en compost de conifère(CC). Les symboles en losange correspondent à la capacité d'échange aux protons de chaque fraction granulométrique mesurée par titrage.

Si on excepte la fraction 63-20 µm très minérale la réactivité acide-base (Figure IV–11) liée à la MO ainsi calculée diminue avec la taille de la fraction passant de 70 % dans la fraction >250 µm à 30 % dans la fraction <2 µm pour le sol NA. Par contre, la réactivité de la fraction >250 µm est clairement trop élevée dans le sol CC (190 %). Ce résultat indique que pour cette fraction, on surestime la réactivité liée à la MO, car celle-ci a une réactivité inférieure à celle fixée dans ce modèle. En effet, en considérant que la réactivité liée aux argiles dans cette fraction (10 %) et les autres composés de la fraction (11 %), la matière organique devrait contribuer à hauteur de 80 % de la réactivité. Ce résultat est lié à la réactivité moindre de la MO de la fraction grossière du sol CC par rapport à celle des autres fractions de ce sol et de l'autre sol. Cette différence de réactivité était déjà mise en avant en comparant les rapports ΔHs / COT du sol total et des fractions (Figure IV–10). Tout naturellement, le modèle basé sur une réactivité du carbone unique entre fractions et entre les deux sols ne peut pas reproduire cette différence de réactivité. La fraction >250 µm est riche en carbone, et pauvre en réactivité. La réactivité du carbone réactif expérimentale est de 7.3 $mmol.g^{-1}_C$ (= 0.254/0.0347) pour le sol NA et de 3.6 $mmol.g^{-1}_C$ (= 0.393/0.1076) donc de moitié, pour le sol CC. Ce résultat nous permet de définir une unité structurale de stoechiométrie $C_{12}H_{16}O_8$ (trois unités élémentaires $C_3H_4O_2$) de 288 masses élémentaires, qui a une réactivité calculée de 6.9 $mmol.g^{-1}_C$ et est donc représentative du carbone du sol dans l'ensemble des fractions sauf dans la fraction grossière du sol CC. Dans cette fraction la réactivité du carbone est plus faible et peut être représentée par une unité structurale $C_{24}H_{32}O_{16}$ de réactivité théorique 3.5 $mmol.g^{-1}_C$.

Le pourcentage de réactivité aux protons des sols liée aux argiles (basé sur la [Al]) est inversement corrélé à la taille des fractions granulométriques, passant de 14 % (>250 µm) à 58 % (<2 µm). Les concentrations des sites réactifs acide-base présent sur les argiles se distribuent préférentiellement dans les fractions fines. En prenant en compte, la réactivité de ces deux substrats (MO, argile), la réactivité calculée de la fraction 63-20 µm est, comme on l'attendait, trop faible par rapport à la réactivité réelle (environ 50 %). La réactivité liée aux autres composés des fractions est fixée à 0.045, mais elle représente entre 10 % (>250 µm, <2 µm) et 50 % (63-20 µm) de la réactivité totale de la fraction.

Après deux ans d'incubation, nous avons recalculé la capacité d'échange de protons des fractions grossières en considérant la dégradation de la MO de ces fractions. En revanche nous avons considéré constantes les teneurs en argiles et en phases réactives résiduelles, ce qui nous semble raisonnable, en comparaison avec la stabilité de la structure du sol. La Figure IV–12 présente les résultats de la distribution de la réactivité des fractions granulométriques après 24 mois d'incubation. Nous avons utilisé les mêmes paramètres de modélisation qu'à T0 mois. Nous faisons l'hypothèse que la réactivité globale des fractions n'a pas évoluée, ni la concentration en argile mais la teneur en carbone organique a évolué. La Figure IV–12 montre que dans le sol CC la réactivité de la fraction lié à la MO dans les deux fractions grossières, et notamment dans la fraction >250 µm, diminue indiquant que la diminution de la concentration en COT dans ces fractions diminue la réactivité lié à la MO. Malgré cela, l'incubation ne modifie pas la distribution globale de la réactivité des trois types de substrats.

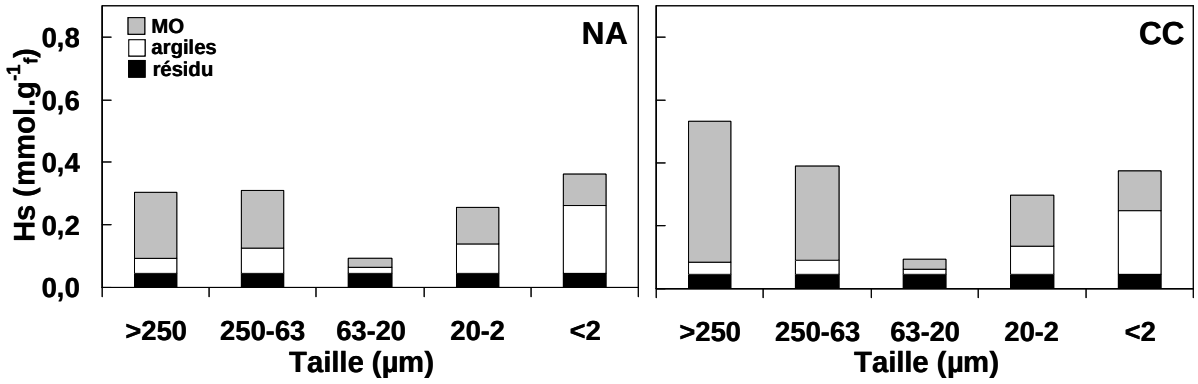


Figure IV–12 Modélisation de la répartition de la capacité d'échange de protons théorique entre la MO (gris), les argiles (blanc) et les autres composés (résiduel) du sol (noir) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé non amendé (NA) ou amendé en compost de conifère(CC).

Dans l'ensemble des fractions, la somme de ces trois types de contributions à la réactivité aux protons des fractions donne une bonne représentation de la capacité d'échange des protons du sol de Clessé (sauf pour la fraction >250 µm du sol CC à cause de la plus faible réactivité de la MO de cette fraction sans doute lié à une plus faible surface spécifique). Ces résultats permettent d'expliquer de manière simple (avec 2 concentrations facilement mesurables) la réactivité globale des différentes fractions granulométriques des deux sols, en la considérant distribuée entre trois substrats réactifs. Cette modélisation donne des résultats satisfaisant sauf pour les fractions grossières, pour lesquelles la réactivité des MOP et de la MO contenue dans les macro-agrégats ont des réactivités très variables. Pour affiner cette modélisation, il conviendrait donc de mieux caractériser cette fraction en terme de composition et de réactivité de la MO. Ce modèle permet donc de combiner linéairement la réactivité des fractions aux composantes modèles argiles, MO, et résiduel, et met en évidence que chaque fraction a une réactivité propre qui est fonction de sa composition.

IV-3-2-6 Caractérisation et évolution temporelle de la distribution et de la spéciation du cuivre dans les fractions granulométriques du sol de Clessé

IV-3-2-6-1 Distribution de la concentration en cuivre totale

On rappelle que la concentration en cuivre solide dans ces sols se compose du fond géochimique (environ 15 ± 5 $mg.kg^{-1}_{ss}$, cf Chap. III) auquel s'ajoute le cuivre apporté par le viticulteur *in situ* (60 ± 5 $\mu g.g^{-1}_{ss}$) auquel nous avons ajouté en laboratoire (sols contaminés) une dose de 240 $\mu g.g^{-1}_{ss}$ de cuivre. La distribution du cuivre solide total (Cu_{Tot}) dans les fractions granulométriques est présentée en masse et en concentration dans la Figure IV–13 et la Figure IV–14, respectivement.

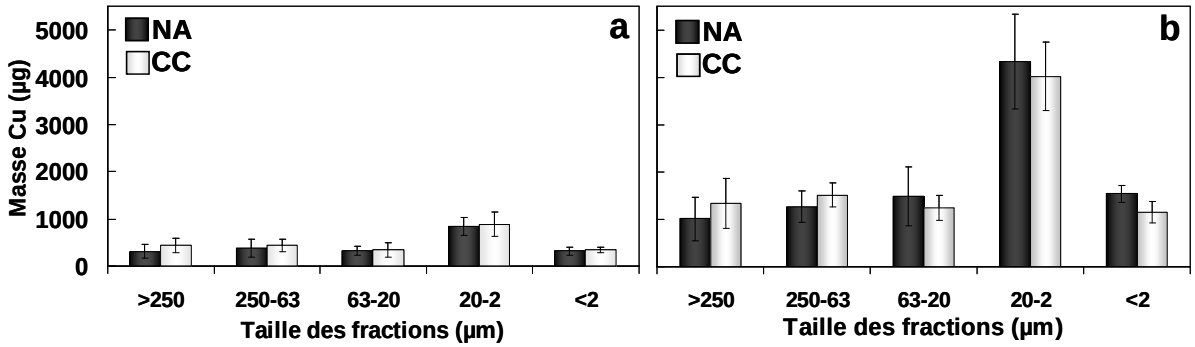


Figure IV–13 Distribution de la masse de cuivre dans les fractions granulométriques (µg) pour 30 g de sol de Clessé non fractionné pour les sols NA et le sol CC avant (a) et après contamination à 240 ppm (b). Les barres d'erreurs correspondent à la variation entre les réplicats. (x µg de cuivre pour 30g de sol fractionné).

La Figure IV–13 présente la distribution de la masse de cuivre dans les fractions granulométriques des sols avant et après contamination au cuivre à 240 ppm. Cette figure montre que l'apport de matière organique ne modifie pas significativement la distribution du cuivre mesurée dans les sols non contaminés (Figure IV–13a) ni dans les sols contaminés (Figure IV–13b). Ces résultats montrent que le cuivre apporté au laboratoire se distribue dans les mêmes fractions que le cuivre déjà présent dans le sol, qui est désigné comme le cuivre initial (fond géochimique + apport du viticulteur). Les résultats suggèrent donc que le cuivre initial présente une spéciation similaire à celle du cuivre apporté en laboratoire. Une spéciation radicalement différente, par exemple une précipitation du cuivre introduit, aurait généré une distribution différente entre le cuivre initial et le cuivre ajouté en laboratoire. Ceci valide notre approche utilisant de faibles doses de cuivre pour étudier le comportement de ce métal en contexte viticole.

Les masses de cuivre sont distribuées de façon hétérogène entre les fractions. Les analyses du sol non fractionné ne sont donc pas représentatives des concentrations réellement perçues par les microorganismes du sol (i.e. les bactéries) aussi variablement distribués à micro-échelle. Dans le sol de Clessé, la fraction 20-2 µm contient entre 36 % et 45 % de la masse totale de Cu, dans les sols NA et CC, respectivement qu'ils soient contaminés ou non. Les quatre autres fractions des sols non contaminés et contaminés contiennent des masses de cuivre similaires d'environ 350 et 1300 μg_{Cu} respectivement.

A partir des masses de cuivre retenues dans chaque fraction, nous avons calculé les concentrations en cuivre auxquelles les microorganismes peuvent être exposés dans chacune des fractions granulométriques du sol et qui sont sans doute plus pertinentes d'un point de vue de la toxicité du cuivre. La Figure IV–14 présente les concentrations en cuivre des fractions, calculées en divisant la masse de cuivre dans la fraction par la masse de la fraction. Conformément à la distribution en masse, la concentration en cuivre ajouté en laboratoire présente la même distribution que le cuivre initial. On observe que la concentration totale en cuivre [Cu_{Tot}] augmente avec la contamination dans toutes les fractions, et que le profil de distribution est très similaire avant et après la contamination indiquant que le cuivre initial et ajouté ont un comportement similaire. Par ailleurs, la Figure IV–14 montre qu'au sein d'un sol les concentrations en Cu_{Tot} varient d'une fraction à l'autre. Finalement cette figure nous montre aussi un effet de l'amendement organique sur la distribution du cuivre dans les fractions.

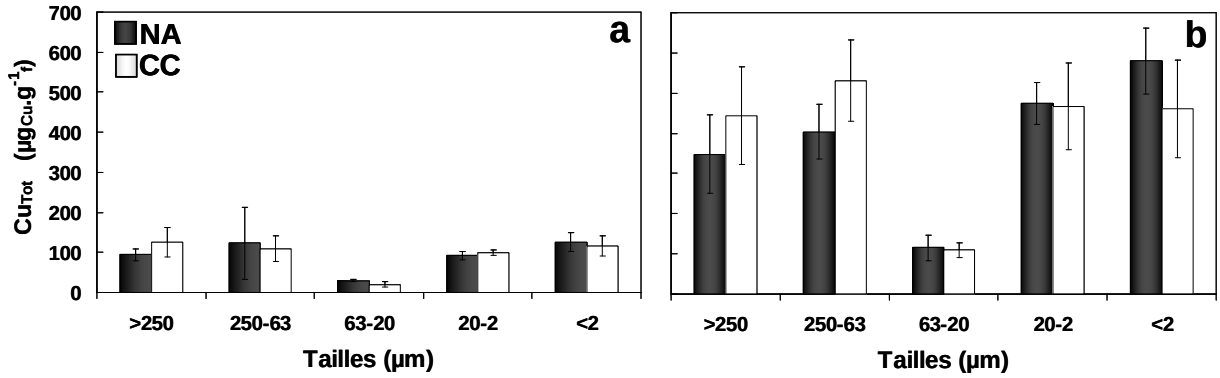


Figure IV–14 Concentration en cuivre dans le sol de chaque fraction ($\mu g.g^{-1}_{f}$) avant (a) et après (b) contamination au laboratoire avec une solution de $CuSO_4$ dans les fractions de tailles granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère. Les incertitudes correspondent à la différence entre les six réplicats.

Dans le sol NA (Figure IV–14), la [Cu_{Tot}] est maximale dans la fraction argileuse (<2 µm) et diminue avec l'augmentation de la taille de la fraction, excepté pour la fraction 63-20 µm, où [Cu_{Tot}] est très faible. Ces résultats sont significatifs bien que l'on soit à la limite de l'incertitude expérimentale. Dans le sol CC, la [Cu_{Tot}] est assez similaires entre les fractions sauf pour la fraction 63-20 µm (très faible). Les concentrations en Cu_{Tot} dans les fractions grossières (>250 et 250-63 µm) du sol CC sont supérieures à celle du sol NA. Ces résultats montrent que la MO concentre le cuivre dans les fractions où elle s'accumule (Figure IV–5). Ceci indique que dans les sols, la MO qui ne représente que quelque pourcents en masse, affecte très fortement la distribution des concentrations en cuivre, par sa forte réactivité qui lui confère un fort potentiel de rétention du cuivre (Parat et al. 2002; Pietrzak & Mcphail 2004; Devez et al. 2005; Kumpiene et al. 2007; Madejon et al. 2009). La très faible concentration en cuivre dans la fraction 63-20 µm est en cohérence avec l'abondance relative des tectosilicates peu réactifs et la faible teneur en COT et en argiles.

Ces résultats sont confirmés par une étude menée sur la répartition de la concentration en cuivre à l'échelle du sol de la parcelle viticole dans le cadre du projet MOBiPo-Cu. Pour cela, des échantillons des sols NA et CC, de dimensions comprises entre 2 et 30 mm^2, ont été cartographiées par µ-SXRF (micro Synchrotron-based X-Ray Fluorescence) du cuivre avec une résolution comprise entre 4 x 4 μm^2 et 20 x 20 μm^2 réalisé par A. MANCEAU. Cette cartographie montre que le cuivre est présent dans tous les compartiments organiques et inorganiques du sol (Figure IV–15), par une variation du niveau de gris (représentatif de la concentration en cuivre) sur l'ensemble de la carte.

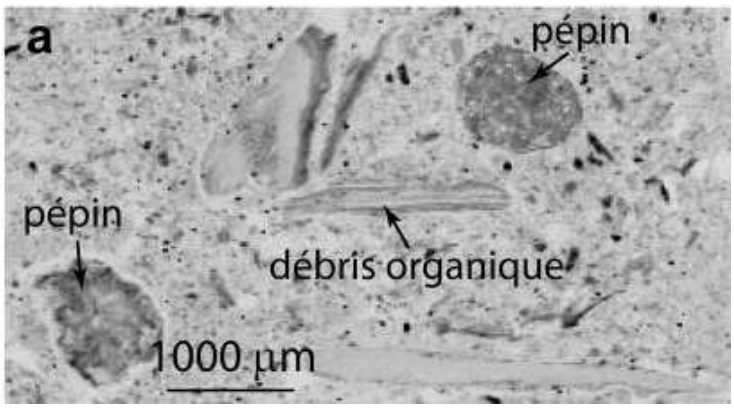


Figure IV–15 Carte de µ-SXRF représentative de la répartition du cuivre (concentration en Cu proportionnelle aux niveaux de gris) dans le sol de Macon Clessé, réalisé par A. MANCEAU.

La répartition du cuivre est extrêmement hétérogène à cette échelle. Comme pour nos résultats, deux pools dominent : un pool matière organique (MO ; débris végétaux, pépins de raisin, racines…) le plus riche en Cu, et un pool argileux environ 2 à 3 fois moins concentré. Cependant, comme cette seconde fraction est largement dominante dans le volume de sol (celui-ci est limono-argileux), elle contient la plus grande quantité de cuivre par gramme de sol. Ces résultats sont en accord avec Jacobson et al. (2007) qui ont montré que le cuivre se distribue majoritaire sur la MO dans les sols.

En résumé, la concentration en cuivre est assez variable entre les fractions, suggérant un impact sans doute variable sur les communautés bactériennes présentes dans chaque fraction.

IV-3-2-6-2 Evolution de la concentration en cuivre

Dans le Chapitre III, nous avons montré que la concentration totale en cuivre (Cu_{Tot}) est stable dans le temps à l'échelle du sol non fractionné dans les mésocosmes de laboratoire. Sa distribution à l'intérieur des micro-compartiments du sol évolue très faiblement dans le temps, semblablement à l'évolution de la structure du sol, indépendante du pH des fractions granulométriques. Comme pour les sols non fractionnés (Tableau III-3), les profils de distribution de la [Cu_{Tot}] montrent que les bilans de masse de cuivre sont stables au cours de l'incubation.

La Figure IV–16 présente l'évolution de la concentration en cuivre lié à la phase solide dans les deux sols (NA et CC) contaminés. On observe une légère évolution de la distribution du cuivre au cours de l'incubation dans les fractions. Les deux sols présentent une évolution similaire de cette concentration totale en cuivre, en lien avec l'évolution de la structure du sol.

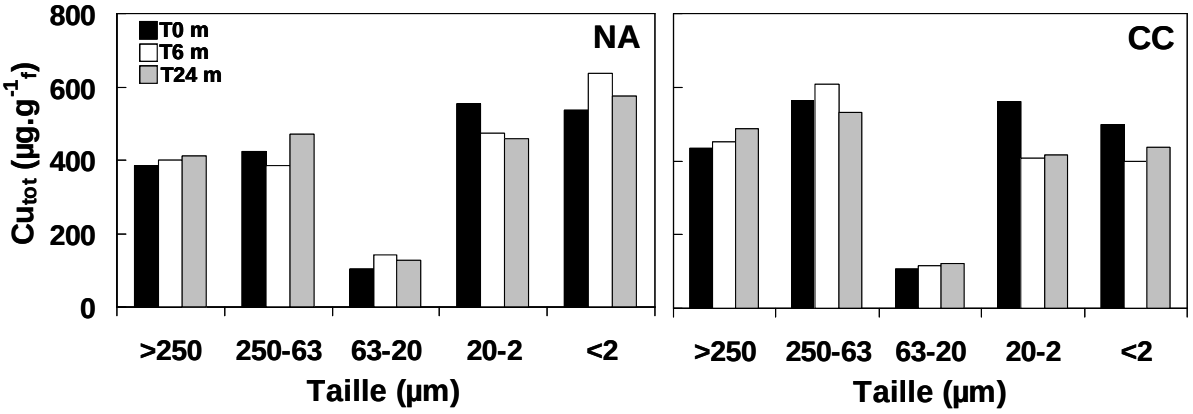


Figure IV–16 Evolution de la concentration en cuivre total dans le sol de chaque fraction ($\mu g.g^{-1}_f$) lié à la matrice du sol au cours de l'incubation (0, 6, et 24mois) dans le sol contrôle (NA) et dans le sol amendé en compost de conifère (CC). Pour ces mesures on ne dispose pas de réplicat.

La concentration en cuivre dans la fraction des limons fins (20-2 µm) diminue au cours de l'incubation, de manière corrélée à la diminution de la masse de cette fraction micro-agrégée au cours de l'incubation due à sa légère désagrégation par les cycles d'humectation dessiccation (Figure IV–3). Dans les fractions grossières (>63 µm), la concentration en cuivre semble légèrement augmenter dans les deux sols (particulièrement dans le sol CC). Cette augmentation semble cohérente avec la dégradation de la MO grossière qui produit une MO plus fine et plus réactive au cuivre conduisant à l'augmentation des teneurs en cuivre dans ces deux fractions en accord avec l'effet de concentration du cuivre dans les MOP, observé par

Lamy, est observable à l'échelle des macro agrégats. Cette augmentation n'est toutefois pas proportionnelle à l'évolution du COT.

La distribution du cuivre associé aux phases solides des fractions granulométriques du sol de Clessé, amendé ou non, subit une très légère évolution au cours des deux ans d'incubation. Cette évolution s'observe principalement dans les fractions grossières en relation avec la dégradation de la MO de ces fractions (Figure IV–6) et dans la fraction 20-2 µm qui se désagrège légèrement au cours du temps sous l'effet des cycles d'humectation dessiccation, libérant ainsi des particules argileuses riches en cuivre qu'on retrouve dans la fraction <2 µm.

IV-3-2-6-3 Rôle de la réactivité aux protons des fractions granulométrique sur l'impact du cuivre et de l'effet de l'amendement organique

Les relations entre la concentration en cuivre ajouté ($[Cu_{Tot}]$), en carbone organique total (COT), et la réactivité en protons (ΔHs) nous informent sur l'interaction du cuivre avec les différents types de sites réactif présents sur la matrice solide (organique ou minéral) (Figure IV–17 et Figure IV–18). Nous avons analysé ces relations en comparant les sols au niveau global mais aussi au niveau des fractions. Ces ratios correspondants ont été calculés pour les sols contaminés avec 240 ppm de cuivre. La capacité d'échange protonique, ΔHs, dans le sol de Clessé est d'environ 50 $\mu mol.g^{-1}_{ss}$, et la concentration en cuivre $[Cu_{Tot}]$ de 325 $\mu g_{Cu}.g^{-1}_{ss}$, c'est-à-dire 5 $\mu mol_{Cu}.g^{-1}_{ss}$. Le rapport $[Cu_{Tot}]/\Delta Hs$ est de 10 %, et montre que la concentration en cuivre est faible comparée à la quantité de sites protonique disponible. Il y a donc suffisamment de sites pour proposer un processus de rétention du cuivre par complexation de surface. On discute par la suite de l'importance relative de ce processus dans les différentes fractions, sachant que la stœchiométrie des réactions ainsi que les proportions réactives du cuivre avec les argiles et la MO sont inconnues. Nous ne pouvons donc pas faire une analyse quantitative de ces résultats, mais seulement une analyse qualitative, car nous ne connaissons pas la proportion de sites réactifs inorganiques, ni la quantité de sites réactifs non protonables (ex : sites d'échange cationique).

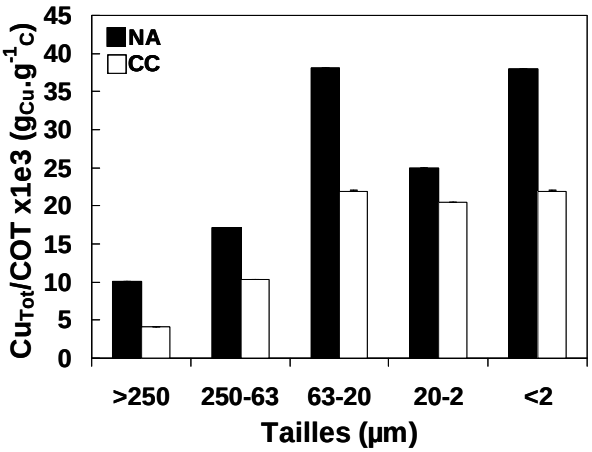


Figure IV–17 Valeurs du ratio de la concentration totale en cuivre sur la teneur en carbone organique total (Cu_{Tot}/COT) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère.

Dans les deux sols, le rapport $[Cu_{Tot}]$/COT (Figure IV–17) augmente de manière inversement corrélée à la taille de la fraction granulométrique, si on ne tient pas compte de la fraction 63-20 µm qui semble essentiellement constituée de limons peu réactifs, et avec peu de MO et d'argile. Le rapport $[Cu_{Tot}]$/COT serait constant dans le cas où (i) seule la MO retiendrait le cuivre et (ii) cette MO aurait la même réactivité dans toutes les fractions.

L'augmentation de ce rapport vers les fractions fines, signifie donc soit qu'il y a une augmentation de la réactivité des fractions avec la diminution de la taille des fractions, soit qu'il existe d'autres constituants réactifs non carbonés dans les fractions fines. Etant donné la composition chimique de ces fractions (Tableau IV-3), on peut supposer que les argiles ou les oxydes de Fe contribuent largement à la rétention du cuivre. Dans ces fractions, il est difficile de différentier la contribution des argiles seules ou de la MO très réactives des complexes argilo humiques. Pour différentier la part de chacun de ces deux substrats (MO, argile), il serait intéressant de travailler à des pH variables. Pour la fraction 63-20 µm, ce rapport est très élevé. En effet, cette fraction est à la fois pauvre en MO, en cuivre et en argile. Il est possible que le cuivre en excès soit retenu sur des phases réactives minoritaires dans le sol total, mais lesquelles sont majoritaires dans cette fraction (comme les oxydes de Fe). Par ailleurs, on observe que le rapport $[Cu_{Tot}]$/COT est plus faible dans le sol CC que dans le sol NA, car la concentration en COT est plus élevée dans le sol CC, avec une concentration en cuivre similaire (Figure IV–14).

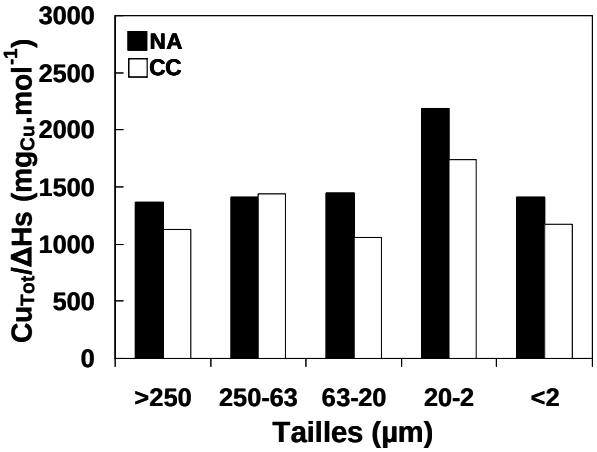


Figure IV–18 Valeurs du ratio $Cu_{Tot}/\Delta Hs$ dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère.

Le rapport $[Cu_{Tot}]/\Delta Hs$ (Figure IV–18) est assez constant entre les fractions pour les deux sols (NA et CC), excepté dans la fraction 20-2 µm où il est plus élevé. Cette constance ne peut s'expliquer que si tout le cuivre est complexé sur des sites réactifs acide-base, et si la stœchiométrie Cu^{2+} : H^+ est constante. Ce résultat indique donc que la majorité du cuivre solide est retenue sur des sites de complexation acide-base réactif. Par déduction, la proportion du cuivre liée à des sites d'échange cationiques doit être faible sauf dans la fraction 20-2 µm qui contient également une quantité importante de site d'échange cationique en relation avec la forte présence d'argiles. Les rapports semblables entre les fractions des sols NA et CC appuient également cette hypothèse. Nos résultats montrent que la MO n'avait pas la même réactivité entre les fractions et entre les deux sols, et que les complexes argilo-humiques sont probablement impliqués dans la rétention du cuivre. Ces résultats montrent aussi que dans les fractions grossières le cuivre se lie essentiellement sur des sites réactifs acide-base de la MO, laquelle est principalement concentrée dans ces fractions. Dans les fractions fines, qui contiennent des teneurs en plasma (complexes argilo humique et oxydes métalliques) élevées, les sites de complexation du cuivre se situent essentiellement soit aux extrémités des bordures de feuillets des argiles soit sur les sites de la MO évoluée (AH, AF, …) des complexes argilo-humiques de très forte réactivité. Cependant, on constate une augmentation légère mais significative du rapport $[Cu_{Tot}]/\Delta Hs$ dans la fraction 20-2 µm dans les deux sols. Dans cette fraction, une petite partie du cuivre peut être liée à des sites

d'échange cationiques, et une autre partie du cuivre est éventuellement complexée sur les sites acide-base à une stœchiométrie Cu^{2+} : H^+ différente des autres fractions.

La réactivité des fractions est donc très dépendante de sa composition en argile et en MO qui lui confère une réactivité au cuivre spécifique pour chacune des fractions granulométriques. Nous avons essayé de modéliser la réactivité au cuivre des fractions granulométriques du sol de Clessé en prenant en compte les propriétés et mécanismes décrits ci-dessus. Les résultats sont présentés dans la partie suivante.

IV-3-2-6-4 Spéciation du cuivre en phase liquide.

La spéciation du cuivre en solution a été étudiée uniquement en termes de concentration totale en cuivre échangeable au calcium ($[Cu_{ex}]$) dans les fractions des sols. En effet les concentrations de cuivre libre (Cu^{2+}) en solution sont trop faibles ($<10^{-8}$ M) pour être mesurées à l'échelle de l'agrégat dans le cadre de ce travail.

Nous considérerons par la suite que la $[Cu_{ex}]$ donne une bonne représentation du cuivre potentiellement mobilisable sous forme dissoute par l'eau de pluie et également la concentration en cuivre la plus biodisponible. La distribution du cuivre échangeable au calcium dans les fractions granulométriques des sols contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC) avant et après contamination à 240 ppm, est présentée dans la Figure IV–19.

Dans les sols non contaminés (Figure IV–19a), les concentrations en Cu_{ex} sont faibles (0.04 et 0.08 $mg.L^{-1}$) et plutôt proches pour les différentes fractions. Les concentrations en Cu_{ex} dans les fractions granulométriques mesurées juste après la contamination en cuivre (Figure IV–19b) montrent que la contamination 'anthropique' induit une augmentation de la concentration en cuivre échangeable dans toutes les fractions et dans les deux sols. Après contamination, on note que la $[Cu_{ex}]$ est plus importante dans le sol NA que dans le sol CC, pour toutes les fractions sauf la fraction <2 µm. La différence de $[Cu_{ex}]$ entre les deux sols peut être associée à la différence de teneur en MO qui est plus abondante dans toutes les fractions du sol CC (Figure IV–5). Le cuivre dans ce sol est ainsi plus efficacement retenu par la plus grande quantité de matière organique et donc de sites réactifs acide-base, à priori plus fort que les sites d'échange cationique.

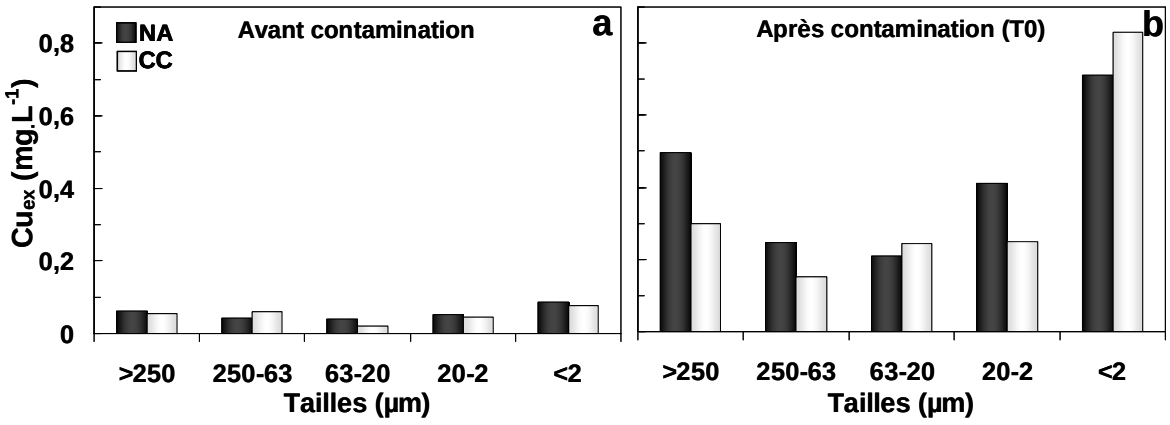


Figure IV–19 Distribution de la concentration total en cuivre échangeable ($mg.L^{-1}$) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère avant (a) et après (b) la contamination en cuivre en laboratoire.

Dans les sols contaminés, on observe une forte $[Cu_{ex}]$ dans les fractions grossière (>250µm) et fine (<2 µm). Ce profil de distribution du $[Cu_{ex}]$ variable montre que cette concentration est spécifique pour chaque fraction. Les fortes concentrations en Cu_{ex} dans la

fraction <2 µm de 0.71 mg.L^{-1} et 0.83 mg.L^{-1} pour les sols NA et CC respectivement, peuvent être liées à la concentration très élevée en argiles, et donc en sites d'échange cationique.

La fraction >250 µm relargue aussi beaucoup de cuivre en solution en présence de Ca et présente des [Cu_{ex}] de 0.5 et 0.3 mg.L^{-1} pour les sols NA et CC, respectivement. La concentration en Cu_{ex} dans la fraction 250-63 µm est inférieure à celles de la fraction >250µm pour les deux sols. On note que pour ces deux fractions grossières (>250 et 250-63 µm) la [Cu_{ex}] est plus importante dans le sol NA que dans le sol CC, qui sont les fractions les plus riches en COT. On observe donc un effet de rétention du cuivre par la matière organique. Bonten et al. (2008) ont aussi montré la forte réactivité de la MO pour la complexation du cuivre. Dans ces fractions (>63 µm), la concentration en argile sous forme de complexe argilo-humique contenu dans les agrégats joue aussi un rôle important dans la mise en solution du cuivre, puisque les fractions des deux sols relarguent beaucoup de cuivre. La fraction >250 µm possède une MO moins évoluée que la fraction 250-63 µm, et donc est moins réactive comme constaté précédemment (ΔHs). Ceci explique que la fraction >250 µm relargue plus de cuivre en solution que la fraction 250-63 µm. Le rôle tampon de la MO est ici bien mis en avant. Ce résultat est en accord avec Mohamed et al. (2010) qui ont aussi observé une plus forte rétention du cuivre dans les sols amendés en MO. De plus, Ashworth & Alloway (2007) ont montré qu'aux pH environnementaux, la complexation des métaux par les composés organiques est dominante.

La fraction 63-20 µm est celle qui contient la plus faible quantité de cuivre et qui en relargue aussi le moins en solution, en accord avec sa très faible quantité d'argiles. La fraction 20-2 µm a une teneur en argiles moyenne entre les fractions qui l'encadre (<2 et 63-20 µm), et met en solution une concentration en Cu_{ex} intermédiaire pour le sol NA et similaire à la [Cu_{ex}] mesurée dans la fraction 63-20 µm pour le sol CC.

En résumé, la [Cu_{ex}] liée à l'échange cationique des argiles diminue des fractions fines vers les grossières. Ceci montre que les concentrations en Cu_{ex} dépendent de la concentration relative en chacun de ces substrats réactifs (MO et argiles) dans chaque fraction, ce qui induit des [Cu_{ex}] maximales dans les deux fractions granulométriques extrêmes (>250 et <2 µm). Les [Cu_{ex}] dans le sol semble donc fortement influencées par la hiérarchisation spatiale du sol en agrégats. En effet, le cuivre n'a pas la même interaction avec les phases minérales qui composent chaque compartiment du sol. Il apparaît donc qu'au moins deux phases réactives (argiles et MO) contrôlent la capacité de rétention du cuivre dans les fractions granulométriques des deux sols. La comparaison des résultats entre les sols NA et CC confirme le rôle tampon de la MO vis-à-vis des métaux, et notamment avec une matière organique exogène peu évoluée (sol CC).

Ces résultats nous permettent de faire l'hypothèse que l'impact du cuivre sur les micro-organismes du sol sera probablement contrôlé par leur localisation spatiale dans le sol mais aussi par le taux de MO du sol.

Modélisation de la concentration en cuivre échangeable

Pour évaluer l'interaction du cuivre avec les différentes phases constitutives des fractions granulométriques nous avons essayé de modéliser les concentrations en cuivre échangeable au calcium à l'aide du logiciel PhreeqC. Pour modéliser la [Cu_{ex}] avant et après la contamination, nous avons considéré que les fractions sont composées de trois solides réactifs différents : la MO, les argiles, et une phase résiduelle. A chacune de ces phases nous associons une réactivité unique sous forme de sites réactifs acide-base complexant des ions Cu^{2+} et Ca^{2+}. Il devient alors plutôt difficile de définir une réactivité globale spécifique à chaque phase. Pour la MO, considérée comme la phase réactive dominante dans nos sols (Figure IV–17), nous

avons assimilé sa réactivité à celle d'un site réactif de type malate. En effet, ce ligand organique a été reconnu comme constituant structuralement dominant des acides humiques impliqués dans la complexation du cuivre (Manceau & Matynia 2010). Notre modélisation prend donc en compte les constantes de réactivité acide-base du malate ainsi que les constantes de réactivité au cuivre. Les pKa acide-base du malate sont fixés à 5.097 et 8.556 (NIST database). Le script du modèle est présenté en Annexe H. Ce modèle très simplifié ne tient pas compte de la complexité et de la variabilité des réactivités des groupes fonctionnels de la MO existants et doit donc être considéré comme une première approche. En particulier, les groupes phénols qui peuvent être important ne sont pas considérés ici. Pour les argiles, de façon similaire nous ne considérons que les sites réactifs acide-base complexant le cuivre ou le calcium, mais pas la rétention du cuivre par échange cationique. En effet, dans le paragraphe précédent (IV-3-2-6-3) nous avons vu que globalement le ratio Cu/ΔHs est similaire entre les fractions riche et pauvre en cuivre. Ce qui indique que le cuivre est retenu sur les phases solides des fractions riches en argile par complexation, et non par échange cationique. Cette modélisation nous permet ainsi de tester nos hypothèses sur la pertinence de la simplification des processus de rétention du cuivre exclusivement par chélation sur les fractions fines. Pour définir les propriétés des sites réactifs acide-base des phases argileuse et résiduelle, nous sommes partis des constantes et définition des constantes de réactivité définies pour la phase de la MO. Ainsi, les trois phases (MO, argiles, résidu) retenues dans le modèle ont des constantes acide-base unique. La concentration totale de sites réactifs est fixée par la concentration de sites calculés à partir des phases réactives des fractions granulométriques (Figure IV–11). Ce modèle fait donc intervenir trois sites de réactivité différente au cuivre qui sont les sites liés : à la MO (Sx), aux argiles (Sy) et à la phase résiduelle (Sz). Comme nous avons défini que chaque fraction présente une composition spécifique en chacune des phases réactives, nous intégrons ces données très spécifiques dans le script pour chaque fraction (Annexe H).

Pour réaliser la modélisation de la complexation du cuivre sur les trois types de sites réactifs, la concentration totale en cuivre mesurée dans chaque fraction est définie dans le modèle. La grande majorité du cuivre s'adsorbe, ne laissant qu'une petite part du cuivre en solution dans chacune des fractions granulométriques, déterminant ainsi la concentration en cuivre en solution. Une solution de $Ca(NO_3)_2$ est introduite, le Ca de cette solution s'adsorbe sur les sites relarguant le cuivre dit 'échangeable' en solution.

Les constantes de réactivité du calcium avec les différents sites réactifs (MO, argile, résidu) sont identiques pour les trois sites de fixation et quelques soient l'amendement en MO et la contamination du sol. Pour cette modélisation la concentration en cuivre relargué en solution n'est pas sensible à la constante de réactivité des sites avec le calcium mais à la différence entre les constantes de réactivité au cuivre et au calcium des substrats (MO, argile, et résidu). Nous avons choisi la constante de réactivité du malate avec le calcium d'une valeur de logK = 2.72 (NIST database) pour les trois types de sites. Ce traitement est effectué sur chacune des 5 fractions constituées des trois phases solides Sx, Sy, Sz. Pour ajuster les concentrations de cuivre aqueux mesurées à celles calculées sur les cinq fractions, les constantes de réactivité au cuivre sur ces trois phases ($SxCu^+$, $SyCu^+$ et $SzCu^+$) sont ajustées manuellement.

Entre les sols contaminés et non contaminés nous ne considérons pas de différence de composition des phases réactives entre les différentes fractions granulométriques. Par contre, il a clairement été montré que la MO des fractions grossières est moins réactive que celle prédite par le calcul des phases, et notamment celle du sol CC (Figure IV–10). Pour rappel, ceci est probablement lié à la présence de MOP grossière peu dégradée et moins réactives. Pour tenir compte de cette différence de réactivité nous avons diminué la concentration totale des sites de MO calculés de la fraction grossière d'un facteur 3. La concentration de sites par

rapport à la quantité de MO calculée dans cette fraction pour les deux sols : 5.2 mmol.L^{-1} au lieu de 15.5 mmol.L^{-1} pour le sol NA et 16 mmol.L^{-1} au lieu de 48 mmol.L^{-1} pour le sol CC.

Dans le modèle, nous imposons le pH_w final comme étant égal à celui mesuré dans la solution après échange au calcium pour chaque fraction.

Les résultats de la modélisation des concentrations en Cu_{ex} dans les fractions granulométriques sont présentés dans la Figure IV–20 pour les deux sols avant et après contamination au cuivre des sols à 240 ppm. Les concentrations en cuivre échangeable modélisées reproduisent globalement bien les données expérimentales dans les fractions aussi bien pour les sols non contaminés que pour les sols contaminés (Figure IV–20). On observe que les modèles suivent bien les variations importantes de [Cu_{ex}] entre sols contaminés et non contaminés. Les courbes calculées suivent également les variations des concentrations entre fractions, qui présente une forme plus incurvée pour les sols contaminés que pour les sols non contaminés. Un léger déficit en Cu échangeable est toutefois noté pour le modèle de la fraction <2 µm, sauf pour CCH_2O. Il est à noter qu'on a porté plus de soin à la comparaison entre le modèle des sols contaminés qu'aux sols non contaminés, dans la mesure que les faibles concentrations des sols non contaminés impliquent une plus forte incertitude des valeurs mesurées.

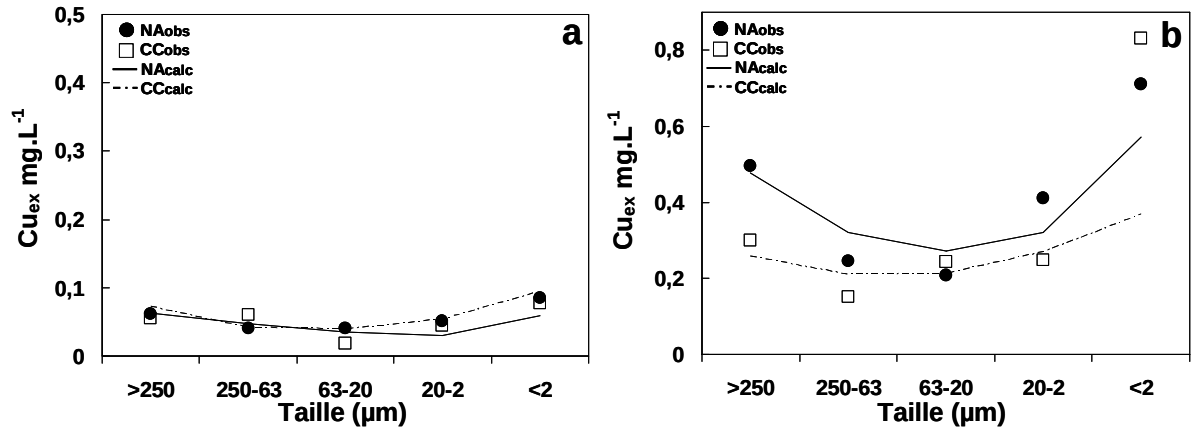


Figure IV–20 Concentration en cuivre échangeable au calcium (mg.L^{-1}) mesurée (symboles) et calculées (lignes) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère avant (a) et après (b) contamination.

La différences entre les constantes SqCa et SqCu (avec q=x,y,z) qui ne varie pas beaucoup entre les trois sites contrôlent majoritairement la quantité de cuivre échangée. A T0m, les constantes de réactivité sont identiques pour la phase organique et la phase résiduelle avec une valeur de $logK_{SxCu} = logK_{SzCu} = 5.53$, et d'un ordre de grandeur plus faible pour les argiles ($logK_{SyCu} = 4.53$ à $logK_{SxCa} = logK_{SyCa} = logK_{SzCa} = 2.72$). Ceci indique, pour des concentrations totales de sites réalistes, que les argiles retiennent moins fortement le cuivre que la MO. On rappelle que l'échange cationique est caractérisé ici par des constantes de sorption quasi-identiques entre le cuivre et le calcium, ce qui n'est pas en accord avec la modélisation de la réactivité des fractions. Le résultat de modélisation appuie donc fortement l'hypothèse que la majorité du cuivre est retenue sur des sites de complexation acide-base réactifs. La diminution relative de la constante d'adsorption du cuivre sur les argiles pourrait indiquer qu'une fraction mineure du cuivre sur cette phase serait associée à des sites d'échange cationique, ou simplement que la constante de sorption moyenne sur la phase argileuse est plus faible. Les constantes de rétention du cuivre dans les sols contaminés sont similaires à celles des sols non contaminés en accord avec le comportement identique du cuivre 'natif' et 'anthropique'.

Cette modélisation de la réactivité des fractions granulométriques du sol à trois sites réactifs, permet de reproduire correctement les valeurs mesurées de [Cu_{ex}]. Cette modélisation intègre la dépendance au pH de la matrice du sol et de la solution qui est un paramètre important dans la spéciation liquide du cuivre. Ces résultats indiquent que sur les trois phases réactives présentes (MO, argiles et résiduelle) le cuivre se lie sous forme de complexes acide-base capable d'échanger le cuivre et le calcium. La rétention par chélation est ainsi le processus principal de rétention du cuivre quelque soit la fraction (plus ou moins enrichie en argiles) du sol.

IV-3-2-6-5 Dynamique du cuivre échangeable total en solution.

L'évolution de la concentration en cuivre échangeable total ([Cu_{ex}]) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé au cours des deux années d'incubation est présentée dans la Figure IV–21.

Globalement, la [Cu_{ex}] au calcium diminue fortement dans les cinq fractions du sol la première année d'incubation (notamment dans les 6 premiers mois), puis se stabilise au cours de la deuxième année, au niveau observé dans les sols non contaminés. Ces résultats sont cohérents avec l'évolution de la [Cu_{ex}] dans les non fractionnés (Figure III–8) et en accord avec d'autres études (Arias-Estévez et al. 2007; Lejon et al. 2008). Une analyse plus fine de la Figure IV–21 montre que l'évolution des [Cu_{ex}] n'est pas identique entre sols NA et CC, et que chaque fraction présente une dynamique spécifique de [Cu_{ex}]. Les fractions du sol CC présentes des valeurs de [Cu_{ex}] légèrement inférieures à celles du sol NA, en relation avec la concentration en MO plus abondante dans le sol CC qui peut chélater plus fortement le cuivre comme cela a déjà été montré dans la Figure IV–20 (à T0). L'excès de sites réactifs dans le sol CC favorise une adsorption du cuivre plus importante par le déplacement de l'équilibre chimique du cuivre de la solution vers le solide. Ces résultats confirme l'effet protecteur de la MO dans le sol CC vis-à-vis des populations bactériennes car le cuivre est plus fortement retenu sur le solide dans ce sol et donc moins biodisponible.

Nous avons déjà observé (c.f. paragraphe au-dessus) qu'à T0 juste après la contamination, la [Cu_{ex}] est maximale dans les deux fractions 'extrêmes' (> 250 µm et <2 µm). Cette distribution initiale évolue donc fortement au cours du temps. Toutes les fractions des deux sols présentent des [Cu_{ex}] qui décroissent suivant une loi exponentielle décroissante caractéristique d'une cinétique de premier ordre. La principale différence était le niveau initial de [Cu_{ex}] qui est variable entre les fractions et entre les deux sols. La diminution de la [Cu_{ex}] est particulièrement variable, rapide et différente entre les deux sols dans la fraction des macro-agrégats (>250 µm). Dans le sol NA, la [Cu_{ex}] diminue moins rapidement au cours du temps que dans le sol CC.

La fraction 63-20 µm est la fraction où la [Cu_{ex}] évolue le moins pendant les deux ans d'incubation en accord avec la stabilité de cette fraction autant en termes de Cu_{Tot}, COT, masse solide et de biologie. Cette fraction contient une quantité de cuivre identique à celle des autres fractions (Figure IV–13) même si en termes de concentration c'est celle qui présente la plus faible concentration (Figure IV–14). Cette fraction contient très peu de carbone, peu d'argiles et également peu de cuivre lié, mais beaucoup minéraux primaires (Figure IV–4). On peut donc supposer que dans cette fraction le cuivre est préférentiellement associé à des phases minérales (par exemple aux oxydes de Fer) qui évolue peu par rapport aux substrats carbonés et qui permettent donc un relargage continu et assez constant du cuivre en solution.

Dans la fraction 20-2 µm, la [Cu_{ex}] diminue rapidement au cours de l'incubation et de manière similaire entre les deux sols. Dans cette fraction aussi, le sol CC relargue moins de cuivre en solution que le sol NA.

La fraction argileuse (<2 µm) présente la plus forte diminution en Cu_{ex}, passant de 0.71 à 0.09 $mg.L^{-1}$ dans le sol NA et de 0.83 à 0.07 $mg.L^{-1}$ dans le sol CC, soit un taux de fixation, similaire entre les deux sols de 0.10 et 0.13 $mg.L^{-1}.mois^{-1}$, respectivement. On suppose que dans cette fraction, le cuivre est retenu principalement sur les argiles et/ou sur les complexes argilo-humiques. Les travaux effectués en µSXRF (micro Synchrotron-based X-Ray Fluorescence) par une équipe partenaire dans le cadre du projet MOBiPo-Cu sur les sols non contaminés (données de A. Manceau, dans (Navel et al. 2011)) ont montré qu'une partie importante du cuivre est incorporée dans les feuillets hexagonaux des argiles, qui sont constitués majoritairement de Kaolinite et/ou Montmorillonite. Il est donc possible que la rapide évolution du cuivre dans les fractions fines soit liée à un processus d'incorporation du cuivre dans les argiles.

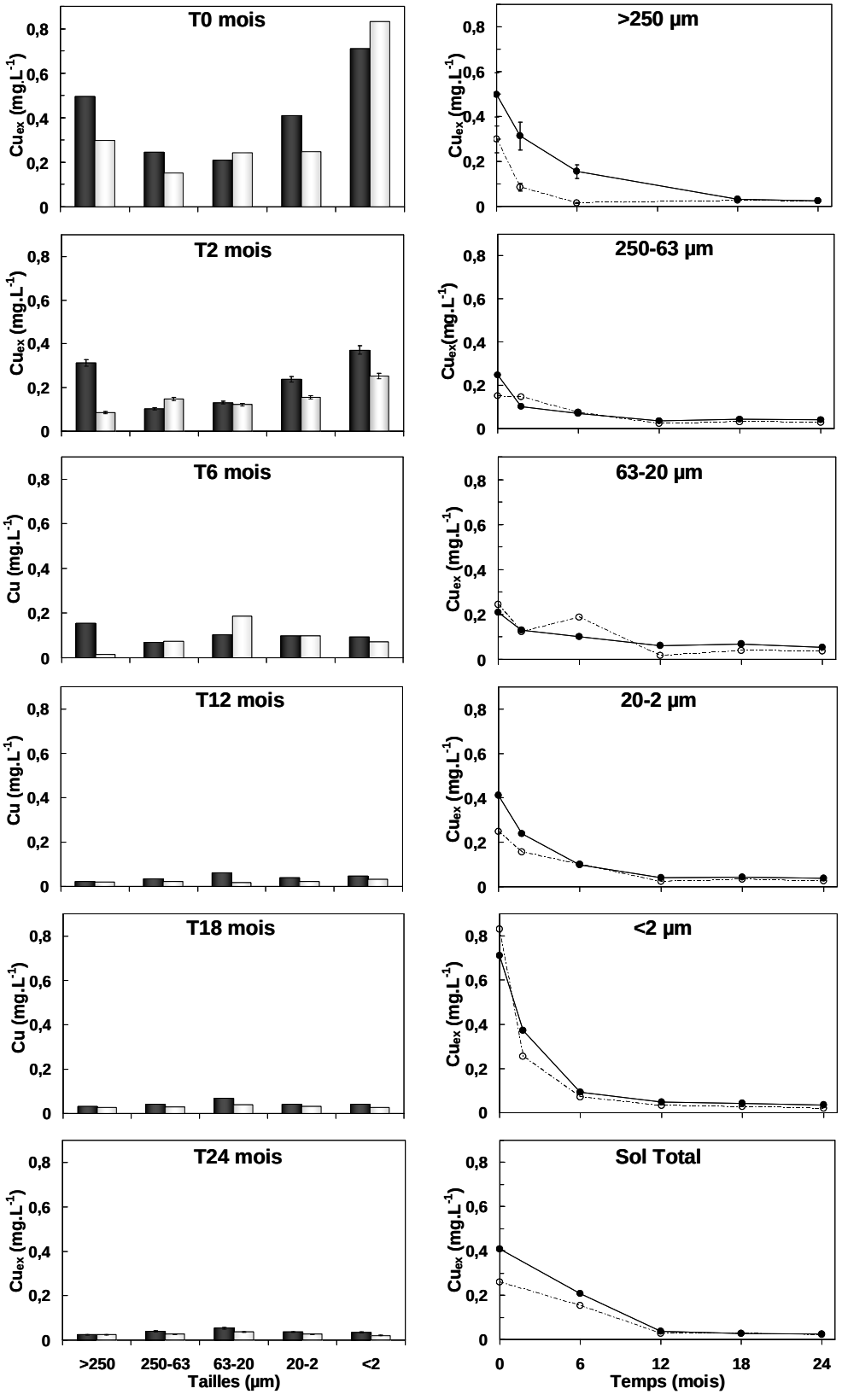


Figure IV–21 Distribution de la concentration en cuivre échangeable totale ($mg.L^{-1}$) dans les fractions granulométrique du sol contrôle et amendé en compost de conifère, sur les 2 ans d'incubation (0, 2, 6, 12, 18, 24 mois), par inter comparaison entre les fractions (colonne de gauche), et suivi temporelle de l'évolution pour chaque fraction granulométrique (colonne de droite).

Nos résultats montrent que la concentration en Cu_{ex} diminue de façon générale avec le temps, mais que la cinétique est spécifique aux fractions et aux statuts organiques des deux

sols. La fraction la plus grossière (>250 µm) et la fraction la plus fine (<2 µm) sont celles qui relargue le plus de cuivre mais aussi celles qui présentent le vieillissement le plus rapide du cuivre échangeable au Ca. La fraction grossière est constituée de matière organique qui est rapidement dégradée, et la fraction fine constituée d'argiles. La forte diminution de la [Cu_{ex}] dans ces fractions contenant des concentrations élevées des deux substrats les plus réactifs du sol de Clessé suggère fortement l'implication de la matière organique, prépondérante dans la fraction grossière, et les argiles, prépondérantes dans la fraction fine. Malgré un effet identique au niveau macroscopique, deux mécanismes différents interviennent au cours du temps.

Modélisation de l'évolution de la concentration en cuivre échangeable

Pour modéliser les concentrations en cuivre échangeable après 24 mois d'incubation, nous avons utilisé la même conceptualisation qu'à T0 mois. Nous avons recalculé la capacité d'échange de protons des fractions grossières en considérant la dégradation de la MO de ces fractions (Figure IV–12). En revanche nous avons considéré constantes les teneurs en argiles et en phases réactives résiduelles, ce qui nous semble raisonnable en comparaison de la très rapide diminution du [Cu_{ex}]. Dans le modèle, les concentrations en sites réactifs et leurs proportions entre les phases argileuse et résiduelle n'évoluent pas avec le temps, contrairement à la matière organique des deux fractions grossières. Les concentrations en cuivre échangeable mesurées et calculées pour chacune des fractions granulométriques des deux sols (NA et CC) contaminés à forte doses sont présentées dans la Figure IV–22.

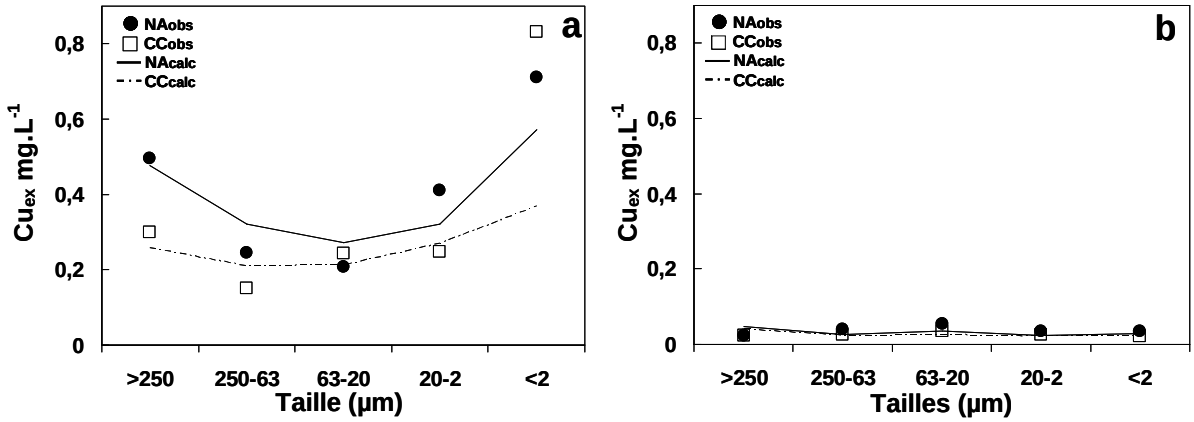


Figure IV–22 Concentration en cuivre échangeable au calcium mesurées (symboles) et calculées (lignes) pour les sols NA (rond) et CC (carré) après 0 (a) et 24 mois (b) d'incubation dans le sol Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère et contaminés en cuivre.

Pour représenter correctement les valeurs de Cu_{ex} dans les fractions granulométriques du sol de Clessé, nous avons du fortement augmenter la constante de complexation du cuivre avec les trois phases réactives, d'environ un ordre de grandeur. Les constantes $logK_{SqCu}$ (avec q=x, y, z) à T24 ont été ajustées à 6.53, 6.53 et 6.03, alors qu'à T0 elles étaient de 5.53, 4.53 et 5.53, respectivement pour les phases MO, les argiles et la phase résiduelle. Dans ces conditions, les concentrations en Cu_{ex} sont relativement bien modélisées (du même ordre de grandeur) après 24 mois d'incubation même si les valeurs calculées sont légèrement sous-estimées dans les deux sols (NA et CC). La constante liée aux argiles est celle enregistrant la plus forte augmentation. Ces résultats indiquent que le cuivre nouvellement apporté se fixe d'abord sur des sites d'affinité relativement faible lors de la contamination, contrairement au cuivre « vieilli » à T24m qui serait alors associé à des sites de rétention plus forts. Dans la mesure où l'évolution des concentrations en sites totales ne peut pas être aussi marquée, ces résultats confirment une redistribution rapide vers des sites réactifs, de plus en plus forts, en

accord avec des études récentes (Buekers et al. 2007; Lejon et al. 2008; Madejon et al. 2009). L'augmentation de la réactivité du sol, surtout associée à la phase modélisée argileuse indique que le cuivre migre progressivement des sites réactifs organiques vers des sites associés aux argiles ou plus largement aux minéraux (oxydes métalliques). Un tel processus serait en accord avec les observations expérimentales et le modèle mais son existence ne peut pas être considérée sur la base de ces mesures indirectes. Notre conceptualisation a permis de montrer que le cuivre interagit principalement avec des sites de complexation acide-base réactifs. La constante d'échange du cuivre avec les argiles augmente d'environ deux ordres de grandeur en deux ans, ce qui est important, et influe directement sur la concentration en cuivre échangeable au calcium. Au cours de l'incubation, le cuivre migre des sites de rétention faible vers des sites forts, incorporé dans les argiles ou sorbé sur la surface. On constate donc une dynamique très rapide de la spéciation du cuivre face au cuivre épandu sur le sol ce qui a déjà été suggéré récemment par Lejon et al. (2008) par une approche basée sur des extractions séquentielles du cuivre.

IV-3-3 Caractérisation microbiologique des fractions granulométriques du sol de Clessé

Pour évaluer l'impact du cuivre sur les populations bactériennes à l'échelle des fractions granulométriques du sol de Clessé, nous avons étudié les mêmes indicateurs d'impact du cuivre que pour les sols non fractionnés (Chap. III). Nous avons ainsi caractérisé la concentration en bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}) et résistantes au cuivre (B^{Cu}) ainsi que l'empreinte génétique des communautés bactériennes dans chacune des fractions granulométriques des sols NA et CC.

IV-3-3-1 Les bactéries hétérotrophes cultivables des fractions granulométriques du sol de Clessé

Les concentrations en bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}) et résistantes au cuivre (B^{Cu}) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé sont présentées dans la Figure IV–23. La concentration en bactéries cultivables (pour les deux conditions d'énumération B^{Tot} et B^{Cu}) dans les fractions granulométriques est supérieure à la concentration en bactéries cultivables dans les sols non fractionnés (III-3-5-1). Ce type de résultat est généralement expliqué par une meilleure extraction des cellules bactériennes à partir des fractions qu'à partir du sol global (Ranjard et al. 1997; Ranjard & Richaume 2001; Chotte et al. 2002). La Figure IV–23 montre une distribution hétérogène entre les fractions granulométriques mais similaire entre les deux sols des bactéries B^{Tot} et B^{Cu}.

La Figure IV–23a montre que pour les deux sols (NA et CC), la concentration en B^{Tot} dans les fractions granulométriques est comprise entre 10^5 (63-20 µm) et près de 10^8 UFC.g^{-1}_{ss} (<2µm). Les fractions fines (20-2 et <2 µm) sont les plus riches en bactéries avec une concentration de l'ordre de 10^7 et 10^8 UFC.g^{-1}_{ss}, respectivement pour la fraction 20-2 et <2µm. Ces deux fractions contiennent donc plus de 92 à 93 % des bactéries cultivables des deux sols. Les deux fractions grossières (>63 µm) sont aussi riches en bactéries avec des concentrations de l'ordre de 10^6 UFC.g^{-1}_{ss}, soit 2 et 8 %. La fraction limoneuse (63-20 µm) présente une concentration de seulement 10^5 UFC.g^{-1}_{ss}, c'est-à-dire seulement 0.1 % des populations bactériennes du sol. Ce type de profil de distribution bactérienne n'étant pas spécifique au sol de Clessé, indique que la hiérarchisation en agrégats du sol influence la

localisation de ces populations bactériennes. Les fractions fines (<20 µm) peuvent être considérées comme les micro-habitats les plus protecteurs pour les microorganismes face aux pollutions mais aussi face à leurs prédateurs (Heijnen & van Veen 1991). Ettema & Wardle (2002) ont aussi indiqué que la distribution des bactéries dans les micro-habitats des sols est fortement contrôlée par l'hétérogénéité et la distribution des nutriments (MO) dans les sols, mais qu'elle permet aussi la séparation spatiale d'organismes potentiellement compétiteurs. Bien que l'on observe une augmentation de la [B^{Tot}] dans l'ensemble des fractions du sol CC (d'un facteur 1.5 à 3), sauf dans la fraction 250-63 µm, l'apport de MO au sol ne modifie pas significativement la distribution des bactéries cultivables hétérotrophes.

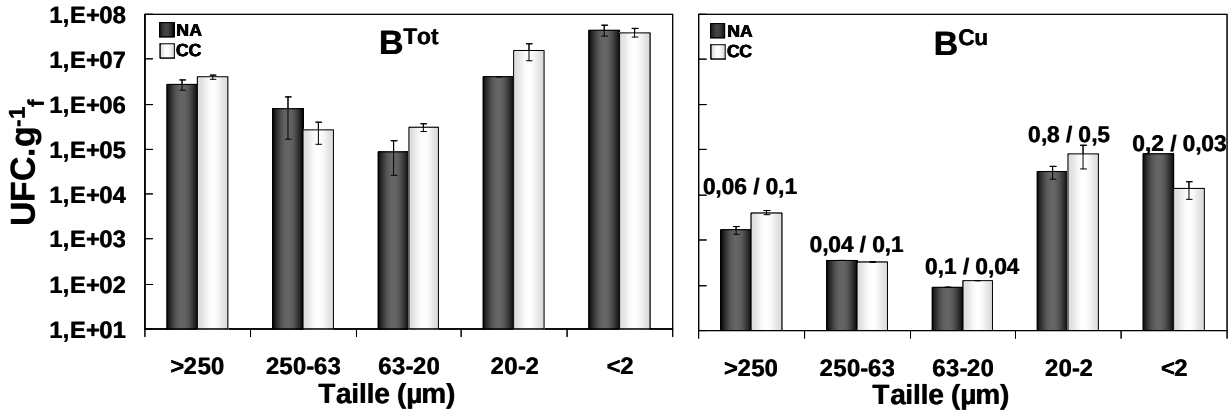


Figure IV–23 Concentration en bactéries hétérotrophes cultivable (UFC.g^{-1}_f) totales (B^{Tot}) et résistantes au Cu (B^{Cu}) dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère. Les valeurs dans le graphique de la distribution des B^{Cu} représentent le pourcentage de B^{Cu} des B^{Tot}. Les incertitudes correspondent à la variation entre les duplicatas.

Comme pour les sols non fractionnés, dans chaque fraction granulométrique les bactéries résistantes au cuivre (B^{Cu}) ne représentent qu'environ 0.1 % de la concentration en bactéries totales (B^{Tot}). Les profils de distribution des B^{Cu} dans les fractions granulométriques du sol de Clessé sont très similaires à ceux des B^{Tot} avec également une dominance dans les fractions fines (<20 µm), qui contiennent 95 % des bactéries résistantes au cuivre du sol de Clessé. L'amendement organique du sol ne semble pas influencer significativement la concentration et la distribution des bactéries résistantes, excepté dans les fractions >250 µm (augmentation x2) et <2 µm (baisse x3). Le traitement récurrent du sol pour la culture de la vigne induit donc la présence *in situ* et dans chaque fraction granulométrique du sol de populations bactériennes résistantes au cuivre.

IV-3-3-2 Evolution temporelle des populations bactériennes cultivables des fractions granulométriques du sol de Clessé après contamination au cuivre.

Comme pour les sols non fractionnés, l'évolution temporelle de l'impact du cuivre a été suivi à l'aide du ratio [B^{Cu}]/[B^{Tot}] dans chaque fraction granulométrique au cours de l'incubation (T0, T1, T6, T18 et T24mois).

La Figure IV–24 présente l'évolution sur deux ans de ce ratio pour chaque fraction granulométrique du sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA). La Figure IV–24 montre que l'impact du cuivre sur les populations bactériennes est très différent entre les fractions granulométriques et également entre les sols NA et CC. Dans les deux

fractions grossières (>250 et 250-63 µm), l'évolution du ratio $[B^{Cu}]/[B^{Tot}]$ est proche entre les deux sols indiquant un impact similaire du cuivre. Le ratio augmente légèrement en début d'incubation puis reste stable tout au long de l'incubation. Après l'effet initial, nous n'observons plus d'enrichissement significatif en bactéries B^{Cu}, au cours de l'incubation pour ces fractions, ni d'effet particulier de l'amendement organique du sol de Clessé. La fraction intermédiaire (63-20 µm) semble peu impactée par le cuivre avec une légère augmentation du ratio ($[B^{Cu}]/[B^{Tot}]$), rapidement pour le sol NA et plus tardivement pour le sol CC, et qui semble stable également au cours du temps, ce qui indique la persistance de la pression de sélection exercée par le cuivre. Pour la fraction 20-2 µm, on observe un fort impact du cuivre à court terme (1 mois) pour le sol NA et 6 mois pour le sol CC, qui semble transitoire pour les deux sols. Sur le long terme, on observe ensuite une légère augmentation du ratio pour les deux sols. Pour la fraction fine (<2 µm), on observe une évolution similaire du ratio $[B^{Cu}]/[B^{Tot}]$ entre les deux sols (NA et CC) mais avec une amplitude différente indiquant que l'amendement organique module l'impact du cuivre sur la quantité des bactéries résistantes. On observe un enrichissement en B^{Cu} après un mois dans les deux sols, puis une diminution à 6 mois, qui indique que l'impact du cuivre à court terme est transitoire comme observé dans la fraction 20-2 µm des deux sols. Nos résultats montrent que l'amendement en MO modifie l'impact du cuivre sur les communautés bactériennes soit en modulant l'amplitude de l'impact (<2 µm) soit en retardant l'impact (20-2 et 63-20 µm) par rapport au sol non amendé. L'amendement en matière organique semble donc jouer un effet protecteur pour les populations bactériennes dans le sol.

A long terme, comme pour les sols non fractionnés (Figure III-15), on observe un enrichissement en B^{Cu}, similaire dans les deux sols (NA et CC), et qui correspond surtout à l'enrichissement observé dans les deux fractions fines (<20 µm), les plus riches en cuivre, en accord avec le fait qu'elles contiennent 90 % des bactéries cultivables (totales et résistantes) des deux sols. On peut donc dire que l'impact du cuivre observé dans ces deux fractions est représentatif de l'impact mesuré dans les sols non fractionnés. Dans le sol amendé (CC), l'impact du cuivre est plus modéré dans toutes les fractions. L'amendement organique atténue l'impact du cuivre sur les populations bactériennes du sol de Clessé, et cela particulièrement dans les fractions fines, qui contiennent plus de cuivre particulièrement au début de l'incubation.

Ces résultats semblent bien en relation avec l'évolution de la concentration en cuivre échangeable en solution, qui est plus importante à T0 dans le sol NA que dans le sol CC et qui diminue rapidement (en 6 mois) ce qui permet donc d'expliquer la résilience de l'impact du cuivre observé dans cette période. Ces résultats tendent donc à montrer que la concentration en cuivre échangeable au calcium est un bon indicateur de l'impact du cuivre, au moins à court terme, aussi bien dans le sol non fractionné que dans les différentes fractions. Ceci s'explique essentiellement, par le fait que la matière organique semble moduler les concentrations en Cu_{ex} en chélatant le cuivre en solution (a priori plus biodisponible). L'impact du cuivre à long terme est essentiellement observé dans les deux fractions fines (<20µm), qui contiennent le plus de cuivre (en masse). Nous avons émis deux hypothèses pour expliquer cet impact à long terme : i) diffusion du cuivre à l'intérieur des micro-agrégats des sols et impact retardé des communautés bactériennes qui y sont protégées, et ii) l'évolution de la spéciation dans les sols non fractionnés du cuivre avec une migration vers des phases réactives différentes. Au vu de nos résultats, il semble que ces deux processus interviennent simultanément mais en proportions non quantifiables.

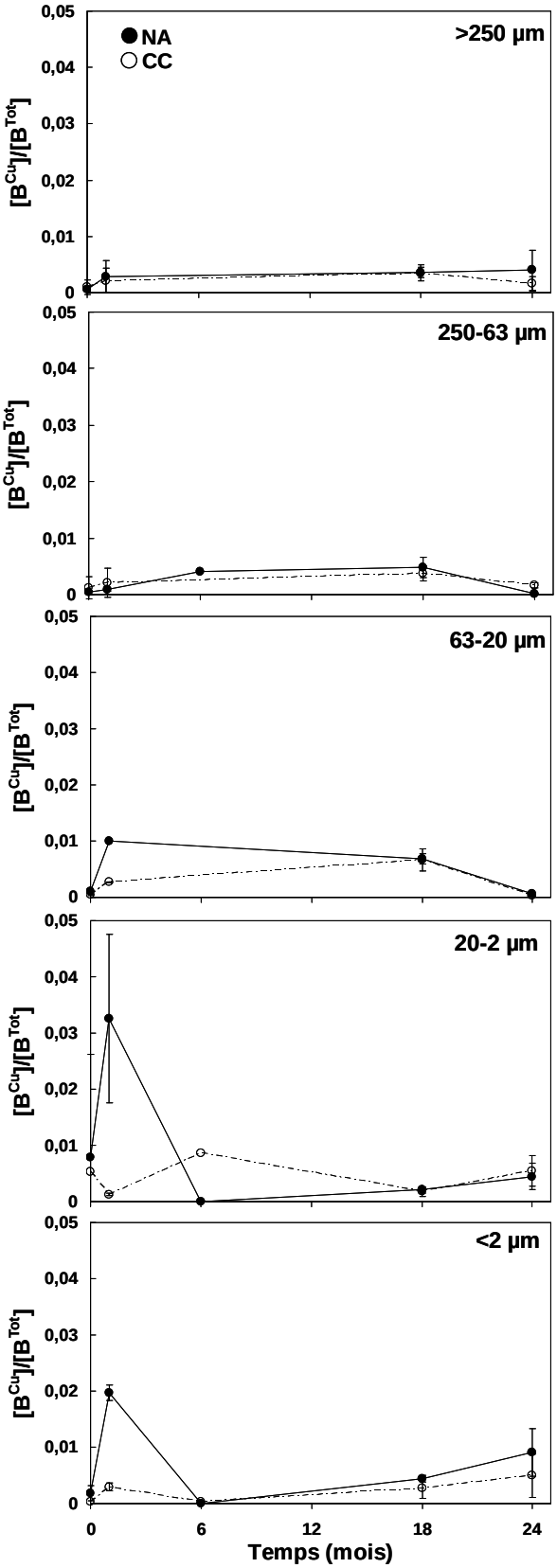


Figure IV–24 Evolution temporelle du ratio [B^{Cu}] sur [B^{Tot}] dans les fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère, contaminés au cuivre à 240 ppm. Les barres d'erreurs ont été calculées à partir des réplicats.

IV-3-3-3 Les communautés bactériennes dans les fractions granulométriques du sol de Clessé

Les empreintes génétiques des fractions granulométriques des sols NA et CC ont été obtenues par la méthode ARISA. Ces empreintes ARISA ont permis de mesurer l'évolution de la structure des communautés bactériennes dont l'analyse en composantes principales (ACP) est présentée dans la Figure IV–25. Pour les deux sols (NA et CC), on observe que les communautés bactériennes sont différentes entre les fractions granulométriques, ce qui montre que dans les deux sols, chaque fraction granulométrique présente une structure de communauté bactérienne qui lui est propre. Elles peuvent être regroupées comme suit : les deux fractions macro-agrégées (>250 et 250-63 µm) sont proches, les fractions intermédiaires représentatives des micro-agrégats (63-20 et 20-2 µm), et la fraction fine (<2 µm) qui est très différentiée des autres fractions. Pour le sol NA, on note en plus une nette différentiation (sur le premier axe de l'ACP) des communautés bactériennes selon la taille décroissante des fractions granulométriques très marquées. La distribution des communautés bactériennes est donc influencée par la granulométrie des fractions.

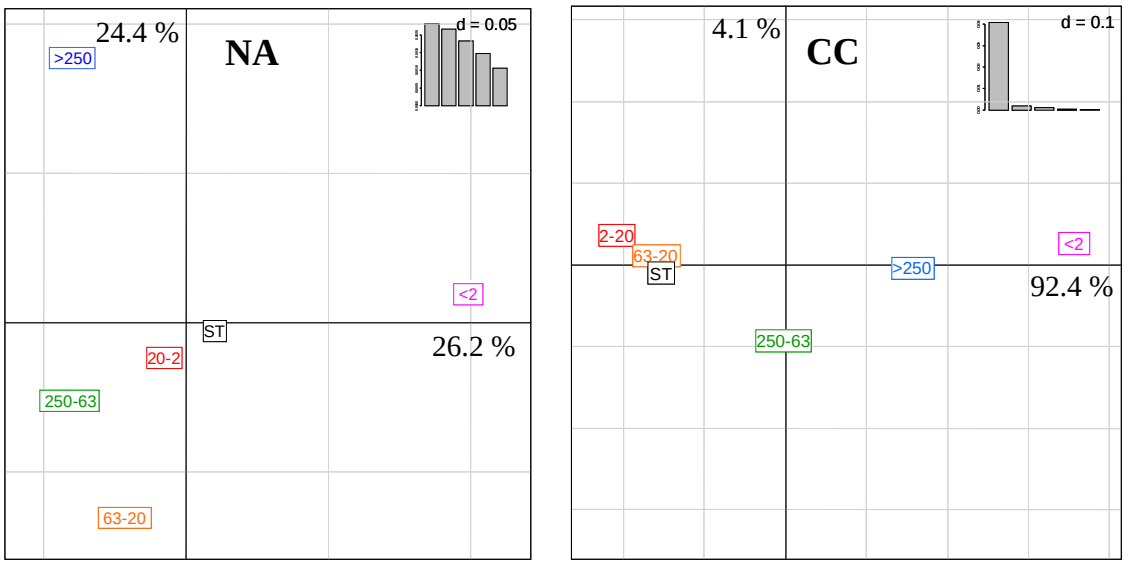


Figure IV–25 Analyse en composantes principales (ACP) des résultats d'empreintes génétiques des communautés bactériennes des fractions granulométriques du sol de Clessé amendé (CC) ou non (NA) en compost de conifère dans le sol contrôle (NA) et dans le sol amendé en compost de conifère (CC) dans les fractions granulométriques obtenues par la méthode B-ARISA.

Pour les deux sols, la communauté bactérienne de la fraction 20-2 µm est la plus ressemblante des communautés bactériennes des sols non fractionnés (ST), tout comme la fraction 63-20 µm pour le sol CC seulement. Dans le sol CC, les communautés bactériennes des fractions >250 et 250-63 µm sont plus différentiées l'une de l'autre que dans le sol NA (différence selon l'axe 2). La principale différence physicochimique entre ces deux fractions dans les sol NA et CC est leur concentration en MO mais aussi l'état de sa dégradation plus ou moins avancée, puisque ce ne sont pas les mêmes populations qui dégradent la MO brute (débris végétaux type compost) fraîchement apportée aux sols et la MO particulaire de plus petites tailles car plus ancienne (Nannipieri et al. 2003). Cette différence influence probablement la structure des communautés de ces fractions.

Pour les deux sols, nous pouvons noter que la fraction fine (<2 µm) présente la structure de communautés bactériennes la plus différenciée des autres fractions et du sol non fractionné (ST). Cette fraction est la plus riche en bactéries cultivables totales B^{Tot} et B^{Cu}, et ses

propriétés biogéochimiques sont certainement plus stables (e.g. teneur en COT, en cuivre mais aussi rétention d'eau liée à la présence d'argiles). Ceci indique que les populations bactériennes de cette fraction sont soumises à des conditions favorables à l'évolution de leurs structures de communautés. Zhang et al. (2007) ont expliqué plus particulièrement que la diversité des communautés bactériennes dans la fraction <2 µm est due au voisinage des bactéries dans ces fractions, ainsi qu'à leur meilleure accessibilité aux ressources externes des micro-agrégats et à la présence de pores de petite taille agissant comme facteur de protection des habitats adaptés pour les microbes

Nos résultats sont en accord avec Chotte et al. (2002) qui ont indiqué que certaines caractéristiques des communautés microbiennes du sol telle que l'activité et la diversité ne sont pas perceptibles dans les sols non fractionnés, mais sont révélées à micro-échelle (c'est-à-dire celle des fractions granulométriques). De plus, Sessitsch et al. (2001) ont montré que la diversité bactérienne dans les fractions de différentes tailles était plus reliée aux caractéristiques des agrégats des fractions considérées qu'aux contraintes environnementales. En effet, Ettema & Wardle (2002) ont indiqué que cette hétérogénéité spatiale ne favorise pas seulement la diversité des micro-habitats mais permet aussi la séparation spatiale d'organismes du sol potentiellement compétiteurs.

L'analyse de la structure génétique des communautés bactériennes au sein de chacune des fractions granulométriques a donc permis de confirmer une distribution hétérogène des communautés bactériennes à l'échelle de leur micro-habitats constitués par les fractions granulométriques des sols. Nos résultats sont en accord avec la littérature (Ettema & Wardle 2002; Fall et al. 2004; Green et al. 2004; Young & Crawford 2004; Mummey et al. 2006; Ruamps et al. 2011) qui considère que la structure des communautés bactériennes ne varie pas de manière non aléatoire à l'échelle locale du sol, mais est plutôt fortement contrôlée par la hiérarchisation spatiale des sols.

IV-3-3-4 Impact du cuivre sur les communautés bactériennes dans les fractions granulométriques du sol de Clessé

Les résultats de l'évolution temporelle, sur les deux ans d'incubation, de l'amplitude des modifications des communautés bactériennes (empreintes génétiques) des fractions granulométriques des sols contaminés ou non sont présentés dans la Figure IV–26. Le nombre insuffisant de réplicats ne nous permet que de faire une analyse qualitative mais pas quantitative. Toutefois, nous avons testés statistiquement (test de Monte Carlo) les résultats des échantillons de chaque fraction. Les résultats nous indique que l'évolution temporelle des communautés bactériennes est significatives ($p<0.05$). Tout d'abord, nous notons que l'évolution temporelle au cours de l'incubation de l'impact du cuivre sur la structure des communautés bactériennes est différente entre les sols NA et CC, mais aussi entre les différentes fractions granulométriques des sols, comme cela a été observé avec l'autre indicateur de l'impact du cuivre B^{Cu}/B^{Tot}.

Dans le sol NA, on observe un impact du cuivre sur la structure des communautés bactériennes essentiellement pour les deux fractions fines (20-2 et <2 µm), lesquelles sont les plus riches en bactéries. Pour ces fractions, on note une modification croissante de la structure des communautés jusqu'à deux mois d'incubation, plus marquée dans la fraction 20-2 µm. Cet impact du cuivre sur les communautés est résilient, car l'amplitude des modifications diminue ensuite jusqu'au temps 6 mois et reste alors stable dans le temps jusqu'à deux ans d'incubation. Dans la fraction <2 µm, l'impact est très rapide et important, et les modifications de structures des communautés perdurent tout au long de l'incubation indiquant

un contact permanent des bactéries et du cuivre. Pour les trois autres fractions (>250, 250-63 et 63-20 µm), on remarque un léger impact du cuivre tout de suite après la contamination. Ces modifications diminuent légèrement au cours de l'incubation.

Dans le sol CC, on observe aussi principalement un impact du cuivre dans les fractions fines, mais cet impact est relativement plus prononcé dans les fractions grossières et notamment dans la fraction >250 µm. Dans ces fractions, on a mesuré une augmentation de la concentration en bactéries cultivables (B^{Tot} et B^{Cu}) liée à l'amendement organique. De plus, ces fractions accumulent plus de cuivre dans le sol CC que dans le sol NA, en relation avec la présence de MO peu dégradée (plus de MOP dans ces fractions). Cependant cet impact du cuivre sur les structures des communautés de la fraction >250 µm se stabilise rapidement. Dans les fractions 250-63 et 63-20 µm, l'impact du cuivre sur les communautés bactériennes n'est pas immédiat et apparaît surtout à partir de 2 mois, suivi d'une rapide résilience. Pour le sol CC, l'amplitude des modifications des communautés bactériennes des fractions fines (20-2 et <2 µm) est similaire à celle du sol NA. En effet, ces fractions présentent un « vieillissement » du cuivre et du COT similaire (Figure IV–21 et Figure IV–6). Ces résultats impliquent une accessibilité similaire des bactéries à la MO et au Cu, qui induit une dynamique de la diversité des communautés semblables entre les deux sols en réponse à un stress métallique.

Quelque soit le compartiment du sol (taille de fraction), on note que la structure des communautés bactériennes ne varie plus beaucoup sur 2 ans, après l'impact fort observé à court terme (environ 2 mois). Ces résultats indiquent que les populations bactériennes se sont adaptées à la présence du cuivre dans toutes les fractions granulométriques du sol permettant ainsi l'évolution vers une structure de communauté spécifique à chaque micro-habitat et stable sur le long terme puisque la structure génétique des communautés bactériennes mesurée à T24 mois est différente de celle à T0. Ceci indique également que la pression de sélection exercée par le cuivre reste importante pendant toute l'incubation dans toutes les fractions granulométriques, ce qui permet d'expliquer l'effet long terme du cuivre sur les bactéries en accord avec une étude récente (Wakelin et al. 2010).

Ces résultats sur l'évolution de la structure des communautés dans chaque fraction, nous permettent de mieux comprendre la dynamique de la structure des communautés dans les sols non fractionnés (Figure III–16). Dans le sol NA, on remarque que l'évolution de la structure des communautés bactériennes des fractions fines (20-2 et <2 µm) est proche de celle du sol non fractionné. Au contraire dans le sol CC, on observe une contribution plus complexe des fractions fines et aussi de la fraction >250 µm. Bien que la fraction grossière représente une part faible de la masse de ce sol, les populations bactériennes qui s'y développent en relation avec la forte disponibilité de nutriments sont fortement impactées par le cuivre qui s'y adsorbe très rapidement en raison de la réactivité de la matière organique particulaire. Ces résultats montrent qu'il est donc indispensable de descendre à l'échelle de l'agrégat de sol pour bien comprendre l'impact du cuivre sur les communautés bactériennes dans les sols naturels.

Nos résultats confirment donc que la dynamique de l'impact du cuivre sur les communautés bactériennes dépend fortement de la localisation des communautés dans le sol et particulièrement dans les agrégats, mais aussi des propriétés physico-chimiques de chaque taille d'agrégat représenté ici par les fractions granulométriques (MO, argiles, pH,…).

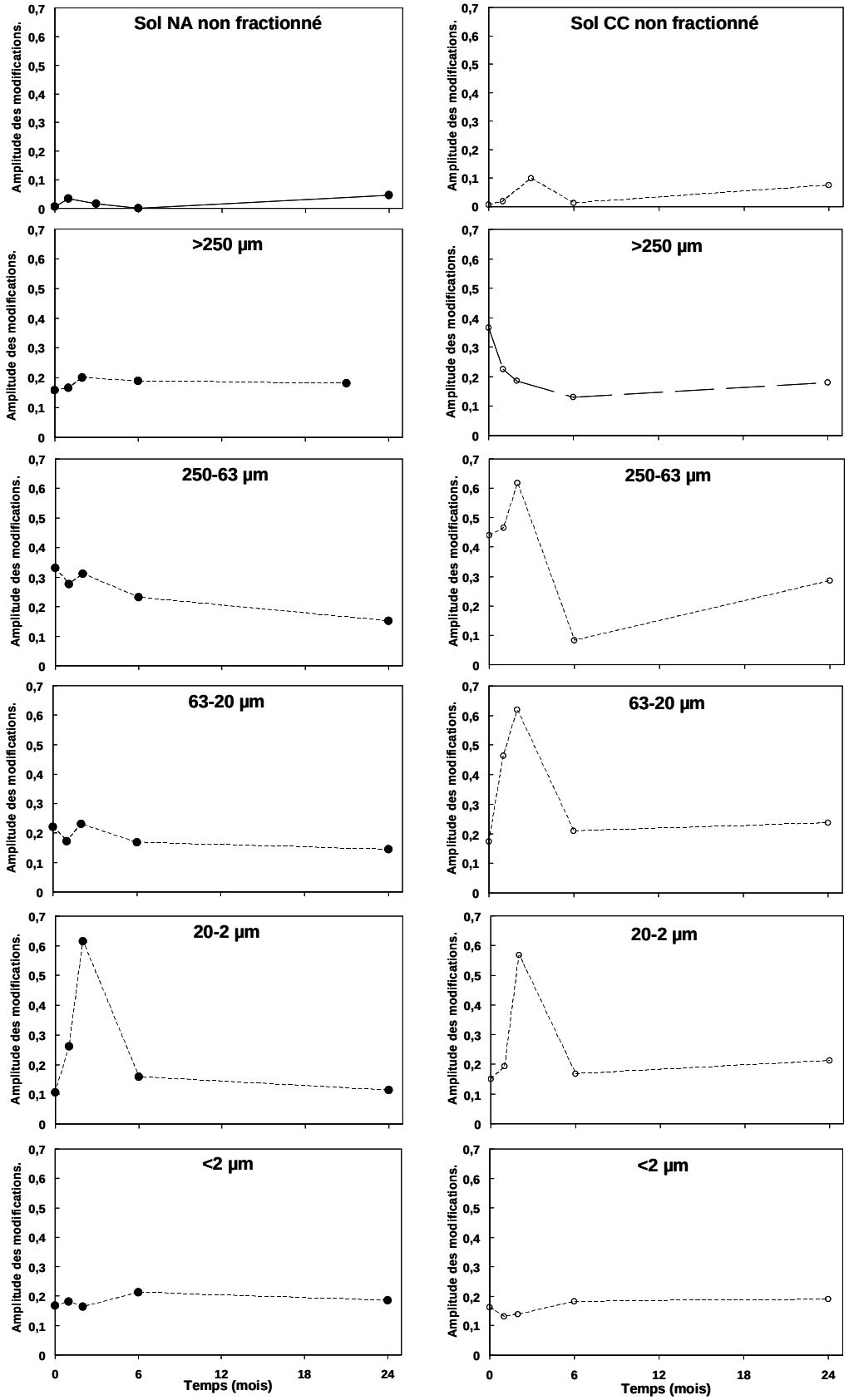


Figure IV–26 Evolution temporelle de l'amplitude des modifications des communautés bactériennes (distance euclidienne) entre le sol contaminés et non contaminés au cuivre des les fractions granulométriques et dans le sol non fractionnés des deux sols (NA et CC). L'échelle des ordonnées est une échelle arbitraire.

IV-4 Conclusion

Les objectifs de ce chapitre étaient multiples. Nous souhaitions notamment répondre aux questions évoquées dans le chapitre III mais à l'échelle des micro-agrégats, qui nous semblaient la plus pertinente, compte tenu de l'effet des modes de gestion des intrants organiques mis en évidence dans le chapitre II sur la rétention du cuivre et l'agrégation du sol de Clessé. L'objectif de ce chapitre était donc d'évaluer l'évolution temporelle de l'écodynamique et l'écotoxocité du cuivre à l'échelle des fractions granulométriques du sol de Clessé qui constitue autant d'habitats microbiens aux propriétés biogéochimiques spécifiques (Chap. II).

Nous présentons donc dans ce chapitre, les résultats de l'étude biogéochimique effectuée sur les fractions granulométriques des deux sols et incubés en mésocosmes de laboratoire pendant deux ans après contamination à 240 ppm de cuivre.

Nous avons ainsi caractérisé l'évolution temporelle des propriétés biogéochimiques de chacune des fractions granulométriques, ce qui nous a permis de montrer que ces fractions granulométriques (>250, 250-63, 63-20, 20-2, et <2 µm) présentent des différences importantes en termes de distributions de taille, de géométrie mais aussi de composition chimique, de réactivité au cuivre et de structure et abondance de communautés bactériennes. Ces résultats nous ont permis de confirmer que chaque fraction granulométrique des sols représente un habitat spécifique pour les bactéries du sol.

Nous avons montré que la réactivité aux protons et au cuivre de chaque fraction granulométrique du sol est très variable et dépend notamment de sa teneur en MO et en argiles. Frâce à ces résultats, nous avons pu modéliser efficacement et de manière simple nos résultats de rétention et de distribution du cuivre à micro-échelle en considérant seulement 3 substrats réactifs majoritaires variablement répartis dans les différents compartiments du sol : la MO, les argiles, et une phase réactive résiduelle (i.e. oxydes de fer…). La proportion de chacun de ces substrats étant propre à chaque fraction, puisque dépendant de leur composition, cela leur confère une réactivité spécifique au cuivre. L'accumulation du cuivre à micro-échelle n'est donc pas aléatoire dans les sols comme pour les bactéries mais varie avec les teneurs de chacune de ces 3 phases réactives du sol. La réactivité des fractions grossières est ainsi dominée par la réactivité de la MO, et notamment des MOP, alors que celle des fractions fines est liée à la réactivité des argiles et de la MO évoluée des complexes argilo-humiques. Nos résultats ont montré que l'amendement en MO du sol de Clessé modifie essentiellement la réactivité au cuivre des fractions grossières où s'accumule préférentiellement le carbone exogène. Ces différences de réactivité des fractions contrôlent donc l'amplitude et la force de rétention du cuivre sur les phases solides.

En effet, la capacité de libération du cuivre en solution (cuivre labile faiblement lié) est très variable entre les fractions granulométriques du sol et dépend principalement du mécanisme spécifique de rétention du cuivre et de la nature de la phase réactive. Ainsi, les fractions grossière et fine sont celles qui libèrent le plus de cuivre en présence de calcium, c'est-à-dire du cuivre a priori plus toxique puisque plus biodisponible.

Nous avons également montré que cette réactivité au cuivre évolue au cours du temps en relation avec la biodégradation du carbone par les microorganismes, biodégradation qui n'a été observé que dans les fractions grossières des deux sols.

Par ailleurs, nous avons montré que les différences de propriétés physico-chimiques des fractions granulométriques du sol de Clessé induisent des structures de communautés bactériennes très différentes et clairement spécifiques à chaque fraction. Ces différences de structure de communauté bactérienne confèrent aux bactéries de ces micro-compartiments une

sensibilité très différente au cuivre. Nos résultats ont ainsi montré que l'impact du cuivre, qu'il soit mesuré avec un indicateur quantitatif (évolution de la richesse en bactéries résistantes au cuivre, B^{Cu}) ou qualitatif (empreintes génétiques RISA), dépend à la fois de l'amendement organique et de la fraction granulométrique considérée. Ainsi, nous avons montré qu'à court terme (quelques semaines), le cuivre impacte uniquement les bactéries du sol non amendé, au niveau des fractions. Toutefois, cet impact, qui concerne principalement les populations bactériennes des fractions fines (<20µm), est transitoire et disparaît en 6 mois. Cet impact transitoire est très bien en relation avec l'évolution temporelle des concentrations de cuivre en solution qui diminuent rapidement dans les premiers mois qui suivent la contamination, en relation avec le vieillissement du cuivre (changement de spéciation solide). Le sol amendé en compost, lui, ne semble pas significativement impacté par le cuivre, ce qui indique que la matière organique exogène joue un rôle protecteur pour les bactéries. Cet effet protecteur a été montré comme étant dépendant du fort pouvoir de rétention de la MO qui limite la concentration en solution du cuivre.

En revanche, à long terme (deux ans), nous avons observé un impact très similaire du cuivre dans les deux sols, avec un léger enrichissement en bactéries résistantes au cuivre, B^{Cu}, dans l'ensemble des fractions des deux sols et avec des amplitudes de modifications de structure des communautés bactériennes très proches. Ce résultat indique que, sur une longue période, le contact du cuivre avec les communautés bactériennes du sol est en moyenne très semblable dans les deux sols, ce qui ne peut s'expliquer que par la mise en contact progressive du cuivre initialement piégé par la MO avec les bactéries. L'évolution du contact bactéries/cuivre serait elle-même due à la dégradation progressive de la matière organique apportée par le compost dans les fractions grossières, qui a fortement accumulée le Cu au moment de la contamination. La MO joue donc dans un premier temps un rôle bénéfique de piège à cuivre limitant son impact, puis au cours de la dégradation de la matière organique, un rôle de source de cuivre favorisant cet impact.

Nos résultats ont donc permis de montrer une forte spatialisation de l'impact du cuivre sur les communautés bactériennes du sol de Clessé en relation avec la localisation des bactéries dans les fractions du sol. En effet, la teneur en COT, la structure des communautés bactériennes, le ratio B^{Cu}/B^{Tot}, ainsi que les $[Cu_{ex}]$ sont très différents entre fractions. L'étude à l'échelle des fractions granulométriques a permis de mettre en évidence des ambiances chimiques et des micro-habitats microbiens spécifiques à la réactivité et sensibilité au cuivre très variables

Pour compléter ces résultats, il nous a semblé important de caractériser l'effet de l'évolution biogéochimique des deux sols sur le devenir physique du cuivre, c'est-à-dire sa capacité à être lessivé par l'eau de pluie qui circule dans le sol. Pour cela, nous avons suivi au cours des deux ans d'incubation des sols contaminés, l'évolution de la mobilité du cuivre sous l'effet d'une pluie artificielle. Les résultats correspondants sont présentés dans le chapitre V suivant.

Chapitre V Etude de la mobilité du cuivre et de son évolution temporelle dans le sol de Clessé

V-1 Introduction

Dans ce chapitre, nous nous sommes spécifiquement interessés à l'état de la mobilité du cuivre dans le sol sous vigne de Clessé. Les transferts de contaminants métalliques ont été étudiés depuis longtemps et sont bien documentés dans la littérature. Le transport de métaux et particules est étudié à différentes échelles (terrain, colonne de laboratoire, échelle du pore,…), suivant les questions scientifiques posées et pour répondre à des problématiques de compréhension fondamentale des écoulements ou de caractérisation plus spécifique du milieu étudié. En effet, une des difficultés dans l'étude du transfert des métaux est que dans les sols naturels, l'efficacité des transferts d'eau et de métaux sont difficilement découplés de l'échelle d'observation. Dans notre cas, nous nous sommes focalisés sur l'échelle de la colonne de laboratoire afin d'étudier les mécanismes prépondérants du transfert du cuivre à travers le sol de Clessé. Le transfert de métaux dans les milieux poreux, remaniés ou non, est très étudié pour comprendre les mécanismes de mobilisation et de rétention de composés inorganiques ou organiques. Cette échelle d'étude est un compromis entre l'échelle de la parcelle et celle du pore, et considérée pertinente pour l'étude des mécanismes prépondérants responsables de la mobilité ou de la rétention des métaux dans les sols.

Le sol est décrit comme un milieu triphasique, avec des phases solide, aqueuse et gazeuse. Un des paramètres importants dans la caractérisation d'un milieu poreux est la porosité définie comme l'ensemble des vides présents. Dans les sols, il existe deux types de porosité, la porosité dite structurale (ou externe) et texturale (ou interne) (Stengel 1979). La porosité texturale est constituée des vides situés à l'intérieur des agrégats de sols, généralement de petite dimension. En revanche la porosité structurale correspond à l'ensemble des vides situés entre les agrégats, dans laquelle le flux d'eau s'écoule préférentiellement, et dont la taille des pores est globalement de plus grande dimension. La porosité structurale dépend fortement de la hiérarchisation de l'organisation du sol en agrégats. L'inter connectivité entre les deux types de porosité joue ainsi un rôle prépondérant dans le transfert de solutés et de colloïdes.

Le transfert de colloïdes et de contaminants dépend également, sinon principalement, de l'ambiance géochimique (force ionique, pH, potentiel redox, concentration des matières organiques dissoutes) et de la micro-physique (porosité, teneur en eau, débit, agencement des pores etc.) du milieu (Schäfer et al. 1998; Guiné et al. 2003; Karathanasis et al. 2005; Kumpiene et al. 2007; Torkzaban et al. 2008). La composition de la solution de lixiviation du sol est contrôlée par au moins trois processus : (i) les interactions aux interfaces solide/liquide, (ii) les échanges avec les gaz, et (iii) les interactions avec les composés issus de l'activité biologique.

Dans les sols, la pluie mobilise par des effets chimiques ou physiques de nombreux métaux et peut entraîner un nombre important de particules, ce qui conduit à l'érosion des sols. Le lessivage représente alors l'entraînement de solutés et de colloïdes par l'eau (particules fines, bactéries et matière organique dissoute). Le mode de transfert des métaux sous forme solide (i.e. associée à un colloïde en exemple), ou dissoute, est susceptible de déterminer son devenir dans la mesure où les distances et vitesses de transfert de ces métaux, en dépendent fortement.

Pour permettre le transport facilité de contaminants par les colloïdes inorganiques et organiques, trois critères doivent être rencontrés. Tout d'abord les colloïdes doivent être générés. Les colloïdes peuvent être générés dans le milieu poreux par des perturbations chimiques dans la solution de transfert (changement de la force ionique, du pH, dessiccation) et perturbation physique (modifications de vitesse d'écoulement, infiltration accéléré) du

milieu (Buffle 1993). Le second critère est que les contaminants doivent être associés à ces colloïdes. La plupart de ces colloïdes (organique, inorganique, biotique) sont des agents de sorption efficaces de polluant de faible solubilité, liée à leur grande surface spécifique du fait de leur petite taille. Les colloïdes inorganiques, telles que les argiles, les oxydes, et les carbonates, sont particulièrement efficaces dans l'adsorption de métaux par des transferts d'ions et des réactions de complexation de surfaces. Et enfin les colloïdes doivent être transportés à travers l'eau du sol (Ryan & Elimelech 1996). Par exemple, les colloïdes biotiques montrent des capacités d'amélioration du transfert de polluant dans les sols (Guiné et al. 2003). Cependant si l'interaction entre polluants et colloïdes est faible alors le transport facilité par les colloïdes ne sera pas garanti (Sposito 1984), car le transport de colloïdes dépend aussi de la force d'attachement de ceux-ci à la surface du milieu poreux.

Dans le cas du cuivre, les mécanismes précis sont encore mal conus. En particulier, on connaît mal la proportion de cuivre mobilisée sous forme dissoute (contrôlée par la sollubilité de l'espèce chimique dominante), sorbée sur des particules ou colloïdes biotiques ou abiotiques, ou encore complexée à la MO dissoute. Il est donc difficile, dans ce contexte, de prédire de manière précise le risque de contamination des eaux de surface ou souterraines par le cuivre apporté de manière chronique en culture de vigne soumise par ailleurs à des modes de gestions organiques très variable.

Ce dernier chapitre de la thèse avait donc pour but d'étudier l'évolution de la mobilisation du cuivre dans le sol de Clessé en relation avec le vieillissement de la contamination au cuivre au cours des deux ans d'incubation. Par des essais de lessivage contrôlés en colonnes de laboratoire, nous avons caractérisé le potentiel de lixiviation du cuivre dans le sol de Clessé amendé ou non en compost de conifère et contaminé ou non en cuivre. Les sols ont été prélevés régulièrement au cours de l'incubation dans les mésocosmes de laboratoire. Les objectifs de cette étude en colonnes étaient de caractériser les facteurs contrôlant la mobilité du cuivre dans le sol de Clessé amendé ou non en matière organique. Nous avons pu identifier les principaux mécanismes de transfert du cuivre en caractérisant à chaque pas de temps et pour les quatre situations testées, l'évolution temporelle des facteurs bio-physicochimiques du sol susceptibles de contrôler sa mobilité : le pH, le carbone organique dissous (COD), les colloïdes du sol mobilisés et en particulier les cellules bactériennes (très réactives vis-à-vis des métaux). Un essai de modélisation couplée hydro/géochimie du cuivre dans les deux sols a été mené à l'aide du logiciel PhreeqC sur la base des paramètres suivant : la concentration en cuivre qui a été modélisé en fonction du COD (représentant l'ensemble de la MO lessivée incluant les bactéries), la spéciation du cuivre, la composition minérale et organique du sol.

V-2 Matériel et méthodes

V-2-1 Mise en place du dispositif expérimental.

L'étude de l'évolution de la mobilité du cuivre dans le sol de Mâcon-Clessé au cours de l'incubation a été menée par une approche en colonnes de sols (Pharmacia Biotech) bien maîtrisée au LTHE. Les essais de lessivage du cuivre en colonnes ont été réalisés en conditions transitoires avec l'infiltration d'une lame d'eau simulant une pluie de 500 mm (ce qui correspond à la moitié de la quantité d'eau de pluie qui tombe en une année sur le département de Saône et Loire) dans le sol prélevé à une humidité similaire tout au long de l'incubation ($\theta \approx 20$ %). Ces essais de lessivage du cuivre ont été réalisés avec du sol prélevé dans les mésocosmes de laboratoire aux mêmes temps que précédemment 0, 0.23, 1, 2, 7, 14. 18 et 24 mois d'incubation.

L'outil de mesure se compose d'une colonne de 2.5 cm de diamètre contenant le sol, d'une pompe péristaltique permettant d'injecter, sur le haut de la colonne, de l'eau bidistillée représentative d'une forte pluie. Il n'y a pas de formation d'une lame d'eau au dessus de la colonne (sauf dans un cas de colmatage, colonne notée d'un (c) dans le Tableau V-1). Les effluents de colonne sont récoltés avec un collecteur de fractions (Gilson, modèle 203), en bas de colonne (Figure I-1). Une étape critique concerne l'introduction du sol dans les colonnes qui a toujours été effectué de la même manière.

Le sol prélevé dans les mésocosmes d'incubation est inséré dans les colonnes par couches de 1 cm environ. Chaque couche ainsi ajoutée est légèrement compactée afin de maintenir une masse volumique apparente constante sur l'ensemble de la colonne et proche de 1 $g.cm^{-3}$, inférieure à celle de la parcelle viticole (1.35 $g.cm^{-3}$). Le sol a été introduit à une humidité moyenne de 15 ± 4 %. A chaque extrémité de la colonne ont été apposées des grilles surmontées d'un filtre de polypropylène polyamide de 50 µm d'ouverture de maille (GE Healthcare Life Science) pour maintenir les sols et limiter le lessivage de particules.

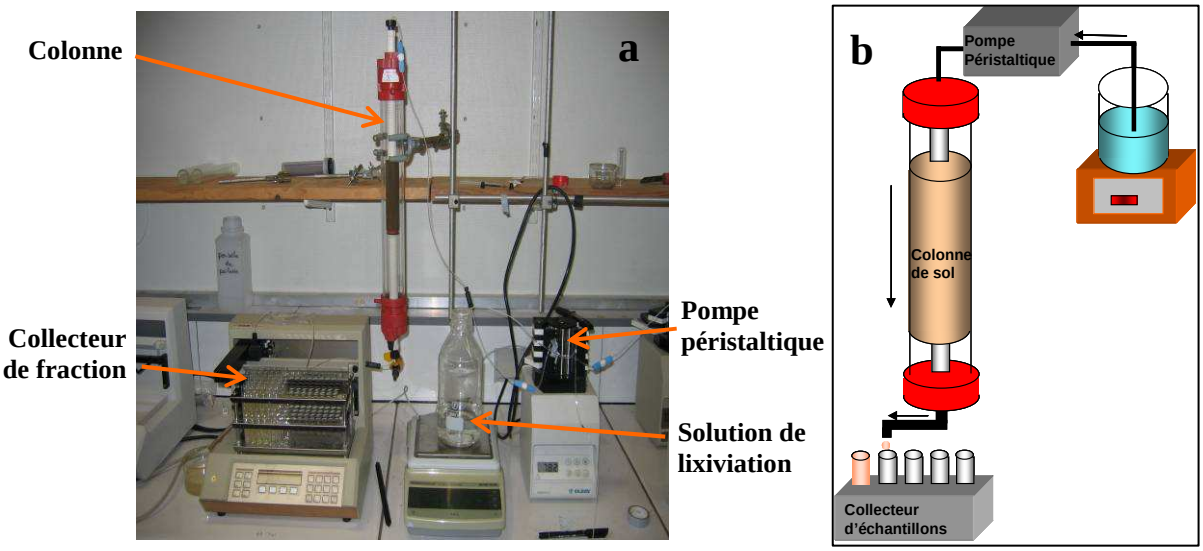


Figure V–1 : Photo (a) et schéma (b) du système de lessivage des sols en colonne, avec de gauche à droite : le collecteur de fraction, la colonne, le réservoir contenant la solution de lessivage et la pompe péristaltique.

Pour décrire les caractéristiques spécifiques du milieu poreux, on définit :

- Le volume total V_T de la colonne : volume du cylindre en verre dans lequel est introduit le milieu poreux calculé à partir de son diamètre ($Ø$ = 2.6 cm) et de la hauteur (h) de remplissage variant entre 10.7 et 11.7 ±0.1 cm.

$$V_T = \left(\frac{\phi}{2}\right)^2 \times h \qquad \textbf{[V-1]}$$

- L'humidité massique (W) du sol introduit est obtenue par mesure de la différence des poids humides et secs d'échantillons des sols prélevés simultanément dans les mésocosmes de laboratoire. Cette analyse permet de calculer la masse m_s du sol sec présent dans la colonne à partir de la mesure de la masse du sol humide m_H introduit :

$$W = \frac{m_H - m_s}{m_s} \qquad \textbf{[V-2]}$$

- La masse volumique apparente du milieu poreux (ρ_d) est calculée par l'équation suivante :

$$\rho_d = \frac{m_s}{V_T} \qquad \textbf{[V-3]}$$

- La porosité (n) du sol correspond au volume relatif des vides dans le milieu poreux sec rapporté au volume total de sol :

$$n = \frac{V_p}{V_T} = 1 - \left(\frac{\rho_d}{\rho_s}\right) \qquad \textbf{[V-4]}$$

Avec V_p le volume poral ou volume des vides en milieu sec et ρ_s est la masse volumique du solide fixée à 2.65 kg.m^{-3}.

- La teneur en eau volumique, correspond au volume d'eau (V_{eau}) présent dans la colonne divisé par V_T. Le V_{eau} correspond au volume total d'eau dans la colonne, c'est-à-dire au volume d'eau introduit par l'humidité du sol dans la colonne, plus l'eau injectée dans le milieu poreux pendant le lessivage. On obtient ce deuxième volume en mesurant la différence de poids de la colonne avant et après le lessivage.

$$\theta = \frac{V_{eau}}{V_T} \qquad \textbf{[V-5]}$$

- La vitesse de Darcy, q, est définie comme une vitesse fictive de l'eau traversant la section totale d'écoulement de la colonne comme s'il n'y avait pas de matière solide réduisant la section d'écoulement.

Nous avons suivi l'évolution de la mobilité du cuivre dans le sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en composte de conifère (CC), contaminé (Cu) ou non (H_2O) au cuivre en laboratoire. Les échantillons ont été prélevés dans les différents mésocosmes de laboratoire aux huit temps d'incubation définit dans le Tableau V-1. Au total, nous avons effectué 24 essais de lixiviation tout au long des deux ans d'incubation des sols. L'infiltration d'eau simulant une pluie de 500 mm se fait à flux permanent qui s'établit très rapidement après une

courte phase initiale transitoire pendant laquelle le sol se sature en eau (~90 %). Une phase de flux permanent s'établit alors jusqu'en fin d'expérience correspondant à 7 (± 1) volumes de pores (Vp). Le débit d'écoulement est imposé à 30 $mL.h^{-1}$, ce qui correspond à une vitesse de Darcy (q) de 5.6 $cm.h^{-1}$ dans les colonnes. La mesure de la masse des échantillons récoltés nous permet aussi de suivre la stabilité du flux d'eau au cours du lessivage. L'analyse des effluents nous renseigne sur la nature et les concentrations des solutés et particules lessivés, ainsi que leur évolution au cours d'une expérience de lessivage et tout au long de l'incubation des sols. Nous avons ainsi suivi le pH, la turbidité, les concentrations en carbone organique dissout et en cuivre total mobile (dissous, libre et sorbé sur les particules mobiles), et le nombre et la nature des bactéries hétérotrophes cultivables totales ($[B^{Tot}]$) et résistantes au cuivre ($[B^{Cu}]$). Dans certains cas, les solutions récupérées dans le collecteur d'échantillons ont été regroupées par trois afin d'avoir un volume suffisant pour les analyses.

Les différentes méthodes d'analyse utilisées sont listées ci-dessous :

- La turbidité des échantillons, mesurée à l'aide d'un spectromètre Biowave II (Serlabo technologie, Grenoble), permet de quantifier la lumière absorbée par les particules en suspension à la longueur d'onde 600 nm.
- Le pH de la solution lessivée est mesuré à l'aide d'un pH mètre Metrohm.
- Les mesures de carbone organique dissous ont été réalisées avec un analyseur TOC (SCHIMADZU) localisé à ISTerre, Grenoble.
- Les concentrations en cuivre libre en solution $[Cu^{2+}]$ ont été mesurées avec une électrode sélective au cuivre Metrohm no. 6.0253.100 (nommée ISE-Cu par la suite), avec une électrode de référence Ag/AgCl Metrohm.
- La concentration totale dissoute en cuivre $[Cu_{aq}]$ des effluents a été mesurée à l'ICP-AES (Perkin Elmer) localisé à ISTerre, Grenoble.
- L'énumération des bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}) et résistantes (B^{Cu}) au cuivre, a été effectuée par dépôts de 100 µL d'effluent de colonne dilué sur boite de Pétri avec un milieu de culture nutritif riche (*Luria Bertani broth ;* LB) ou avec un milieu sélectif au cuivre (YG-Cu) (Annexe C). Nous avons également identifié les souches bactériennes dominantes des populations bactéries B^{Tot} et B^{Cu} qui ont été isolées sur les milieux LB et YG-Cu, après extraction, amplification et séquençage de l'ADN ribosomique 16S (c.f. Chap. III). Les résultats sont présentés sous forme d'arbres phylogénétiques pour chaque sol (NA et CC). Ces arbres phylogénétiques comprennent nos séquences obtenues par séquençage et celles du plus proche organisme bactérien identifié par comparaison avec la base de données (NCBI). L'alignement multiple de toutes les séquences a été réalisé en utilisant l'algorithme CLUSTAL 2.0 (Larkin et al. 2007) inclus dans le logiciel ClustalX. Les matrices de distances ont été calculées en utilisant le modèle de Kimura à deux paramètres (Kimura 1980). Les arbres phylogénétiques ont ensuite été construits avec le logiciel ClustalX et la méthode de « neighbour-joining » (Saitou & Nei 1987). Enfin, pour tester la robustesse des relations phylogénétiques existantes au sein de l'arbre, la méthode des « bootstraps » a été appliquée.

V-2-2 Modélisation du transfert de cuivre en colonne de sol de Clessé

La modélisation du transfert du cuivre dans le sol de Clessé a été conduite avec le logiciel PHREEQC Interactive – version 2.15.06 (Parkhurst & Appelo 1999). Ce logiciel permet de

coupler des calculs d'équilibre chimique en milieu homogène et hétérogène (solution en présence de gaz et solides et d'interfaces réactifs) avec des calculs de transfert dans les systèmes étudiés pour analyser à la fois les données et les fonctions géochimiques du sol avec le transfert.

Pour cette modélisation, le code traite le problème de transfert en générant une chaîne verticale de réacteurs chimiques représentant une colonne de sol. Le transfert est simulé par le déplacement simultané des solutions des réacteurs n vers les réacteurs n+1, après avoir résolu le problème de spéciation chimique individuellement dans chaque couche de sol dans la colonne. L'avantage de cette approche est de pouvoir coupler des calculs de spéciation chimique trop complexes pour être résolus analytiquement simultanément avec le problème hydrodispersif. Il est démontré que ce procédé, qui consiste en fait à discrétiser temporellement et spatialement les processus ayant lieu dans la colonne de sol, reproduit les solutions générées par l'équation de convection dispersion au moins pour les situations de transfert réactifs les plus courants sur le plan analytique (élution d'un traceur, sorption de type Langmuir avec ou sans dégradation de composés suivant des lois simples pouvant être résolus analytiquement). On notera aussi que le code PHREEQC permet également de (i) résoudre des problèmes cinétiques librement définis et (ii) des problèmes d'écoulement bimodaux non utilisés dans le cadre de ce travail.

La simulation des expériences de lessivages du cuivre requiert le recensement des différents processus physiques et chimiques associés mais aussi leur conceptualisation et simplification. On considère donc pour cette modélisation, que le sol en colonne est défini par : (i) une phase solide stationnaire constituée de diverses composantes réactives (par exemple : matière organique, argiles, oxydes de Fer) pouvant échanger des cations (le cuivre en l'occurrence) et des protons, et (ii) une phase solide et aqueuse, mobile et réactive face aux protons et au cuivre. Dans le cadre de cette étude, on ne disposait pas de la résolution analytique permettant de distinguer en détail la nature des phases réactives.

Le script PhreeqC permettant la simulation du problème de lessivage posé est présenté en Annexe J.

V-3 Résultats et discussion

V-3-1 Caractérisation des colonnes du sol de Clessé.

Les conditions expérimentales et les paramètres physiques des colonnes de sol de Clessé sont présentés dans le Tableau V-1. Nous avons suivi la mobilité du cuivre au cours de l'incubation dans quatre situations suivantes : le sol de Clessé non amendé en matière organique (NA) contaminés en cuivre à 240 ppm (NACu) ou non (NAH_2O) et le sol amendé en compost de conifère (CC) contaminés en cuivre à 240 ppm (CCCu) ou non (CCH_2O). Les propriétés des colonnes de sols sont relativement constantes montrant la bonne reproductibilité de la mise en place des sols dans la colonne.

La masse de sol sec introduite dans les colonnes varie de 45 g à 68 g entre les différents sols et conditions de contamination (Tableau V-1). Les masses volumiques apparentes du milieu poreux sont constantes et proche de 0.97+/-0.1 $g.cm^{-3}$. La porosité mesurée des deux sols varie entre 0.55 pour NA et 0.70 pour CC. Ces valeurs de porosité sont élevées à cause du faible tassement du sol lors de sa mise en place en colonne pour ne pas détériorer les agrégats. Les faibles variations de masses volumiques et de la porosité dans les différentes colonnes de sols au cours de l'incubation confirme la bonne reproductibilité de la mise en place des sols dans les colonnes, et permettent donc de comparer les résultats obtenus avec les différentes conditions testées.

La teneur en eau volumique du sol (Tableau V-1) mesurée en fin d'expérience correspond au volume total d'eau (eau infiltré + eau du sol initialement présente) par rapport au volume total de la colonne. Elle a été mesurée en moyenne à 0.53 ± 0.1. Le degré de saturation en eau des sols dans l'ensemble des colonnes en fin d'expérience était en moyenne de 0.84 ± 0.1 qui est une valeur classique de saturation effective en eau des sols de surface en raison du piégeage de bulles d'air. Pour modéliser les résultats de lixiviation du cuivre, nous avons utilisé les valeurs moyennes des paramètres de transport.

Tableau V-1 Conditions expérimentales et propriétés physiques des colonnes de sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA).

Sol de Clessé	Date relative de l'essai (mois)	Masse de sol sec m_s (g)	Masse Volumique du sol ρ_d (g.cm^{-3})	Porosité du sol n (-)	Teneur en eau volumique θ (-)
Non Amendé non contaminé (NAH_2O)	0	49.61	0.87	0.67	0.58
	0.23	52.73	0.92	0.65	0.51
	1	56.71	0.99	0.63	0.46
	2	61.14	1.07	0.60	0.61
	7(c)	59.90	1.05	0.60	n.d.
	14(c)	55.05	0.94	0.64	0.60
	18	67.72	1.18	0.55	0.43
	24	66.72	1.12	0.58	0.49
Non Amendé Contaminé en Cu (NACu)	0 (c)	49.15	0.88	0.67	0.28
	0.23	61.76	1.08	0.59	0.47
	1	57.05	1.00	0.62	0.69
	2	56.19	0.98	0.63	0.56
	7	61.00	1.07	0.60	n.d.
	14	57.31	1.00	0.62	0.57
	18	57.75	1.01	0.62	0.63
	24	63.29	1.07	0.59	0.50
Amendé non contaminé (CCH_2O)	0	49.75	0.87	0.67	0.60
	0.23	44.81	0.79	0.70	0.51
	1	52.91	0.93	0.65	0.42
	2	54.85	0.96	0.64	n.d.
	7	45.85	0.80	0.70	n.d.
	14 (c)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	18	60.54	1.07	0.60	0.54
	24	62.52	1.03	0.61	0.53
Amendé contaminé en Cu (CCCu)	0	52.03	0.89	0.66	0.51
	0.23	50.83	0.89	0.66	0.47
	1	52.46	0.92	0.65	0.63
	2	52.07	0.91	0.66	n.d.
	7	53.57	0.94	0.65	n.d.
	14 (c)	55.06	0.91	0.66	0.66
	18	54.67	0.96	0.64	0.56
	24	66.09	1.06	0.60	0.51

n.d. : non déterminé

(c) : colonne colmatée avant la fin de l'expérience de lessivage.

Pour caractériser les propriétés de la solution du sol de Clessé NA ou CC, nous avons effectué des mesures préliminaires à la mise en place du sol en colonne, en mettant en équilibre du sol et de l'eau déminéralisée. Nous avons alors mesuré la conductivité électrique (CE), la concentration en majeurs, et la force ionique (FI), pour voir l'effet de l'amendement sur ces propriétés du sol. Le Tableau V-2 présente les mesures de ces différents paramètres. Les conductivités électriques (CE) de la solution du sol en équilibre avec de l'eau déminéralisée sont de 424 $\mu S.cm^{-1}$ et 616 $\mu S.cm^{-1}$ pour les sols NA et CC, respectivement. L'amendement organique augmente la conductivité électrique de la solution du sol de Clessé, ce qui implique une augmentation de la quantité d'ions et/ou de molécules chargées en solution en présence de MO. Les concentrations des ions majeurs Ca^{2+}, K^{+}, Mg^{2+}, Na^{+} (en ordre de concentration décroissant) dans la solution du sol à l'équilibre obtenues avec un rapport sol/solution de 1/2, sont présentées dans le Tableau V-2. Le calcium est fortement remis en solution dans ce sol avec une concentration de 62 $mg.L^{-1}$ et 78 $mg.L^{-1}$dans les sols NA et CC, respectivement. L'apport de MO modifie que légèrement la mise en solution du Ca. Ceci indique que la mise en solution du calcium pourrait être contrôlée par les argiles (identique entre les deux sols) via les sites d'échange cationique. Le calcium entre en compétition avec les métaux présents dans la solution des sols pour l'adsorption sur les sites réactifs des phases stationnaires et mobiles. Ces phénomènes de compétitions affectent le transport des solutés réactifs dont celui du cuivre.

Tableau V-2 Propriétés chimiques (Conductivité Electrique, concentration en cations majeurs, et Force Ionique) de la solution du sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA). Les mesures ont été effectuées après mise en équilibre de 50 g de sol et de 100 mL d'eau déminéralisée.

Sol	**CE**	**Ca^{2+}**	**K^{+}**	**Fe^{3+}**	**Mg^{2+}**	**Na^{+}**	**Al^{3+}**	**FI**
	$\mu S.cm^{-1}$	**$mg.L^{-1}$**	**$mg.L^{-1}$**	**$mg.L^{-1}$**	**$mg.L^{-1}$**	**$mg.L^{-1}$**	**$mg.L^{-1}$**	**$mmol.L^{-1}$**
Contrôle (NA)	424	61.6	8.9	0.3	9.3	2.6	0.6	0.00413
Amendé en compost (CC)	616	78.3	12.8	0.2	12.0	2.7	0.4	0.00520

En revanche, bien que le sol de Clessé soit fortement enrichi en Fe et Al (Tableau V-2), ces éléments sont très peu présents en solution avec des concentrations moyennes de 0.25 et 0.5 $mg.L^{-1}$, respectivement pour les sols NA et CC. Ceci est probablement lié à la très faible solubilité des phases solides hydroxydes correspondants. La force ionique de la solution du sol, exprimée comme la somme de la concentration ionique multipliée par la charge des ions affecte principalement la tendance à l'agrégation des matières suspendues en solution, et peut donc affecter la mobilité des colloïdes très réactifs avec les métaux (Guiné et al. 2006; Guine 2006; Sen & Khilar 2006; Kumpiene et al. 2007; Torkzaban et al. 2008). Dans notre étude, nous avons mesuré seulement la concentration en cations majeurs dans les effluents de colonne de sol. Dans les sols NA et CC, la force ionique ainsi exprimée (sans anions) est de 4.1 et 5.2 $mmol.L^{-1}$ respectivement. L'amendement organique augmente donc légèrement la conductivité électrique, ainsi que la force ionique de la solution du sol de Clessé.

V-3-2 Evolution temporelle de la mobilité du cuivre en colonne de sol

V-3-2-1 Courbes de lessivage du cuivre total

La Figure V–2 présente les courbes de lessivage de la concentration en cuivre total mobile (dissous, libre et sur les particules mobiles), noté [Cu_{aq}], mesurée à l'ICP-AES dans les sols contaminés (Cu) ou non (H_2O). Dans les deux sols NA et CC non contaminés (H_2O) au cuivre (Figure V–2), les [Cu_{aq}] dans les effluents sont de l'ordre de 0.1 mg.L^{-1} avec un épuisement progressif du cuivre jusqu'à 0.02 mg.L^{-1}. Les courbes de lessivage du cuivre des deux sols non contaminés n'évoluent pas au cours de l'incubation indiquant que le cuivre présent dans les sols collectés sur la parcelle, ne semble plus 'vieillir' et présente donc une mobilité très constante et faible (0.03 % du Cu total). Ceci indique que les liaisons sol-cuivre sont stables dans les sols non contaminés tout au long de l'incubation en laboratoire.

Dans les sols contaminés au cuivre (Figure V–2), les [Cu_{aq}] sont beaucoup plus élevées que dans les sols non contaminés indiquant que le cuivre apporté lors de la contamination est plus mobile que le cuivre initialement présent dans les sols. Juste après la contamination, les concentrations maximales en cuivre lessivées sont de 0.28 mg.L^{-1} et 0.53 mg.L^{-1} pour les sols NA et CC, respectivement. C'est-à-dire que les concentrations en cuivre sont 3 et 5.5 fois plus élevées que dans les sols non contaminés, en accord avec les différences de teneurs totales en cuivre entre les sols contaminés (325 mg.kg^{-1}) et non contaminés (70 mg.kg^{-1}), soit un facteur 4.7 environ pour les deux sols.

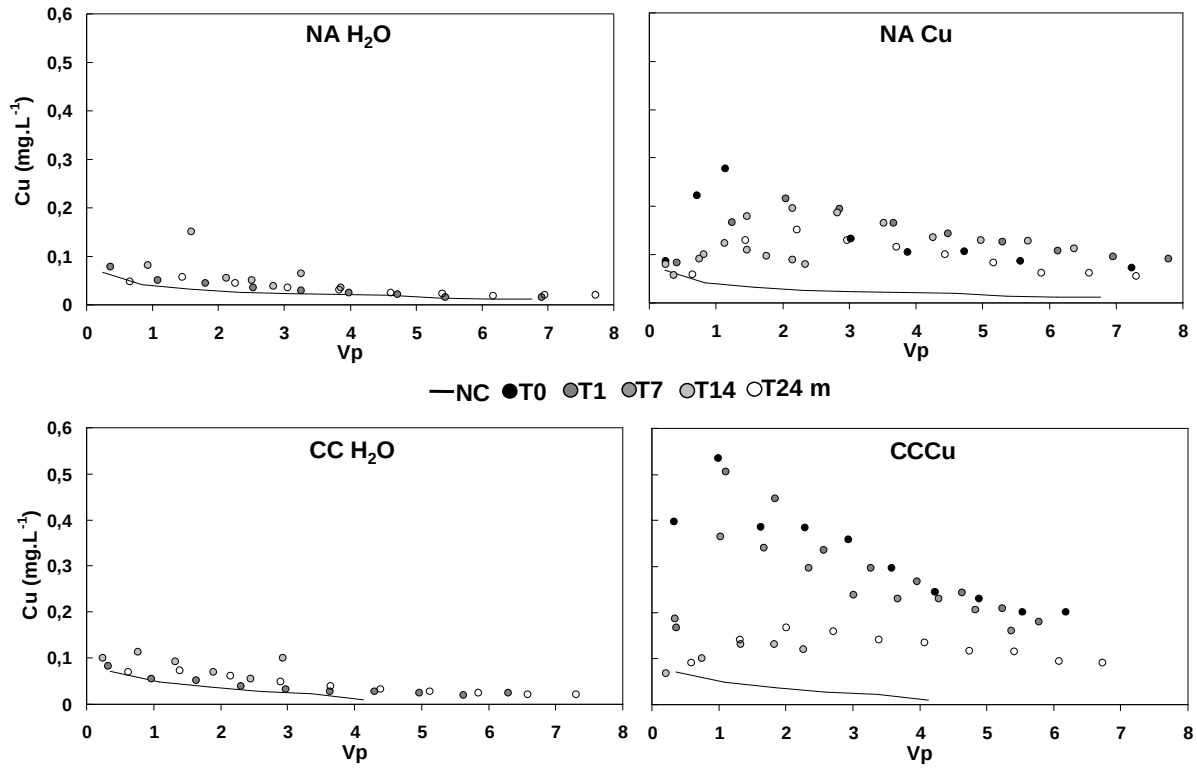


Figure V–2 Evolution temporelle des courbes de lessivage du cuivre total mobile (mg.L^{-1}) au cours de l'incubation dans le sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA), contaminés en cuivre (Cu) ou non (H_2O). NA H_2O, CC H_2O, NA Cu, CC Cu. NC : avant contamination

De plus dans les sols contaminés, les quantités de cuivre lessivées à l'eau évoluent significativement au cours de l'incubation. Au cours de l'incubation, on observe une

diminution évidente des [Cu_{aq}] lessivées par une même lame d'eau simulant une pluie de 500 mm. Cette diminution est plus conséquente pour le sol CC que pour le sol NA. En effet, le maximum de concentration en cuivre mobile ([Cu_{aq}]) passe de 0.28 à 0.12 $mg.L^{-1}$ dans le sol NA et de 0.53 à 0.17 $mg.L^{-1}$ pour le sol CC. Les concentrations en cuivre en solution diminuent au cours de l'incubation des sols, pour se rapprocher finalement des valeurs de [Cu_{aq}] des sols non contaminés. Cette évolution à la baisse du cuivre mobilisable dans les deux sols au cours de l'incubation est en accord avec l'évolution des concentrations en cuivre échangeable, mesurées dans les sols non fractionnés et les fractions granulométriques, qui diminue aussi avec le temps (Chap. III et IV). Cette évolution temporelle indique que les mécanismes de rétention du cuivre évoluent au cours de l'incubation des sols et donc que la contamination au cuivre 'vieillit'. On observe donc que plus la contamination au cuivre vieillit, plus le cuivre est fortement associé à la phase solide, et il est moins facilement remis en solution. Ces résultats impliquent que le cuivre ne peut être que minoritairement fixé aux colloïdes, car on peut supposer que le vieillissement du cuivre sur les phases solides mobiles et immobiles étant similaire, on ne devrait pas observer de diminution des quantités de cuivre lessivées si le transfert colloïdal restait inchangé. Cette hypothèse est en accord avec le vieillissement du cuivre échangé dans le sol non fractionné des mésocosmes. Ceci semble vrai en particulier pour le sol CC, puisque les quantités de cuivre varient beaucoup moins dans le temps pour ce sol. Pour vérifier ces hypothèses nous avons suivi le lessivage des particules et de la MO du sol de Clessé au cours du temps par une mesure de la turbidité (DO600).

Dans les sols contaminés en cuivre, une partie du cuivre présent dans ce sol est en permanence mobilisable bien qu'une très grande partie soit retenue sur la phase solide immobile. Après deux ans d'incubation des sols contaminés, une quantité minimale de cuivre est mobilisable en solution soit sous forme dissoute (minoritaire dans les deux sols), soit sous forme colloïdale (sol NA) sois sous forme complexée à la MO (sol CC). Cette interprétation est appuyée par les travaux de Schmitt (2003) et Salam & El-Fadel (2008) qui ont montré que l'amplitude des concentrations en cuivre aqueux est fortement dépendante de la teneur en matière organique du sol, démontrant ainsi que la MO facilite la mobilité du cuivre.

V-3-2-2 Spéciation du cuivre lessivé

Pour mieux comprendre et identifier les mécanismes de transfert du cuivre dans le sol de Clessé, nous avons cherché à caractériser la spéciation du cuivre en solution et en particulier la proportion de cuivre libre. La Figure V–3 présente les concentrations en cuivre libre ([Cu^{2+}]) lessivées mesurées avec une électrode sélective (ISE-Cu). Les résultats de la concentration en cuivre libre ont montré que la [Cu^{2+}] est très faible pour les deux sols (surtout dans CC) et relativement constantes durant tout le lessivage (≈ 0.1 %, de [Cu_{aq}]). La concentration en cuivre libre ne dépend pas à priori de la présence de particules et de la MOD, mais dépend de la concentration totale de sites récepteurs sur les phases solides et mobile, ce qui explique que [Cu^{2+}] soit constant au cours de chaque lessivage. Par contre, le Cu_{aq} (cuivre total lessivé) doit fluctuer en fonction de l'abondance des phases porteuses mobiles que sont les particules en suspensions (turbidité) dont fait partie le carbone particulaire, et dissous. Pour vérifier cela, nous avons quantifié dans les effluents de colonnes, ces phases porteuses mobiles par des mesures de turbidité et de COT_{aq}.

Le fait que le cuivre total mobile (Cu_{aq}) diminue avec le temps permet d'affirmer que le cuivre non libre c'est-à-dire complexé ou particulaire est supérieur en concentration au cuivre libre. Autrement on aurait observé des concentrations en cuivre total lessivé constantes dans les effluents de chaque essai de lixiviation.

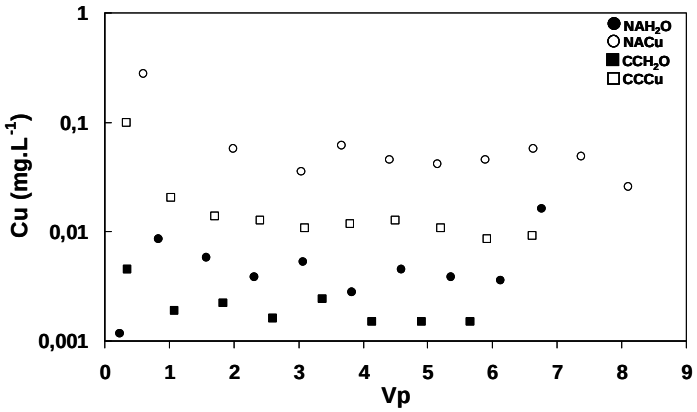


Figure V–3 Exemple de courbes de lessivage (à T0 mois) du cuivre libre [Cu^{2+}] ($mg.L^{-1}$) dans le sol contrôle (NA) et amendé en compost de conifère (CC) non contaminés (H_2O) et contaminés (Cu) au cours de l'incubation.

Pour mieux comprendre le vieillissement de la contamination au cuivre et en particulier l'évolution temporelle du cuivre lessivable au cours de l'incubation, nous avons intégré les concentrations en cuivre libres et totales mobile lessivées par une lame d'eau de 500 mm (soit 7 Vp) pour obtenir les quantités cumulées de cuivre Cu_{aq} et Cu^{2+} lessivé à chaque pas de temps (Figure V–4) pour les sols contaminés uniquement.

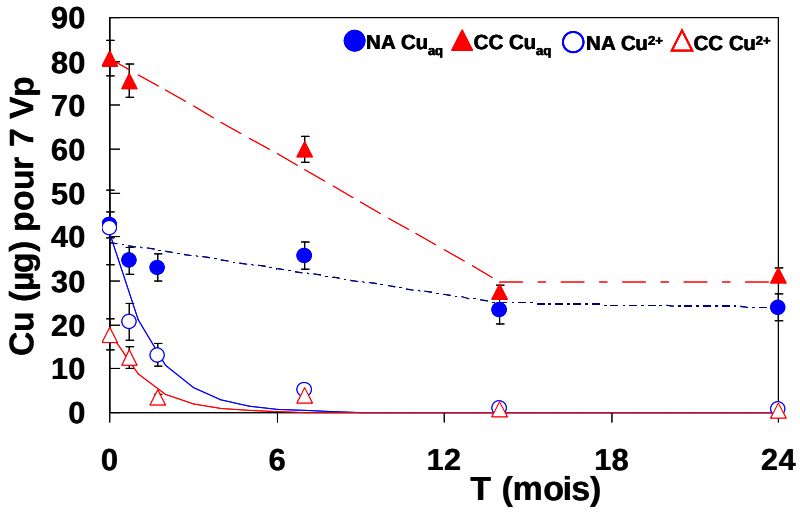


Figure V–4 Evolution temporelle des quantités de cuivre total mobile (Cu_{aq}, symboles pleins) et libre (Cu^{2+}, symboles vides) lessivées par une lame d'eau de 500 mm (soit 7 Vp) dans le sol de Clessé amendé (triangle) ou non (rond) en compost de conifère. Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs analytiques.

Pour les sols non contaminés (H_2O), les concentrations en Cu^{2+} sont proches de la limite de détection, c'est pourquoi nous ne présentons pas ces résultats. En absence de contamination récente la lixiviation du Cu 'natif' dans ces sols n'évolue pas significativement au cours de l'incubation et les concentrations sont aussi très faibles, avec une quantité cumulée de Cu_{aq} lessivé de ces sols qui est de 11 ±4 et 12 ±5 µg, pour les sols NA et CC respectivement, et quelque soit le temps d'incubation. L'amendement organique ne modifie donc pas la quantité de cuivre lessivée lorsque le cuivre apporté sous forme de bouillie bordelaise est stabilisé *in situ*.

Les résultats de la Figure V–4 montre que l'amendement organique du sol modifie fortement la mobilité du cuivre lors des lessivages à l'eau. Ainsi, juste après la contamination au cuivre, les quantités de cuivre (42.8 et 80.7 µg de cuivre pour les sols NA et CC

respectivement) mobilisables par lessivage sont deux fois plus importantes dans le sol CC que dans le sol NA, même si elles restent assez faibles particulièrement pour le sol non amendé en compost. Dans ces deux sols, le transfert du cuivre s'effectue donc probablement selon des mécanismes différents.

Au cours de l'incubation, les quantités de cuivre lessivable diminuent rapidement avec le temps et particulièrement dans le sol CC lors de la première année, après laquelle ces quantités se stabilisent et se rapprochent de celle du sol NA. Dans le sol contrôle, en revanche, la quantité de cuivre diminue faiblement au cours des deux ans d'incubation. Les mécanismes de rétention du cuivre dans ce sol n'évoluent que faiblement au cours de l'incubation. Après environ un an d'incubation, les quantités de cuivre lessivable des deux sols ne varient plus. Toutefois, après 24 mois d'incubation, les quantités de cuivre mobile restent environ 3 fois plus importantes dans les sols NACu et CCCu (24 et 31 µg pour une pluie de 500 mm) que dans les sols non contaminés (8 et 10 µg). L'évolution temporelle des quantités de cuivre lessivé dans le sol CC montre que le cuivre mobilisable 'vieillit' au cours du temps en relation avec l'évolution de sa spéciation au contact des phases porteuses qui semblent différentes entre le sol NA et le sol CC. En effet, la forme mobilisable du cuivre semble plutôt stable dans le sol NA, suggérant une forte implication des colloïdes (dont le lessivage est stable). Au contraire dans le sol CC, l'évolution de la spéciation du cuivre évolue notamment en relation avec les interactions avec la MO. En effet, Ashworth & Alloway (2007) ont montré que la MO est importante dans la lixiviation du cuivre.

En parallèle, à T0, la quantité en cuivre libre (Cu^{2+}) est de 42.1 et 17.8 µg pour les sols NA et CC respectivement. Juste après la contamination, 95 % du cuivre lessivé dans le sol NA est présent sous forme libre, alors que le cuivre libre compte seulement pour 25 % dans le sol CC. Dans le sol CC, la majorité du cuivre est donc lessivé sous une forme non libre, c'est-à-dire sous forme colloïdale ou complexée à la matière organique dissoute. Nos résultats montrent que l'amendement organique modifie significativement la spéciation du cuivre et sa rétention sur les phases réactives du sol.

On peut supposer que les phases organiques apportées par l'amendement ainsi que l'augmentation de la concentration en MOD sont responsables de l'augmentation de la mobilité du cuivre dans ce sol, comme cela a été montré dans des études récentes (Karathanasis et al. 2005; Bao et al. 2011) mettant en relation la formation de complexes Cu/MO et l'augmentation de la mobilité du cuivre. Temminghoff et al. (1998) ont également montré que la coagulation et la mobilité de la matière organique dissoute favorisent la mobilité du cuivre, ainsi que la désorption du cuivre retenu dans le sol. Nos résultats sont toutefois en désaccord avec ceux de Kumpiene et al. (2007) qui ont montré clairement que l'amendement en MO sur un sol diminue la lixiviation des métaux soumis aux conditions climatiques (notamment les précipitations) de terrain.

V-3-3 Evolution du pH au cours du lessivage du sol de Clessé

Au cours de chaque essai de lixiviation, nous avons suivi le pH des lixiviats récoltés en sortie de colonnes avec une électrode pH (Figure V–5) dans les sols NA et CC. Le pH des effluents des colonnes varie entre 6.6 et 7.4 dans les deux sols et pour les deux conditions de contamination. Globalement, le pH des effluents reste stable au cours des lessivages et également au cours du temps pendant les deux ans d'incubation. La contamination en cuivre, l'apport en MO, et le vieillissement du sol dans les mésocosmes de laboratoires ne semblent pas significativement affecter le pH des effluents.

Le constat que le pH n'évolue pas au cours de l'incubation est similaire à la faible variation du pH dans les mésocosmes de laboratoire (cf. Chapitre III, Figure III–4).

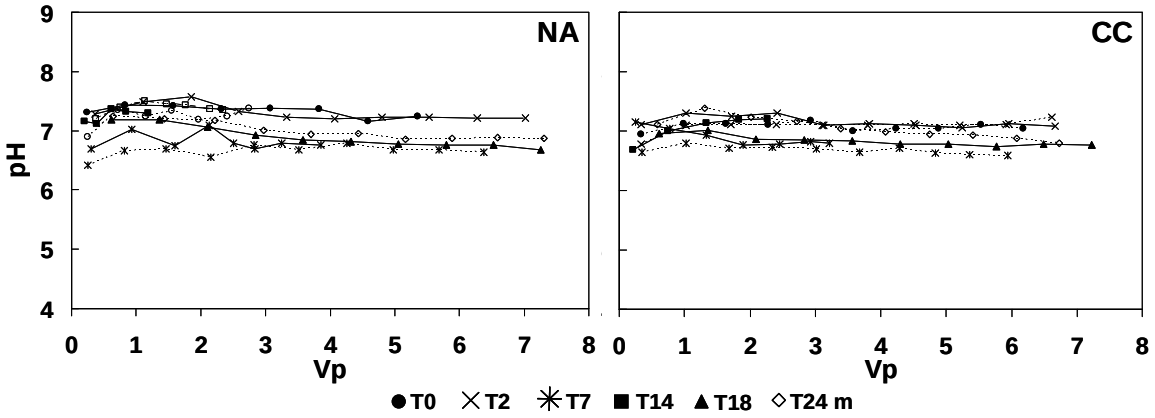


Figure V–5 Evolution du pH des effluents au cours du lessivage des colonnes de sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en compost de conifères (CC) contaminés (trait pointillé) ou non (trait plein) au cuivre pour chaque temps d'incubation.

V-3-4 Evolution du lessivage des particules du sol de Clessé.

Les effluents de colonnes de sol de Clessé présentent une turbidité importante et dont l'intensité varie au cours du lessivage à l'eau (Figure V–6a). La turbidité et la coloration des solutions est d'abord faible, puis croit avec l'intensification de la couleur très orangée de la solution (riche en particules), passe par un maximum, puis décroît en fin de lessivage.

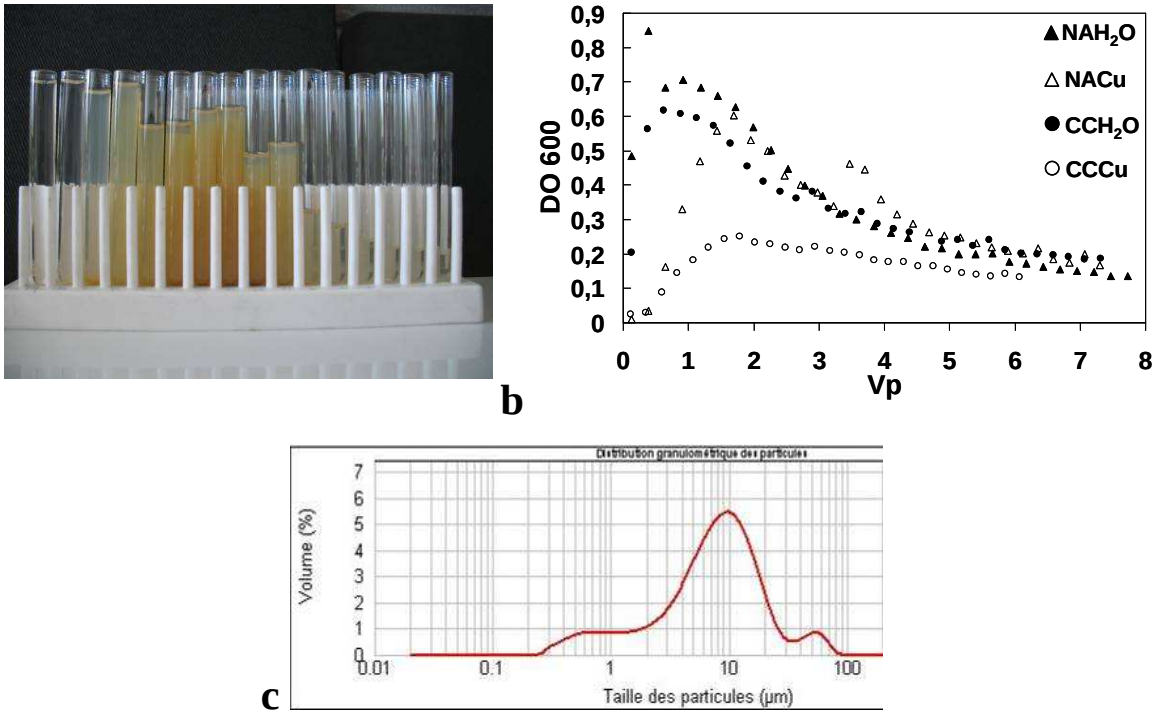


Figure V–6 Photo d'une série d'échantillons de lessivage en sortie de colonne (a). Evolution de la turbidité (DO 600) des effluents de colonnes de sol de Clessé au cours du lessivage, après 2 ans d'incubation dans les sols NA (triangle) CC (rond) contaminés (vide) ou non (plein) au cuivre (b). Distribution de la taille des colloïdes lessivés mesurée par granulométrie laser (c).

Les mesures de densité optique (à 600 nm) (Figure V–6b) indique une augmentation de la turbidité des effluents jusqu'à un maximum puis une diminution jusqu'à un plateau. Ces résultats confirment cette tendance du lessivage de colloïdes qui reste valable quelque soit la condition de contamination ou d'amendement en matière organique du sol de Clessé. Dans les sols, les colloïdes sont déstabilisés au passage du flux d'eau entrant qui possède une force ionique très faible, ainsi que par la saturation hydrique croissante du milieu qui peut faire éclater certains flocs de colloïdes (Ryan & Elimelech 1996; Rousseau 2003).

La turbidité des effluents diminue dans le sol CC par rapport au sol NA quel que soit l'état de contamination du sol (Figure V–6a). L'amendement en matière organique diminue donc la mobilité des colloïdes et des particules du sol de Clessé. Ces résultats ont aussi été observés à chaque pas de temps d'incubation. En effet, la théorie DLVO (Derjaguin et Landau, Verwey et Overbeek) considère que la stabilité des colloïdes est principalement déterminée par la résultante de l'effet de l'action de deux forces principalement opposées, les forces attractives (forces de Van der Waals, et interactions hydrophobes) renforçant la stabilité des colloïdes, et les forces répulsives (forces électrostatiques de particules de charges égales) qui déstabilisent les colloïdes et permettent leurs mise en suspension. Il est sous-entendu dans cette description que les colloïdes ont tous la même charge de surface ce qui s'approche de la réalité puisque les deux pools de particules réactifs dominants des sols, que sont les argiles et la matière organique, sont tous les deux chargés négativement. La stabilité des particules du sol dépend donc des forces de liaison entre les particules et des facteurs contrôlant ces différentes forces. Ainsi, une augmentation de force ionique de la solution du sol diminue l'épaisseur de la double couche électrostatique, autour des particules et diminue donc la distance séparant deux particules, ce qui tend à les rapprocher, et par conséquent à favoriser leur agglomération.

La mobilité des particules du sol de Clessé dépend sensiblement de la force ionique de la solution du sol lié au taux de MO du sol, qui représente 1.5 % et 2.5 % en masse du sol respectivement pour les sols NA et CC. Ce résultat est en accord avec d'autres études pointant le même effet pour des taux de matière organique plus élevés (Ashworth & Alloway 2004; Zhao et al. 2007; Xue et al. 2009). En accord avec la théorie DLVO, la conductivité électrique et la force ionique des effluents sont plus élevées dans le sol CC que dans le sol NA. La diminution de la turbidité dans le sol est donc probablement liée à cet effet indirect de l'amendement organique sur la chimie de la solution du sol de Clessé.

Comme l'amendement organique, la contamination en cuivre du sol de Clessé affecte de manière importante la mobilité des colloïdes (turbidité). En effet, la turbidité des effluents de colonnes des sols contaminés est beaucoup plus faible que celle des sols non contaminés et en particulier dans le sol CC. En présence de cuivre, le pic de concentration en colloïdes se déplace de 1 V_p (sols non contaminés) vers 2 V_p (sols contaminés, Figure V–6). Il est bien connu que l'adsorption de cations métalliques peut neutraliser potentiellement la charge négative des colloïdes (diminuant ainsi les forces répulsives) et facilite donc leur agrégation et leur dépôt sur les phases stationnaires, c'est-à-dire leur immobilisation. Les résultats de mobilisation des particules dans le sol de Clessé peuvent s'expliquer par la théorie DLVO (sur le plan qualitatif), bien qu'on ne puisse exclure d'autres effets.

La distribution de taille des particules présentes dans les effluents de colonnes a été mesurée au granulomètre laser (Mastersizer 2000, Malvern Ltd) en regroupant tous les échantillons d'un même lessivage (Figure V–6c). La courbe de distribution de taille présente un pic de concentration dominant pour les particules de taille comprise entre 2 et 30 µm, qui sont donc les particules majoritairement mobilisées dans le sol de Clessé dans nos conditions expérimentales. Des contributions moins volumineuses de plus petites particules (0.2 et 2 µm de diamètre) et de plus grandes particules (50 µm) sont également enregistrées. Cette distribution volumique n'est pas représentative de la distribution de surface, qui peut

représenter la réactivité des colloïdes. La réactivité de la surface sera naturellement plus élevée pour la fraction fine (contenant par exemple les argiles). On rappelle que cette fraction peut être identifiée comme celle concentrant le plus le cuivre (cf. Chapitre IV). De la même façon, Bao et al. (2011) ont montré que la concentration de cuivre associée aux colloïdes lessivés est dépendante de leur taille, la fraction 20-200 nm étant la plus réactive au cuivre.

La mobilité des particules dans le sol est à la fois contrôlée par l'amendement en matière organique qui permet une stabilisation des colloïdes, mais aussi par la concentration en cuivre dans le sol qui induit un retard dans la mobilisation des colloïdes par leur agrégation.

V-3-5 Evolution temporelle de la mobilité du carbone organique total.

La Figure V–7 présente l'évolution temporelle (de 0 à 24 mois) des courbes de lessivage de Carbone Organique Total en phase aqueuse (COT_{aq}) qui représente ici les concentrations en carbone organique total lessivé, donc le carbone sous forme dissous et particulaire, en sortie de colonnes de sol de Clessé dans les différentes conditions étudiées (sol amendé en compost de conifère ou non, sol contaminé en cuivre ou non). Quelles que soient les conditions d'étude, à chaque pas de temps, la [COT_{aq}] diminue au cours du lessivage, avec un maximum en début de lessivage comme déjà observé pour la turbidité (lié à la présence de particules et de MOD).

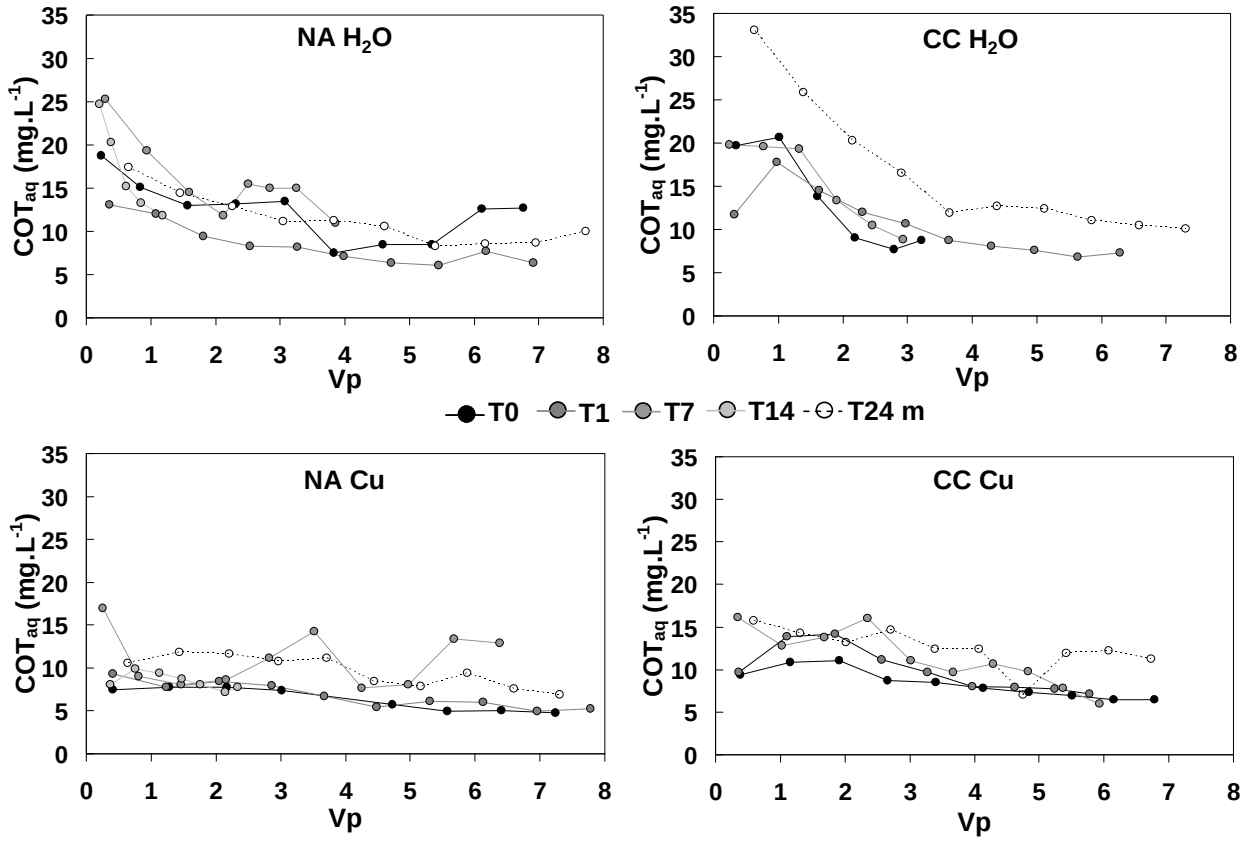


Figure V–7 Evolution temporelle des courbes de lessivage du carbone organique total mobile dans les effluents (COT_{aq}) dans les sols amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA) non contaminés (H_2O) et contaminés (Cu) au cuivre au cours des deux années d'incubation.

On remarque que la [COT_{aq}] est plus élevée dans le sol CC que celle dans le sol NA quelque soit la condition de contamination en cuivre et indépendamment du temps d'incubation. Sur ce point, l'effet de l'amendement organique du sol sur la [COT_{aq}] est donc

inverse de l'effet sur la turbidité, qui est plus élevée pour le sol NA. On rappelle que la turbidité mesurée (DO600) est due à la fois à la présence de particules et de matière organique dissoutes absorbant la lumière à 600 nm. Ces résultats indiquent donc que la turbidité des effluents de colonnes de sol NA est due majoritairement aux particules alors que pour le sol CC, la turbidité est essentiellement liée la MOD qui absorbe la lumière. Raisonnablement on peut supposer que le carbone organique mobile particulaire diminue quand la turbidité diminue. La seule explication à l'excès relatif du COT_{aq} dans le sol CC par rapport à NA, est de considérer que le carbone organique dissous est plus élevé pour le sol CC, ce qui a été confirmé par des analyses de COD mesurées sur des effluents centrifugés. Ce résultat est en accord avec diverses études (e.g. (Ashworth & Alloway 2004) qui ont montré que l'apport de matière organique à un sol induit une augmentation de la Matière Organique Dissoute (MOD) lessivable.

Après 24 mois d'incubation, on observe que la [COT_{aq}] augmente dans le sol CC. Nous avons également montré dans les chapitres précédents que la [COT] du sol CC diminue au cours de l'incubation du sol. Cette diminution se répercute au contraire sur la [COT_{aq}] qui augmente au cours du temps en relation avec la dégradation de la MO. En effet, cette concentration évolue significativement au cours du temps uniquement dans le sol CC, sans doute en relation avec la libération de composés organiques solubles au cours du temps en relation avec la dégradation du COT (Figure III–7, Figure IV–6). Ceci confirme que la MO du sol CC évolue, contrairement au sol NA, ce qui se traduit par une augmentation de la MOD au cours du temps.

Par ailleurs, nos résultats mettent en évidence un fort effet négatif de la contamination en cuivre sur la mobilité du carbone organique dissous du sol de Clessé. Dans les sols non contaminés (Figure V–7a et b), la concentration en COT_{aq} est plus importante, présentant des concentrations allant de 10 à 35 $mg.L^{-1}$ au cours du lessivage, à des concentrations allant de 8-16 $mg.L^{-1}$ dans les sols contaminés (Figure V–7c et d) qu'ils soient amendé en compost ou non. Ce résultat est concordant avec les mesures de turbidité. La contamination des sols au cuivre stabilise donc les particules du sol de Clessé et aussi le carbone organique dissous.

V-3-6 Evolution du lessivage des bactéries du sol de Clessé

V-3-6-1 Lessivage des bactéries du sol de Clessé

Les cellules bactériennes des sols étant des substrats très réactifs aux métaux (Ledin 2000; Guiné et al. 2006) au même titre que la matière organique, nous avons également suivi l'évolution temporelle du lessivage de bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}) et résistantes au cuivre (B^{Cu}) dans les deux sols contaminés ou non en cuivre.

La Figure V–8 présente les résultats de l'évolution de la concentration (nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) par mL) en bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}) et résistantes au cuivre (B^{Cu}) lessivées pour chaque échantillon collecté en sortie de colonne (regroupés par trois). Les concentrations en bactéries cultivables B^{Tot} et B^{Cu} sont présentées en échelle logarithmique et séparées graphiquement pour une meilleure lecture des résultats.

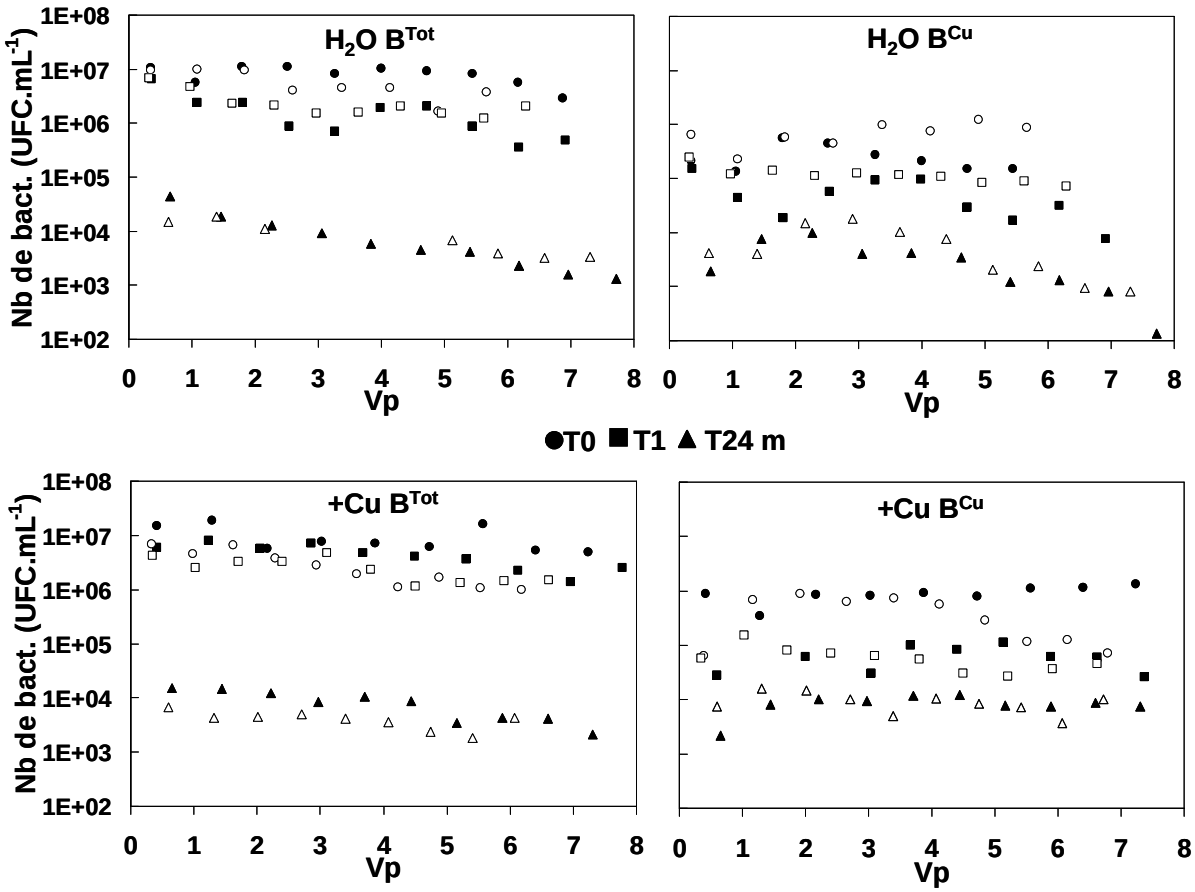


Figure V–8 Courbes de lessivage des bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}) et résistantes au cuivre (B^{Cu}) (UFC.mL^{-1}) dans le sol de Clessé amendé en compost de conifère CC (symboles vides) et ou non NA (symbole plein), contaminé (Cu) en cuivre ou non (H_2O) mesurées à T0 (●), T1 (■), et T24 mois (Δ).

Le sol de Clessé ayant en moyenne une concentration en bactéries cultivables d'environ 10^8 UFC.g$^{-1}_{ss}$ (NA et CC) (c.f. chapitre III), chaque colonne de sol contient donc environ 5.10^9 UFC (dans 50 g de sol). La quantité de bactéries lessivées ne représente donc qu'environ $1/1000^e$ et $1/10000^e$ des bactéries cultivables totales des 2 sols, ce qui montre que seule une faible proportion des bactéries cultivables est mobilisée dans les sols par la lame d'eau.

Dans les chapitres précédents nous avions montré que dans les deux sols, les bactéries résistantes au cuivre (B^{Cu}) ne représentent que 0.1 à 1 % des bactéries B^{Tot}. Les concentrations mesurées dans les effluents de colonnes lessivées sont du même ordre de grandeur d'environ 10^4 à 10^5 UFC.mL^{-1}. Ces résultats nous indiquent que la concentration en bactéries cultivables résistantes lessivées est proportionnelle à leur concentration initiale dans le sol.

D'une manière globale, on note que les concentrations en bactéries cultivables B^{Tot} et B^{Cu} évoluent peu au cours d'un même lessivage pour les deux sols (NA et CC) et les deux conditions de contamination (H_2O et Cu). Ceci indique que la quantité de bactéries lessivables à un temps t ne s'épuise pas pendant le passage de la lame d'eau et reste à un niveau important. Ces résultats indiquent que les bactéries sont des biocolloïdes mobiles susceptibles de contribuer au transport du cuivre, au même titre que le carbone organique dissous.

On note également que la quantité de bactéries lessivées diminue fortement au cours de l'incubation des deux sols, autant pour B^{Tot} que B^{Cu}, ce qui indique qu'au cours de l'incubation les bactéries se distribuent de moins en moins en position « externe des agrégats de sol », c'est-à-dire accessibles à l'eau en écoulement.

La Figure V–8 montre également que malgré la diminution du lessivage de bactéries au cours du temps, la proportion de bactéries résistantes au cuivre augmente. Ceci est en accord avec les résultats de l'impact du cuivre (Chap. IV) qui ont montré que la contamination au cuivre induit une augmentation de B^{Cu} sur le long terme. Il est donc logique d'observer le lessivage de plus en plus de bactéries résistantes au cuivre au cours de l'incubation.

V-3-6-2 Origine des bactéries lessivées, ou micro-biogéographie du sol de Clessé

Afin d'identifier l'origine des bactéries B^{Cu} lessivées, c'est à dire identifier quelles sont les fractions des sols qui libèrent le plus de bactéries vers la solution en mouvement, nous avons initié une étude de microbiogéographie du sol de Clessé en comparant les bactéries cultivables identifiées dans les effluents de colonnes (par séquençage de l'ADNr16S) avec celles identifiées dans chacune des fractions des deux sols (par séquençage haut débit). Faute de temps, nous n'avons malheureusement pas pu achever ces travaux sur le séquençage haut débit. Nous ne présenterons donc ici que les résultats d'identification des bactéries cultivables des effluents.

Nous avons identifié 116 (B^{Tot}) et 120 (B^{Cu}) souches bactériennes des effluents de colonnes lessivées à différents temps d'incubation, des sols NA et CC. Nous n'avons pas identifié toutes les bactéries isolées, mais seulement les bactéries dominantes qui se différentiaient morphologiquement. Après l'obtention des séquences d'ADN, nous avons pu identifier les bactéries par alignement des séquences avec l'aide du logiciel Clustal X, nous avons pu construire un arbre phylogénétique des bactéries lessivées (avec le logiciel Mega4). La représentation graphique des arbres phylogénétiques, réalisés avec le logiciel njplot, est présenté dans la Figure V–9 et la Figure V–10.

Les principales affiliations d'espèces bactériennes rencontrées dans les effluents de colonnes lessivées sont des *α-proteobacteria*, *β-proteobacteria*, *γ-proteobacteria*, *firmicutes*, et *actinobacteria*. L'ensemble des bactéries proteobacteria sont des bactéries à Gram négatif. En revanche les *firmicutes* et les *actinobacteria* sont des bactéries à Gram positif.

Pour les deux sols, les espèces bactériennes de l'affiliation des *α-proteobacteria* représentent environ 50 % du nombre total de souches identifiées (Tableau V-3). Elles sont majoritairement résistantes au cuivre, et isolées principalement à partir des sols contaminés au cuivre. En revanche, la majorité des *actinobacteria* ne sont pas résistantes au cuivre. Les *γ-proteobacteria*, et *firmicutes* représentent chacune environ 20 % des bactéries identifiées, en accord avec Ellis et al. (2003) qui ont également montré que les *firmicutes* sont très abondantes dans les sols contaminés en multi-éléments. La proportion de β-, *γ-proteobacteria*, et *fimicutes*, est équilibrée au sein de nos bactéries B^{Tot} et B^{Cu}.

Tableau V-3 Nombre d'espèces bactériennes identifiées dans les solutions de lessivages pour chaque condition de contamination.

	Sol NA				Sol CC				
	B^{Tot}		B^{Cu}		B^{Tot}		B^{Cu}		Total (NA/CC)
Affiliation	**H_2O**	**Cu**	**H_2O**	**Cu**	**H_2O**	**Cu**	**H_2O**	**Cu**	
Firmicutes	1	2	3	7	6	8	2	8	13/24
Actinobacteria	1	7	1	0	2	11	0	1	9/14
α-proteobacteria	1	2	18	45	0	3	16	31	66/50
β-proteobacteria	0	1	2	1	1	0	3	4	4/8
γ-proteobacteria	13	9	2	0	5	9	3	6	24/23
Total	16	21	26	53	14	32	24	50	116/120

Notre perspective à court terme est donc d'essayer de localiser au sein des différentes fractions des sols, les bactéries isolées dans les effluents de colonnes de sols, pour mieux comprendre quelles sont les espèces les plus facilement mobilisables dans les sols naturels en fonction de leur localisation à micro-échelle et comment les apports de matière organique ou de cuivre peuvent les affecter. Ce facteur est particulièrement intéressant dans un contexte de mobilisation facilitée des polluants par les biocolloïdes dans un contexte d'apport de MO exogène et de cuivre simultané.

Nous avons déjà montré auparavant qu'après la contamination au cuivre du sol de Clessé, les bactéries résistantes au cuivre étaient concentrées principalement dans les fractions grossière (>250 µm) et fines (20-2 et <2 µm), qui sont aussi celles qui accumulent préférentiellement le cuivre. Ces résultats sont cohérents avec le fait que les bactéries résistantes au cuivre peuvent contribuer à sa mobilisation. Une caractérisation plus poussée de la réactivité au cuivre des bactéries isolées dans les effluents de colonnes, pourrait nous aider à identifier les mécanismes de transfert du cuivre dans le sol de Clessé.

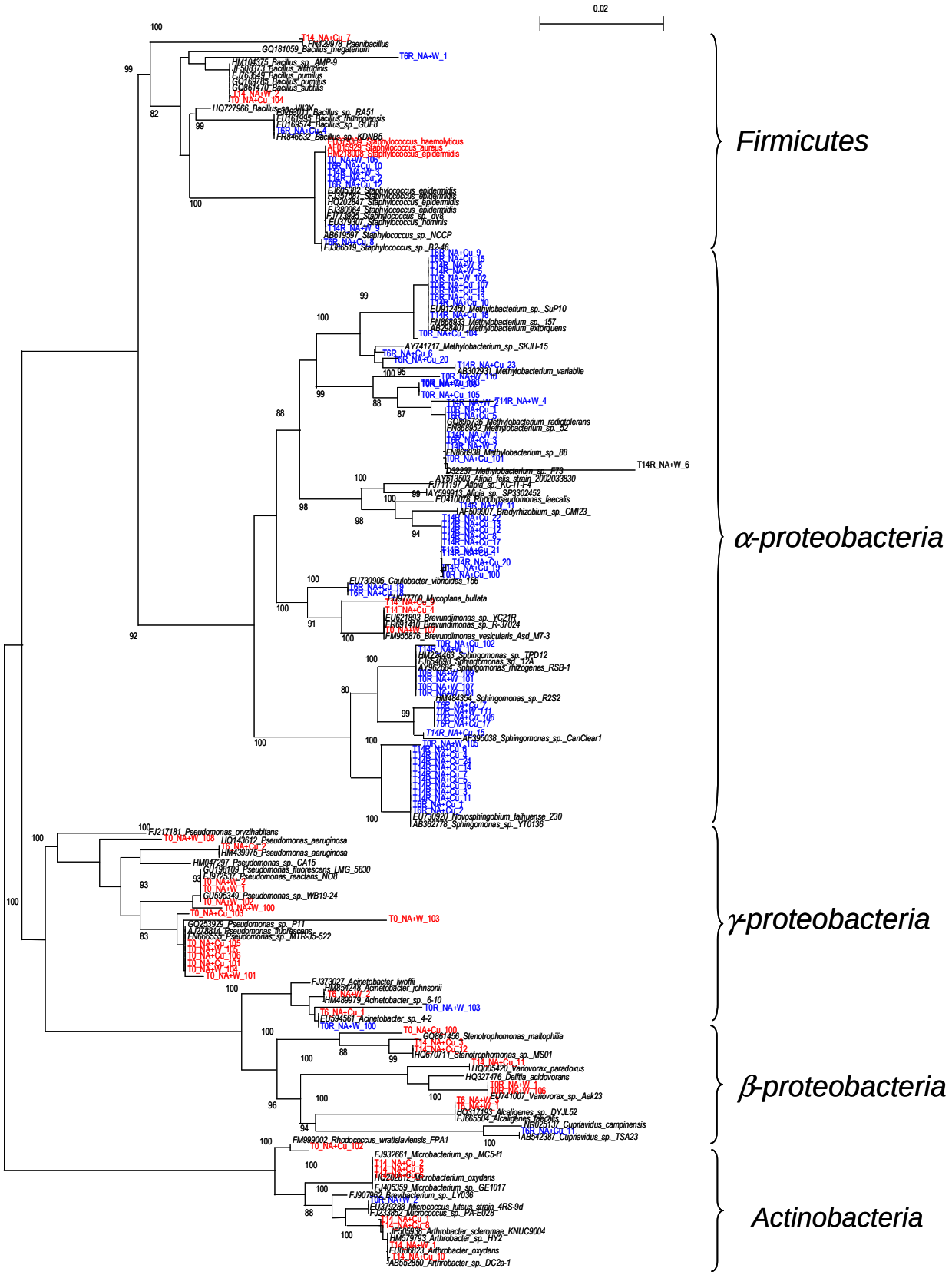


Figure V–9 Arbres phylogénétiques des bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}, rouge) et résistantes au cuivre (B^{Cu}, bleu) isolées des effluents de colonnes de sol de Clessé non amendé (NA).

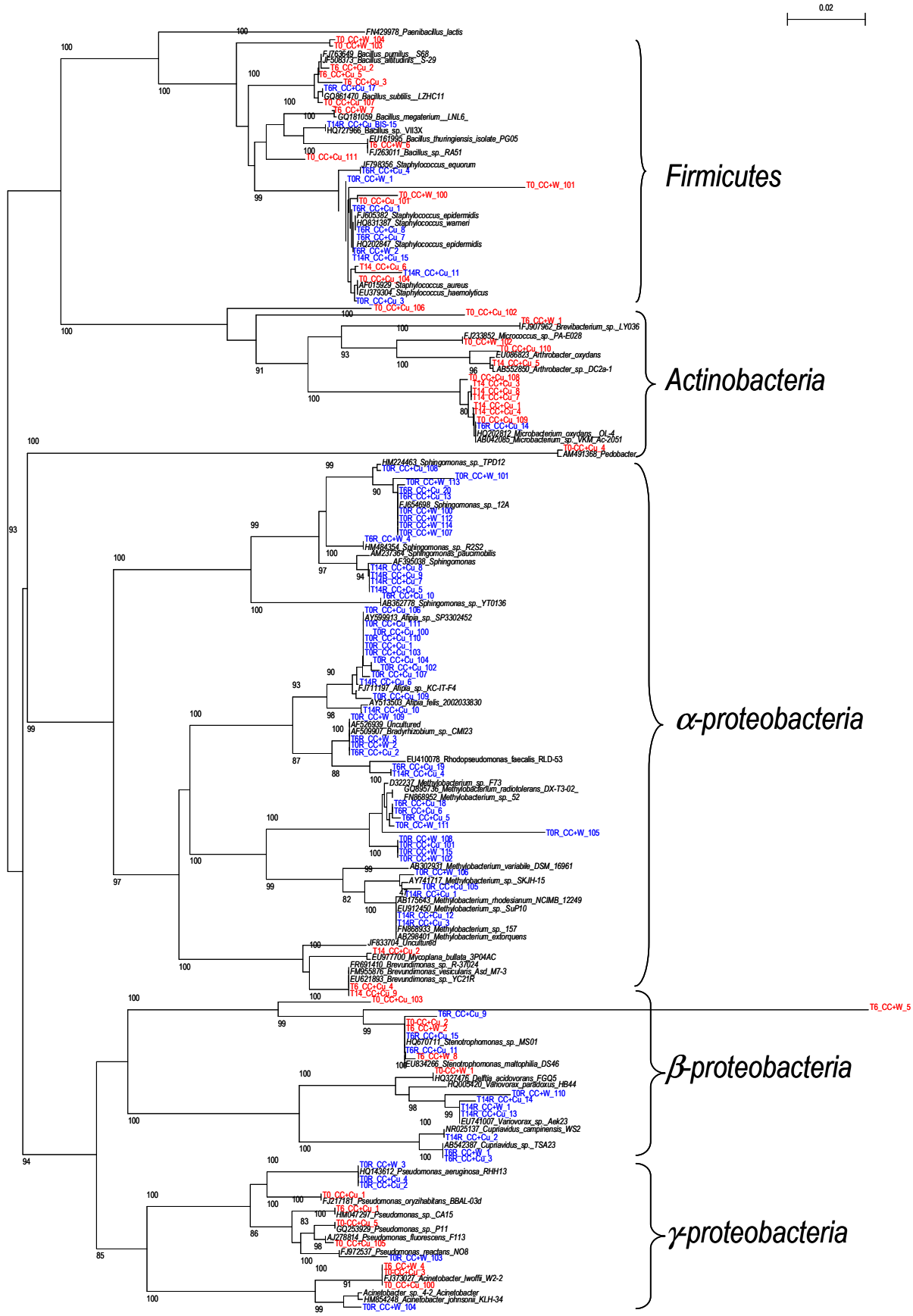


Figure V–10 Arbres phylogénétiques des bactéries hétérotrophes cultivables totales (B^{Tot}, rouge) et résistantes au cuivre (B^{Cu}, bleu) isolées des effluents de colonnes de sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC).

V-3-7 Effet de l'amendement en Matière Organique sur la mobilité du cuivre.

La Figure V–11 permet d'illustrer les observations faites sur l'évolution du lessivage des particules et de vérifier les hypothèses associées aux mécanismes de transfert du cuivre.

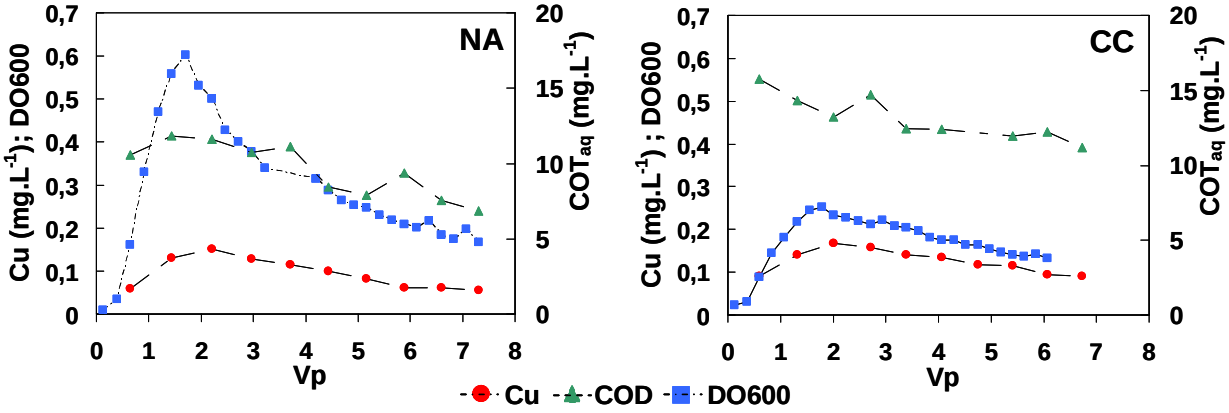


Figure V–11 Comparaison de la turbidité des solutions lessivées, de la concentration en carbone organique [COT_{aq}], et de la concentration en cuivre mobile [Cu_{aq}] des effluents du sol de Clessé non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC) après deux ans d'incubation en mésocosmes contaminés au cuivre à 240 ppm.

Dans la Figure V–11 sont présentées les mesures de turbidité, de concentration en COT_{aq} (carbone particulaire et dissous) et de [Cu_{aq}] dans les effluents des sols NA et CC après deux ans d'incubation. Les concentrations totales en cuivre lessivé des deux sols (Figure V–11) sont très similaires. Cette situation permet une comparaison facile du comportement du cuivre dans les deux sols amendés différemment. On observe que contrairement au cuivre lessivé, les valeurs de COT_{aq} et de la turbidité des effluents des deux sols sont très différentes. Dans le sol NA, la turbidité est très élevée et la concentration en COT_{aq} plutôt faible, alors que c'est l'inverse dans le sol CC. Ces observations ainsi que les résultats présentés précédemment permettent de proposer l'hypothèse suivante : l'amendement en compost de conifère favorise la mise en solution de carbone organique par rapport au sol NA, expliquant que [COT_{aq}] est élevée pour une turbidité relativement faible (pour le sol CC). Ceci indique que dans le sol CC une part importante du cuivre doit être associée à la MOD. La situation est inversée pour le sol NA, pour lequel la [COT_{aq}] est plutôt faible par rapport à la turbidité élevée, indiquant une forte contribution des particules du sol à la mobilisation du cuivre. Nos résultats indiquent que selon le sol (NA ou CC), le cuivre est mobilisé selon 3 mécanismes : d'abord le cuivre est sous forme libre (majoritairement pour le sol NA à T0) qui devient insignifiant au cours de l'incubation ; sous forme particulaire (pour les deux sols) ; et sous forme complexée à la MO (très faible pour NA).

Ces résultats constituent la base de notre modélisation de la mobilité du cuivre avec le logiciel PhreeqC. Dans ce contexte la COD mesurée représente autant la part dissoute que particulaire du carbone, et donc autant les bactéries que la matière organique dissoute. Les résultats montrent très clairement que l'amendement organique augmente le lessivage du cuivre. De ce fait on peut considérer que cette matière organique est le vecteur principal de mobilité du cuivre. Alors, les particules non organiques ne sont pas considérées dans le modèle.

V-3-8 Modélisation de la lixiviation du cuivre dans le sol de Clessé

V-3-8-1 Processus pris en compte dans la modélisation du transfert du cuivre.

Pour modéliser la mobilisation du cuivre dans le sol de Clessé, nous avons dû simplifier le système étudié en ne considérant pas les 3 mécanismes identifiés précédemment mais plutôt un seul processus moyen global.

La première simplification a consisté à considérer qu'il y a une seule phase réactive immobile et une seule phase réactive mobile. Nous commençons par la mise en forme de ces deux phases pour la modélisation.

Les phases mobiles et immobiles sont bien sûr très diversifiées en termes de composition. Toutefois, l'analyse de nos résultats démontre l'implication prépondérante de la matière organique dans la rétention du cuivre réactif. Il apparaît alors raisonnable d'estimer les concentrations totales des sites immobiles sur la base des concentrations totales de matière organique du sol (le COT du sol en colonne, noté COT_{sol}) et la concentration en sites mobiles sur la base de [COT_{aq}] mesurée en sortie de colonne. Nous faisons ici l'hypothèse que ces deux phases peuvent être représentées par une MO possédant une réactivité moyenne homogène face au cuivre et aux protons.

La prochaine étape a consisté à définir le lien entre les concentrations massiques mesurées en matière organiques (concentrations COT_{sol} et COT_{aq} en $g.g^{-1}$ ou $g.L^{-1}$) et leur réactivité. La réactivité des acides humiques varie dans la littérature entre 2 et 10 $mmol.g^{-1}$ d'acides humiques (Matynia et al. 2010), tandis que les substrats bactériens ont typiquement des réactivités aux protons et métaux de 0.5 à 2 $mmol.g^{-1}$ de matière sèche (Borrok et al. 2005; Guiné et al. 2006). Nous basons notre estimation sur les réactivités déterminées pour ces deux substrats. Ce faisant, on prend en compte la limite basse de la réactivité des acides humiques dans la mesure où les sites de la matière organique du sol sont potentiellement moins accessibles que ceux d'une suspension d'acides humiques. Par ailleurs, la densité de sites de la matière organique non ou peu dégradée de ce sol est plus faible que la MO dégradée. Par exemple, la lignine et les cires végétales ont très peu de groupes fonctionnels acide base réactifs.

En considérant, des blocs moléculaires $C_{15}H_{30}O_{15}$ (exemple de la stoechiométrie du Glucose) de 450 masses élémentaires portant un unique site réactif par unité, on obtient une réactivité de 5.6 mmol de sites par g de Carbone (soit 450/(15x12)), ou de 2.2 mmol de sites par g de MO (450/(15x12+30x1+15x16)). Ces valeurs ont été utilisées pour la modélisation de la spéciation du cuivre dans ce travail. On calcule donc la réactivité de nos sols sur la base de sa teneur en MO. On considère pour la MO de ces sols, l'existence d'une réactivité universelle identique pour les acides humiques et les substrats bactériens. Cette réactivité s'applique de la même façon à la matière organique mobile et immobile. Ceci signifie que le nombre de sites réactifs par carbone structural est de 1 pour 15, ce qui se rapproche des rapports présentés dans les différents modèles structuraux des acides humiques (Stevenson 1994). Les sols NA et CC contiennent respectivement 1.5 % et 2.5 % de MO, ce qui correspond à 0.045 et 0.075 $mmol_C.g^{-1}_{ss}$ respectivement, en prenant comme référence pour la MO une concentration moyenne de sites réactifs de 3 $mmol_{site}.g^{-1}_{ss}$. Nos colonnes sont divisées en couches verticales de 5.6g de sol contenant environ 2.6 mL d'eau porale. On obtient donc finalement une réactivité de la MO de 97 et 160 $mmol.L^{-1}$ d'eau porale pour les sols NA et CC, respectivement. Les valeurs ainsi obtenues sont sans doute approximatives,

mais présentent tout de même un sens physique, même si certaines phases réactives ne sont pas considérées, comme les argiles ce qui pourrait modifier la réactivité globale au cuivre ainsi estimée. Cette hypothèse nous semble toutefois acceptable, au moins d'un point de vue relatif, puisque les deux sols ont le même taux d'argiles.

V-3-8-2 Modélisation de la mobilité du carbone organique total

Comme démontré par les essais de lessivage, les concentrations en carbone organique dissout ([COT_{aq}]) dans les effluents sont relativement stables au cours de l'incubation et en particulier dans les sols contaminés au cuivre (qui a donc un effet stabilisateur sur la MO mobilisable). Ceci nous permet de considérer une courbe de lessivage modèle unique du COT_{aq} pour les deux sols étudiés et pour chaque temps considéré. Comme nous l'avons vu dans le Chap. III, la concentration totale en carbone organique (COT_{sol}) évolue au cours de l'incubation dans le sol CC contrairement à la concentration en COT_{aq}. Cette différence de comportement est liée à la dynamique de dégradation du carbone (Figure III–7), qui est variable au sein des fractions granulométriques du sol. Il a été démontré que les fractions grossières contribuent principalement à la perte du carbone organique, tandis que les fractions fines évoluent peu durant l'incubation. Le sol étant un milieu filtrant, la lixiviation des particules fines est facilitée par rapport aux particules grossières, ce qui contribue à expliquer la constance du COT_{aq} au cours de l'incubation.

Avec cette approche simplifiée, nous avons pu modéliser le lessivage du COT_{aq} (Figure V–12). Les courbes calculées représentent assez bien l'évolution globale de [COT_{aq}] observée pour les sols NA et CC à T0 et T24 mois. Ces résultats confirment que la prise en compte d'une réactivité globale constante et proportionnelle à [COT_{sol}] sur toute la durée de l'incubation est suffisante pour reproduire correctement nos observations.

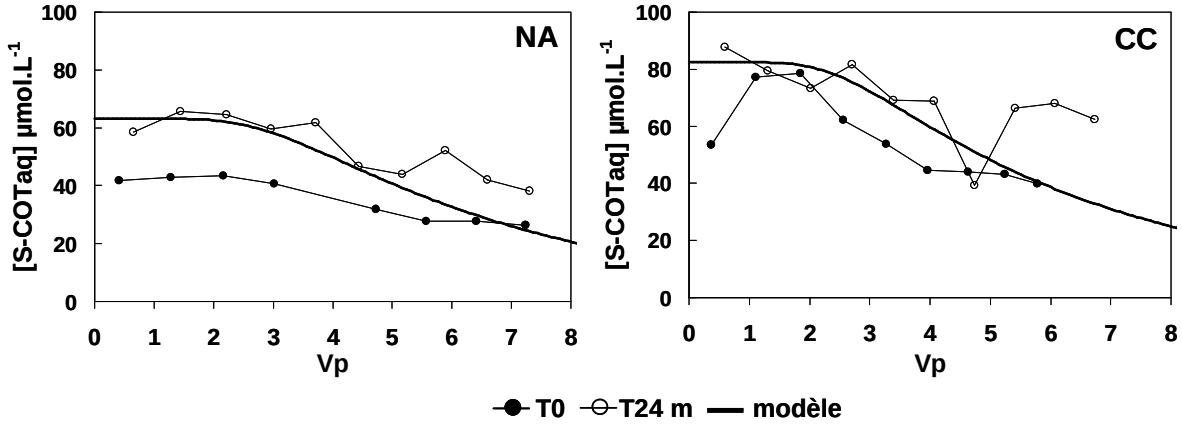


Figure V–12 Modélisation du lessivage de sites réactifs au cuivre associés à la MO dissoute dans le sol de Clessé non amendé (NA) et amendé (CC) en compost de conifère à T0 et T24 mois. La courbe sans symbole représente la courbe de modélisation du COT_{aq} lessivé, pour les deux temps d'incubation.

Le but de cette modélisation est de reproduire au mieux et de manière la plus simple possible les données expérimentales de lessivage du COT_{aq}. L'ensemble des paramètres du modèle est présenté en Annexe J. Avec cette approche, les courbes calculées pour NA et CC représentent une courbe moyenne de lessivage des sites mobiles réactifs. Ce modèle a été établi sur la base d'une équation de Langmuir (Sigg et al. 2001), avec Ms le groupe fonctionnel réactif au cuivre (ou au proton) d'une particule ou molécule potentiellement mobile. Ms_Tot est égal à 0.6 mM et 0.8 mM pour les sols NA et CC, respectivement. Les sites réactifs Ss-m de la phase stationnaire pouvant fixer Ms ont une concentration totale Ss-

mTot de 1.3 µM pour NA et 1.5 µM pour CC. La constante K_{Ss_Ms} est de 4.05 pour les deux sols laquelle définit l'affinité du groupe fonctionnel Ms pour son site d'attachement sur la phase stationnaire. La courbe expérimentale de la concentration en COT_{aq} est ainsi ajustée en faisant varier ces cinq paramètres. Cette approximation nous semble suffisante car, dans cette étude, les analyses réalisées sont insuffisantes (en quantité et en répétitions) pour remonter de manière certaines aux processus physiques contrôlant le transfert du cuivre dans ce sol. Nous sommes conscients par exemple que le transfert réactif des particules du sol (système complexe) n'est certainement pas exclusivement associable à un formalisme de type Langmuir.

Le logiciel PhreeqC ne permet pas de définir des particules mobiles. Pour contourner ce problème, nous avons dissocié conceptuellement nos particules en définissant une quantité de ligands mobiles équivalents, pouvant interagir chacun avec un ion cuprique ou un proton. Sur le plan conceptuel ceci revient à considérer le transfert particulaire comme un transfert d'ions dissous, c'est-à-dire à négliger la masse de la particule. Les concentrations en COT_{aq} observées et calculées sont constantes tout au long de l'incubation des sols. La diminution de COT du sol CC n'est donc pas prise en compte dans la modélisation par soucis de simplification et parce que l'effet sur la courbe calculé reste le même.

Néanmoins, ce paramètre est susceptible d'impacter la concentration en cuivre libre, lequel est en effet contrôlé par cette composante (la MO) qui joue un rôle tampon majeur pour cette espèce de cuivre. Nos mesures de cuivre libre s'étant avérées insuffisamment résolutives pour mettre en évidence le vieillissement du COT, nous n'avons pas modélisé son évolution qui est donc associée à celle du cuivre complexé.

V-3-8-3 Modélisation de la lixiviation du cuivre dans le sol de Clessé

La modélisation de la concentration totale en cuivre lessivée a été effectuée uniquement sur les deux sols de Clessé (NA et CC) contaminés au cuivre à 240 ppm. Dans ces sols, la concentration finale totale en cuivre est d'environ 325 ppm (cf. chapitre III). Ceci correspond à une concentration, $[Cu_{Tot}]$, de 11 $mmol.L^{-1}$ d'eau porale. Le rapport molaire cuivre/COT solide est ainsi d'environ 1/10 (en considérant les concentrations de 0.045 et de 0.075 mmol/g de sites de COT calculés pour les sols NA et CC, respectivement, cf. V-3-7-1). La concentration molaire en cuivre dans les sols contaminés est donc, certes, plus faible que la concentration calculée totale de sites disponibles sur la matière organique, mais n'est toutefois pas négligeable par rapport à sa capacité totale de sorption. Dans le cadre d'une modélisation de type Langmuir nous approchons donc la partie non linéaire de la courbe log Cu_{ads} versus log Cu_{aq}.

La modélisation de la lixiviation du cuivre a été réalisée à différents temps d'incubation (0, 1, 7, et 24 mois). Les courbes expérimentales associées présentent deux phases distinctes : une partie où la concentration en cuivre augmente correspondant à la phase transitoire de saturation du sol, suivie d'une deuxième partie où la concentration diminue (Figure V–13) et correspondant à l'épuisement du cuivre mobilisable faiblement reçu sur les sites de rétention. Du fait que la partie montante de la courbe ne correspond pas à un régime permanent, cette partie est difficilement reproductible avec notre modèle qui ne résout pas l'équation de Richards en non saturé. De ce fait, nous avons choisi de limiter la modélisation à la partie descendante de la courbe de concentration en cuivre.

Globalement, les courbes expérimentales de lixiviation du cuivre des sols contaminés diminuent en concentration au cours de l'incubation (Figure V–13). Cette diminution n'est pas liée aux concentrations des phases réactives mobiles, puisque le COT_{aq} ne varie pas

significativement au cours de l'incubation des sols malgré la diminution de COT dans le sol CC. Le vieillissement du cuivre est donc lié à un processus indépendant de la phase mobile. Les processus pouvant être raisonnablement proposés pour expliquer cette diminution peuvent être intégrés de deux façons différentes dans le modèle :

- Soit l'accessibilité du cuivre à la phase liquide diminue progressivement dans les sols entraînant une diminution de la mise en solution du cuivre. Cette diminution de l'accessibilité du cuivre peut s'expliquer par une diffusion du cuivre à l'intérieur des agrégats des sols (porosité texturale) et en particulier au sein des complexes argilo-humiques.
- Soit le cuivre migre vers des sites d'affinité croissante au cours de l'incubation entraînant une plus faible remise en solution vers la phase mobile. Ainsi, le cuivre pourrait migrer depuis des sites d'affinité relativement faible (i.e. sites carboxyles) vers des sites de forte affinité (i.e. sites sulfhydriques, oxydes de Fe). Cet effet peut être conceptualisé par l'augmentation de la constante apparente de complexation du cuivre sur les phases immobiles. Pour satisfaire le modèle, nous avons fait évoluer différemment la force de liaison du cuivre avec les sites mobiles et avec les sites immobiles, car la répartition solide/solution du cuivre ne change pas si les constantes de réactivité évoluent de la même façon dans ces deux compartiments réactifs des sols.

Il semble raisonnable de considérer que les constantes (ou la concentration totale) de la phase mobile n'évoluent pas ou peu (résultats de l'évolution de la turbidité (Figure V–6b) et du COT des effluents (Figure V–7)). Dans la solution des sols, le cuivre est sans doute plus associé à du carbone organique mobile, dont la réactivité au cuivre ne doit logiquement pas varier car correspondant à des composés organiques produits continuellement au cours de l'incubation (il n'y a pas de raisons de supposer que les ligands organiques deviennent de plus en plus chélatants au cours du vieillissement, par exemple). Par ailleurs, les particules mobiles sont potentiellement plus accessibles au cuivre et à l'eau que l'intérieur des agrégats représentant la phase immobile des sols.

Conceptuellement, il est donc raisonnable de considérer que le cuivre présent sur la phase immobile du milieu poreux devient de moins en moins accessible soit par migration vers des sites réactifs forts (ex : site sulfuré difficile d'accès), soit par diffusion vers des zones ou site moins accessible à l'eau mobile (argiles, agrégats, MO, etc…).

Les deux processus (diminution de la concentration totale du cuivre *versus* renforcement de la constante de réactivité) peuvent chacun expliquer nos résultats (diminution de la mobilité du cuivre) et donc satisfaire la modélisation. L'identification de ce processus dominant peut donc être considéré comme une perspective importante à ce travail de modélisation.

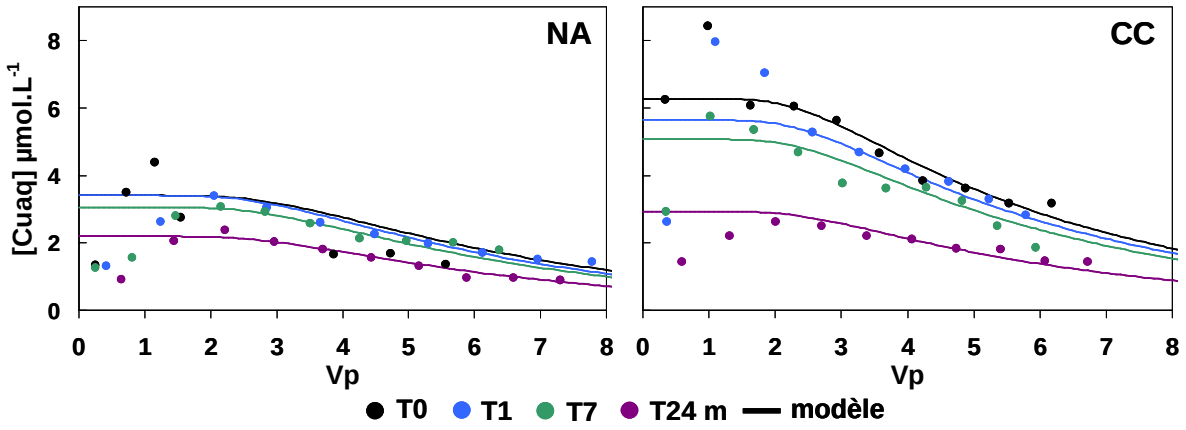


Figure V–13 Modélisation du lessivage du cuivre dans le sol de Clessé non amendé (NA) et amendé (CC) en compost de conifère de T0 à T24 mois. Les courbes sans symbole représentent les courbes de modélisation du Cu lessivé, et les points correspondent aux concentrations en cuivre expérimentales.

Pour modéliser l'évolution de la concentration en cuivre lessivé au cours de l'incubation, nous avons choisi la solution consistant à faire évoluer temporellement la constante de réaction du cuivre avec la MO (constante K_{Ss_hCu+2}, Annexe J). Les courbes modèles résultantes sont données dans la Figure V–13, où l'on voit que les observations sont correctement ajustées par les courbes calculées. Les constantes K_Ss_hCu+2 ajustées, données dans la Tableau V-4, ont été calculées avec l'équation :

$$Ss_h + Cu^{+2} \Leftrightarrow Ss_hCu^{+2}, \log K_{Ss_hCu^{+2}} \qquad \textbf{[V-6]}$$

Tableau V-4 Valeurs de la constante de réaction du cuivre avec les sites réactifs immobiles ($log_K_{Ss_hCu}^{+2}$) du milieu poreux pour les sols non amendé (NA) et amendé en compost de conifère (CC).

Sol	Temps d'incubation (mois)			
	0	**1**	**6**	**24**
Non amendé (NA)	7.35	7.35	7.40	7.55
Amendé en compost de conifère (CC)	6.95	7.00	7.05	7.35

On observe une augmentation de la constante avec le temps d'incubation pour les deux sols. L'évolution de cette constante exprime le vieillissement du cuivre par une augmentation de la force de liaison entre le cuivre en solution et les sites réactifs immobiles. Cette constante augmente deux fois plus rapidement dans le sol CC que dans le sol NA.

On observe également que les constantes d'interaction du cuivre avec la MO modèle sont plus faibles dans le sol CC que le sol NA (Tableau V-3). Il est à noter que ces constantes sont fortement corrélées aux concentrations totales de sites réactifs calculées. Cette différence exprime que la réactivité des matières organiques entre les sols CC et NA ne est pas la même au moment de la contamination à cause de l'amendement organique. Il est aussi à noter que la constante de réaction du sol CC se rapproche de celle du sol NA au bout des deux ans d'incubation en accord avec l'évolution d'autres paramètres tels que la $[COT_{aq}]$, ou Cu_{extot}.

On constate le même effet pour l'évolution de la concentration en cuivre lessivé. Il y a donc plusieurs faits concordants démontrant qu'en termes de réactivité, le sol CC se rapproche du sol NA au cours de l'incubation.

La Figure V–14 présente les courbes de lessivage du cuivre calculées aux différents temps d'incubation des sols NA et CC. A chaque temps d'incubation, la concentration en cuivre mobilisé dans le sol CC est supérieure à celle du sol NA. Cependant après deux ans d'incubation, la constante de réaction au cuivre du sol CC est devenue très proche de celle du sol NA. Bien que les constantes de réactivité soient très proches (valeurs finales), les teneurs en cuivre mobile sont différentes. Ceci vient du fait que le nombre de sites de fixation du cuivre (COT solide) dans le sol NA est inférieur à celui du sol CC. A réactivité égale, le modèle prévoit logiquement que le cuivre est 'moins lié' dans le sol NA. Globalement les courbes calculées sont en accord avec les observations expérimentales et valident donc les hypothèses émises pour expliquer la fixation du cuivre dans les deux sols variablement amendés en MO. La plus forte concentration en COT_{aq} du sol CC favorise la mobilité du cuivre à travers ce sol. Le cuivre est donc principalement lessivé sous forme liée, i.e complexée à la phase organique mobile (COT_{aq}). L'amendement organique favorise la mise en solution de MOD capable de complexer puis lixivier le cuivre. Les résultats de modélisation sont compatibles avec l'hypothèse considérant que le vieillissement du cuivre observé au cours de l'incubation est lié à une diminution de l'accessibilité de l'eau mobile au cuivre retenu sur des sites réactifs de la phase immobile, et que ce vieillissement est plus rapide pour le sol CC que pour le sol NA, indiquant ainsi un lien avec l'évolution de la matière organique du sol.

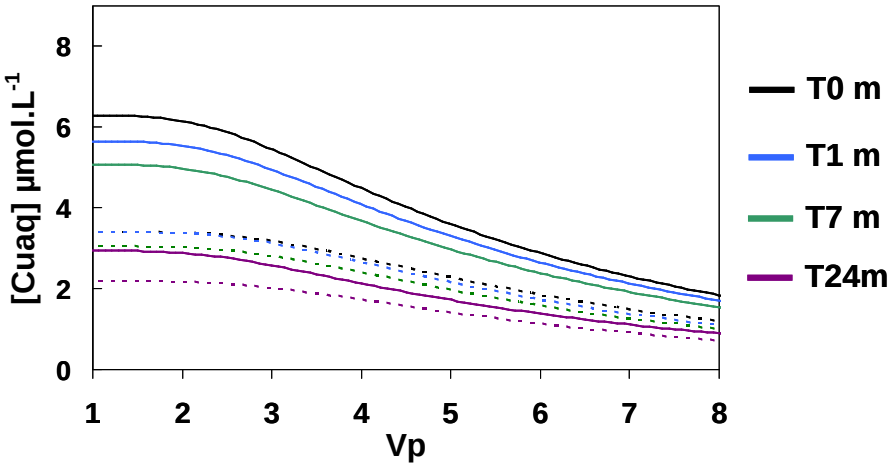


Figure V–14 Comparaison des courbes modèles de la lixiviation du cuivre entre le sol contrôle NA (pointillé) et le sol amendé CC (plein), pour chaque temps d'incubation.

V-4 Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de mieux comprendre l'effet du mode de gestion des intrants organiques des sols sur la mobilité du cuivre dans le sol de Clessé afin d'évaluer le risque de contamination des ressources en eau dû aux fortes accumulations de cuivre à la surface des sols viticoles. Par des expériences de lessivage en colonnes des deux sols étudiés (amendé et non amendé en compost de conifère), nous avons montré que l'amendement du sol en matière organique modifie la composition et la géochimie (force ionique, COT, …) des lixiviats des sols. Nous avons montré dans ce chapitre que l'amendement organique du sol de Clessé augmente fortement la mobilité du cuivre, même si cette dernière reste relativement faible car ne représentant pas plus de 1 % du cuivre total présent dans le sol. Dans le sol contrôle (NA), le cuivre est principalement mobilisé sous forme libre ou associé à des colloïdes alors que dans le sol amendé (CC), le cuivre se retrouve en solution principalement sous forme chélatée à la matière organique dissoute.En effet, nous avons montré que la turbidité (DO_{600}) des effluents de colonnes est plus faible dans le sol amendé en compost de conifère que dans le sol contrôle, indiquant une stabilisation des particules mobilisables par la MO ajoutée. De plus, dans les deux sols, la concentration en matière organique en solution (COT_{aq}) est stable tout du long de l'incubation, malgré la diminution de la teneur totale en carbone organique du sol CC.

Pour les deux sols (amendé et non amendé), la concentration en cuivre diminue au cours des phases de lixiviation des sols par l'eau, indiquant un épuisement progressif du cuivre mobile retenu sur les surfaces solides des deux sols.

Ainsi, après avoir montré que l'amendement organique des sols présente un effet protecteur pour les sols en termes de toxicité vis-à-vis des communauté bactériennes des sols, nous avons montré dans ce chapitre au contraire un effet néfaste de l'amendement du sol, puisque celui-ci favorise la remise en solution du cuivre sous forme complexée avec la MO dissoute et donc la mobilité du cuivre en profondeur ou à la surface des sols sous vigne. L'importance relative de chacun de ces mécanismes de transfert du cuivre évolue toutefois avec le temps en relation avec le vieillissement de la contamination. Ainsi, les quantités de cuivre libre deviennent très vite négligeables face aux quantités de cuivre complexé ou sorbé sur les (bio)colloïdes des deux sols, indiquant une rétention de plus en plus forte du cuivre sur les surfaces solides au cours du temps.

L'évolution de la mobilité du cuivre dans les deux sols a pu être correctement modélisée avec PhreeqC en ne considérant, pour simplifier, qu'une seule phase réactive au cuivre mobile, avec des constantes de réactivité moyennes, représentatives des principales phases porteuses mobilisables des sols (MO, argiles, oxydes, cellules…). La diminution temporelle de concentration en cuivre lessivé a été correctement représentée par une augmentation des constantes d'interaction du cuivre avec les sites réactifs immobiles, pour les deux sols. Ces résultats s'accordent avec l'évolution de la concentration en cuivre échangeable au Ca. Pour le sol CC, la constante a évolué deux fois plus vite, ce qui est bien corrélé à la fois à l'interaction du cuivre avec les phases fixes, mais aussi à la dégradation de la MO observée dans ce sol. On observe donc un 'vieillissement' de la contamination au cuivre, qui n'est pas le même lorsque le sol de Clessé est amendé ou non en compost de conifère.

Nous avons aussi montré que des concentrations importantes de bactéries sont lessivées dans les deux sols au cours du temps, lesquelles contribuent sans doute dans les deux sols au transfert du cuivre. Les concentrations de bactéries lessivées diminuent fortement au cours de l'incubation, tout comme cela a été observé pour le cuivre, en particulier la première année. Par contre, on a observé une augmentation du lessivage de bactéries résistantes au cuivre au

cours de l'incubation des sols contaminés, en accord avec les impacts court et long terme du métal mis en évidence dans les Chap. III et IV.

La contamination au cuivre du sol de Clessé ne modifie pas significativement la mobilité des bactéries cultivables totales ou résistantes des deux sols. Un grand nombre de bactéries cultivables isolées dans les effluents de colonnes ont été identifiées, dans le but de remonter à la micro-localisation initiale dans les fractions des sols des bactéries mobilisées par l'eau. Nos résultats ont montré que la contamination a induit un enrichissement des effluents principalement en *Actinobacteria*. Ce travail de micro-biogéographie est un travail préliminaire original qui n'a pu être mené à bout dans le delai de cette thèse, mais qui se poursuit acutellement et semble très prometteur grâce notamment aux progrès des systèmes de séquençage haut débit.

En termes de perspectives à court terme, en plus de l'analyse de micro-biogéographie des deux sols, l'analyse précise des colloïdes biotiques et abiotiques co-élués avec le cuivre permettra de mieux comprendre leur implication dans sa mobilisation (travaux en cours). Ces travaux vont permettre ainsi d'augmenter nos connaissances sur les mécanismes de transfert de cuivre, et notamment sur son transfert colloïdal ou associé à la MO dissoute qui semblent dominants dans le cas des sols riche en matière organique.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion

Ce travail pluridisciplinaire à l'interface entre la géochimie environnementale, la physique des sols et la microbiologie visait à contribuer à l'établissement des relations biogéochimiques qualitatives et quantitatives contrôlant la rétention, l'impact et la mobilité du cuivre dans un sol sous vigne (sol de Clessé, Bourgogne) soumis à différents modes de gestion d'intrants organiques. L'effet de l'évolution temporelle de ces relations sur l'impact du cuivre et son potentiel de mobilité ont également été évalués au cours de l'incubation, en mésocosmes, du sol variablement amendé en MO. Nous souhaitions ainsi mieux comprendre le rôle de la structuration des sols dans l'impact du cuivre sur les microorganismes, en relation notamment avec leur micro-localisation spatiale dans les différents micro-habitats de ce sol. L'effet du mode de gestion des intrants organiques du sol de Clessé sur le devenir et l'impact du cuivre ont été étudiés d'abord à l'échelle du sol non fractionné puis à celle des sous fractions granulométriques du sol obtenues par une méthode de fractionnement granulométrique peu déstructurante.

Effet du mode de gestion des intrants organiques sur les propriétés du sol de Clessé

Nous avons tout d'abord évalué l'effet long terme (> 20 ans) des différents intrants organiques sur les propriétés bio-physico-chimiques du sol de Clessé à l'échelle de la parcelle. Dans tous les cas, nous avons observé une augmentation des teneurs en carbone organique total (COT) du sol, carbone qui se distribue très différemment dans les sous fractions granulométriques pour les cinq situations (contrôle, paille, compost de conifère, fétuque et trèfle) étudiées. Nous avons ainsi montré que le sol amendé en compost (CC) ou son enherbement en trèfle (Ht) confèrent au sol de Clessé sur une vingtaine d'années des propriétés très différentes de celles du sol contrôle (NA). Les intrants organiques, et plus particulièrement le compost de conifère et le trèfle, augmentent l'agrégation du sol dont les micro-agrégats sont mieux stabilisés. Dans le cas du trèfle, on note en parallèle une modification conséquente du pH du sol liée à l'augmentation de son activité rhizosphérique. Pour ces deux sols, ces changements entraînent plus globalement une modification de la distribution du cuivre à micro-échelle ainsi qu'une modification de sa biodisponibilité pour les bactéries et les plantes par rapport à un contexte sans traitement organique. Ces différents résultats montrent que dans un contexte de gestion de la fertilité des sols sous vigne, le choix de l'intrant organique est important puisqu'à terme il peut affecter le fonctionnement biogéochimique d'un sol et modifier sa sensibilité à une contamination métallique.

Relations réactivité, spéciation et distribution du cuivre à macro et micro-échelle.

L'amendement du sol de Clessé en compost de conifère (CC) est celui qui modifie le plus les propriétés du sol de Clessé. Ce traitement ainsi que le sol contrôle ont été retenus pour une étude détaillée de l'effet et du devenir d'une contamination au cuivre dans le sol incubé en mésocosmes sur le long terme.

Nous avons ainsi suivi sur deux ans l'évolution de la réactivité, la spéciation, l'impact et la mobilité du cuivre apporté aux deux sols à 240 ppm. A chaque pas de temps nous avons fractionné les sols pour caractériser la distribution du cuivre, de la MO et des microorganismes à micro-échelle (fractions de sol de taille >250, 250-63, 63-20, 20-2, et <2 µm). Nos résultats ont montré que chaque fraction granulométrique des sols présente une composition chimique (composition et réactivité), une structure spatiale et des communautés microbiennes variables, confirmant ainsi le caractère spécifique des microenvironnements des sols, qui représentent donc des micro-habitats microbiens spécifiques. En termes de réactivité

des sols au cuivre, nous avons montré qu'elle varie fortement d'une fraction à l'autre en relation avec leur teneur en MO et en argiles. La réactivité des fractions grossières est majoritairement dominée par la réactivité de la MO et celle des fractions fines par la réactivité des argiles. La composition spécifique des fractions granulométriques contrôle donc les processus d'accumulation du cuivre, qui n'est pas aléatoire dans les sols et qui varie avec l'amendement organique. Dans les deux sols, le cuivre est fortement retenu sur la matrice solide, le cuivre en solution représentant moins de 0.1 % du cuivre total du sol. Nous avons pu montrer que quelque soit l'échelle d'étude (sol non fractionné ou micro-agrégat), la MO modifie la spéciation du cuivre. En effet, par ses propriétés de chélation du cuivre, la MO ajoutée au sol limite la quantité de cuivre potentiellement libérée en solution. La dégradation du carbone au cours du temps a été observée principalement sur les matières organiques les plus grossières et de manière accélérée (conditions optimales) par rapport à la situation de terrain. De plus, ces fractions granulométriques grossières des deux sols (>250 µm et 250-63 µm), où s'accumule préférentiellement le carbone exogène, et dont le turnover est le plus rapide, voient leur teneur en cuivre significativement augmentée. Nous avons également montré que la contamination au cuivre « vieillit » au cours du temps, c'est-à-dire que sa distribution et sa spéciation évoluent à l'échelle de l'année, comme cela a déjà été suggéré précédemment sur le court terme (Lejon et al. 2008). Nous avons montré que cette dynamique de la concentration de cuivre en solution suit une cinétique en deux étapes, avec une forte diminution les premiers 6 mois qui suivent la contamination, différente pour les deux sols (en accord avec l'évolution du cuivre échangeable au calcium) et une deuxième étape beaucoup plus stable où le cuivre mobilisable est retenu de manière similaire dans les deux sols. L'évolution de la spéciation liquide du cuivre semble assez indépendante de la dose initiale de cuivre, puisque nous avons observé des états finaux très semblables lorsque le cuivre est apporté en 1 fois (240 ppm) ou en 4 fois (60 ppm) sur la même période.

Impact du cuivre

Les amendements organiques et le vieillissement de la contamination affectent également l'impact du cuivre sur les communautés bactériennes que nous avons suivi au cours du temps via deux indicateurs d'impact : la richesse en bactéries résistantes au cuivre et les empreintes génétiques de la structure des communautés bactériennes des deux sols et de leurs fractions granulométriques. Sur la parcelle viticole de Clessé, la matière organique apportée pendant plus de 20 ans a modifié la structure des communautés bactériennes du sol de Clessé à l'échelle globale mais aussi à l'échelle des micro-agrégats, en leur conférant une sensibilité différente aux pollutions métalliques. Nous avons pu observer que la MO et les argiles sont les phases les plus réactives vis-à-vis du Cu, leur teneur contrôlant l'accumulation du métal dans les fractions granulométriques du sol et, donc, le potentiel de contact (et donc de toxicité) avec les microorganismes localisés dans ces différents micro-habitats. La MO labile des fractions grossières des deux sols ayant accumulé le cuivre apporté, est progressivement dégradée dans ces fractions, libérant ainsi progressivement le cuivre qui redevient alors toxique sur le long terme pour les microorganismes et de manière similaire pour les deux sols étudiés. L'impact du cuivre sur les bactéries est alors contrôlé sur le long terme essentiellement par la dose totale de cuivre en contact avec les microorganismes plutôt que par sa spéciation (court terme) qui est différente dans un premier temps puis très similaire entre les deux sols après le vieillissement de la contamination. Dans un premier temps la MO joue donc un rôle protecteur (piège à cuivre), puis au cours de sa dégradation, un rôle de source de cuivre modulant ainsi l'impact du cuivre observé dans le sol.

Mobilité du cuivre

Par une approche de lessivage à l'eau des sols en colonnes, nous avons également évalué l'effet du mode de gestion des intrants organiques sur la mobilité du cuivre, dans le but d'établir le risque de contamination des ressources en eau par les fortes accumulations de cuivre à la surface des sols viticoles. Nos résultats ont montré un comportement très différencié du cuivre dans le sol de Clessé suivant qu'il est amendé ou non. En effet, bien qu'elle soit globalement faible, la mobilité du cuivre est deux fois plus importante dans le sol amendé en compost que dans le sol contrôle, mettant ainsi en évidence un effet, non plus protecteur, mais plutôt néfaste de l'amendement organique du sol. Nos résultats nous ont permis de montrer qu'en absence d'amendement organique, le cuivre est principalement transporté sous forme colloïdale et libre, tandis que dans le sol amendé en compost de conifère, le cuivre libre devient très minoritaire contrairement au cuivre chélaté par la matière organique dissoute, qui constitue alors le principal mécanisme de transfert du cuivre dans ce sol.

Modélisation

A chaque étape de notre étude, nous avons essayé de développer une modélisation spécifique à l'aide du logiciel PhreeqC pour tester les hypothèses concernant les mécanismes d'interaction et de transfert du cuivre dans les deux sols. Nous avons ainsi considéré les phases réactives et les mécanismes de transfert principaux des sols en simplifiant notamment la réactivité de la matière organique des deux sols à celle d'une matière organique standard de type acide humique. Grâce à cette modélisation, nous avons pu montrer que les constantes de réaction du cuivre avec la MO et les surfaces immobiles sont différentes.

Au cours du lessivage des deux sols en colonnes, nous n'avons pas noté d'impact particulier du cuivre sur la mobilité des bactéries cultivables totales ou résistantes au cuivre identifiées par séquençage de l'ADNr16S, et qui appartiennent principalement au groupe des *Proteobacteria*, classiquement rencontrées dans les sols pollués. Ceci confirme qu'en dehors d'un impact fort à court terme observé uniquement dans le sol non amendé, le cuivre impacte de manière similaire les communautés bactériennes des deux sols, dont les bactéries les plus mobiles (donc les plus facilement accessibles à l'eau) sont très similaires et majoritairement résistantes au cuivre.

Nos travaux ont clairement montré qu'il existe une cinétique annuelle de vieillissement du cuivre apporté sous forme de bouillie bordelaise. Le cuivre est d'abord retenu au contact des matières organiques grossières les plus accessibles, avant d'être progressivement stabilisé dans les phases argileuses des fractions fines (< 20 µm) des sols où les microorganismes s'accumulent préférentiellement. Une conséquence directe de cette stabilisation du cuivre est la diminution de sa mobilisation avec l'eau sous forme dissoute. En revanche le transfert sous forme particulaire (associé à la MO particulaire ou aux argiles), reste donc un mécanisme prépondérant du transfert du cuivre dans les deux sols, qui peut contribuer à sa dissémination vers les rivières, notamment via des processus de ruissellement de surface.

D'une manière générale, nos résultats ont montré que le mode de gestion des intrants organiques des sols sous vigne à l'échelle de la parcelle modifie les propriétés biogéochimiques du sol à micro-échelle (agrégat), modifiant ainsi la réactivité, la spéciation, l'impact et la mobilité du cuivre.

Il apparaît donc indispensable de mener cette gestion des intrants organiques de manière raisonnée à l'échelle de la parcelle en considérant les bénéfices mais aussi les retombés néfastes, notamment en termes de risque pour les ressources en eau.

Perspectives

Nos travaux ont contribué à une meilleure compréhension du devenir et de l'impact du cuivre dans les sols sous vigne, qui dépendent fortement des propriétés biogéochimiques du sol à micro-échelle. Ces propriétés sont elles mêmes sous le contrôle du carbone exogène apporté aux sols sous culture lors de leur gestion à grande échelle.

Ce travail a fait émerger de nouvelles questions sur cette problématique et un certain nombre de perspectives peut donc être envisagé en relation avec le turnover de la matière organique *in situ* et en conditions contrôlées, notamment avec l'identification précise des phases porteuses de cuivre dans le sol ou en solution, ou encore l'évaluation des mécanismes d'impact et de résistance au cuivre observé dans nos deux sols à long terme. Quelques unes de ces perspectives sont développées ci-après.

L'évolution de la matière organique exogène apportée au sol de Clessé a été montrée comme étant un facteur important dans le contrôle de l'évolution de la spéciation et de l'impact du cuivre. Il semble indispensable de ce fait de mieux caractériser les paramètres de dégradation de la MO et en particulier de mieux comprendre les mécanismes et cinétiques de dégradation de la MO dans les différentes fractions granulométriques du sol.

Une possibilité ici serait d'utiliser du compost de conifère préalablement marqué avec du ^{13}C ou du ^{15}N, pour mieux caractériser les voies et cinétiques de dégradation de cette MO par rapport à la MO naturelle, ainsi que les communautés microbiennes impliquées dans la dégradation. Cette méthode est toutefois très difficile à mettre en place car elle nécessite des outils et des compétences complexes. Le rôle des MO particulaires (MOP), qui représentent une des fractions organiques les plus réactives des sols, dans la rétention du cuivre mériterait également d'être caractérisée de manière plus approfondie. Cette étude a déjà débuté au laboratoire Pessac de l'INRA de Versailles dans le cadre du projet MOBiPo-Cu et est en cours de finalisation, en collaboration avec Isabelle Lamy. La prise en compte de la réactivité de cette fraction organique devrait permettre d'améliorer notablement la modélisation de la rétention du cuivre par les phases réactives des sols sous vignes.

Les aspects de modélisation de la réactivité au cuivre des différents constituants des sols n'ont été abordés ici que de manière très succincte faute de temps. De la même manière, la modélisation des mécanismes de transfert du cuivre en solution n'a été abordée que de manière globale, en ne considérant qu'un seul type de phase réactive organique représentant l'ensemble des phases réactives du sol. Dans le but de mieux prédire le risque de contamination des ressources en eaux par le cuivre, il conviendrait d'améliorer la conceptualisation des processus pris en compte dans le transfert réactif du cuivre, en identifiant précisément les phases mobiles facilitant le transfert du métal : colloïdes biotiques ou abiotiques, nature et quantité de la matière organique dissoute réactive au cuivre…

Ces phases mobiles réactives pourraient être collectées *in situ* sur la parcelle d'étude afin de valider l'importance de ce processus en conditions naturelles, en parallèle des essais en laboratoire.

De plus, il serait intéressant de réaliser des essais de lessivage de sol contaminé en cuivre non remaniées (préservant ainsi la structure réelle du sol de colonne) afin de mieux comprendre le rôle de la structure spatiale des sols dans la mobilité du cuivre.

Enfin, une perspective importante de notre travail en microbiologie, et qui a déjà été initiée au cours de ce travail, concerne l'étude de la micro-biogéographie (en cours) du sol de Clessé. Celle-ci permettra d'identifier les microorganismes dominants des différents micro-habitats des deux sols afin de savoir lesquels sont impactés préférentiellement par le cuivre, et comment et à quelle vitesse se mettent en place les mécanismes de résistance dans les

différentes fractions du sol en relation avec leur exposition au cuivre. On pourra ainsi mettre en relation la dynamique des populations bactériennes et l'évolution des fonctions associées. Ces travaux seront confrontés aux résultats d'identification des microorganismes lessivables en colonnes, effectués au cours de ce travail, ce qui permettra de remonter à leur localisation initiale dans la structure spatiale des sols et ainsi de mieux comprendre les mécanismes de mobilisation des bactéries en fonction de leur localisation (accessibilité à l'eau) et de leurs propriétés de surface intrinsèques. On pourrait alors mieux évaluer l'impact des pollutions métalliques sur les fonctions biogéochimiques importantes des sols, en liaison avec la distribution des acteurs microbiens dominants, de la redondance fonctionnelle, ou simplement de la structure des communautés bactériennes de chacun de ces micro-habitats.

Références

A

Abiven, S., Menasseri, S. & Chenu, C. (2009). The effects of organic inputs over time on soil aggregate stability – A literature analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1-12.

Aiken, G. (1985). Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation, and characterization. Wiley, New York.

Alloway, B. (1995). *Heavy metals in soils*. 2e edn. Blackie Academic & Professional, London.

Almås, Å.R., Mulder, J. & Bakken, L.R. (2005). Trace Metal Exposure of Soil Bacteria Depends on Their Position in the Soil Matrix. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 5927-5932.

Alvarez-Puebla, R.A., Valenzuela-Calahorro, C. & Garrido, J.J. (2006). Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregationA molecular modelling approach. *Science of The Total Environment*, 358, 243-254.

Andreux, F., Bruckert, S., Correa, A. & Souchier, B. (1980). Sur une méthodologie de fractionnement physique et chimique des agrégats des sols: origine de la matière organique des fractions obtenues. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des Ciences série D*, 291, 381-384.

Angers, D.A. & Caron, J. (1998). Plant-induced changes in soil structure: Processes and feedbacks. *Biogeochemistry*, 42, 55-72.

Angers, D.A., Recous, S. & Aita, C. (1997). Fate of carbon and nitrogen in water-stable aggregates during decomposition of 13C15N-labelled wheat straw in situ. *European Journal of Soil Science*, 48, 295-300.

Arias, M., Lopez, E., Fernandez, D. & Soto, B. (2004). Copper distribution and dynamics in acid vineyard soils treated with copper-based fungicides. *Soil Science*, 169, 796-805.

Arias-Estévez, M., Novoa-Munoz, J.C., Pateiro, M. & Lopez-Periago, E. (2007). Infleunce of aging on copper fractionation in an acid soil. *Soil Science*, 172, 225-232.

Ashworth, D. & Alloway, B.J. (2004). Soil mobility of sewage sludge-derived dissolved organic matter, copper, nickel and zinc. *Environmental Pollution*, 127, 137-144.

Ashworth, D.J. & Alloway, B.J. (2007). Complexation of Copper by Sewage Sludge-derived Dissolved Organic Matter: Effects on Soil Sorption Behaviour and Plant Uptake. *Water Air Soil Pollut*, 182, 187-196.

B

Baize, D. (1997). *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols: France*. Institut national de la recherche agronomique, Paris.

Balabane, M. & Plante, A.F. (2004). Aggregation and carbon storage in silty soil using physical fractionation techniques. *Eur J Soil Science*, 55, 415-427.

Balesdent, J., Mariotti, A. & Guillet, B. (1987). Natural 13C abundance as a tracer for studies of soil organic matter dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 25-30.

Bao, Q., Lin, Q., Tian, G., Wang, G., Yu, J. & Peng, G. (2011). Copper distribution in water-dispersible colloids of swine manure and its transport through quartz sand. *Journal of Hazardous Materials*, 186, 1660-1666.

Baptist, F., Zinger, L., Clement, J.C., Gallet, C., Guillemin, R., Martins, J.M.F., et al. (2008). Tannin impacts on microbial diversity and the functioning of alpine soils: a multidisciplinary approach. *Environmental Microbiology*, 10, 799-809.

Bartoli, F. & Dousset, S. (2011). Impact of organic inputs on wettability characteristics and structural stability in silty vineyard topsoil. *European Journal of Soil Science*, 62, 183-194.

Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J.L., Ros, M., García, C. & Hernández, T. (2008). Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, 40, 318-329.

Becker, J.M., Parkin, T., Nakatsu, C.H., Wilbur, J.D. & Konopka, A. (2006). Bacterial Activity, Community Structure, and Centimeter-Scale Spatial Heterogeneity in Contaminated Soil. *Microb Ecol*, 51, 220-231.

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

Beveridge, T.J. (1989). Role of Cellular Design in Bacterial Metal Accumulation and Mineralization. *Annual Review of Microbiology*, 43, 147-171.

Blake, G.R. & Hartge, K.H. (1986). Bulk Density. Dans: Methods of Soil Analysis, Part I. Physical and mineralogical Methods: Agronomy Monograph. Klute A., p. 363-375.

Blott, S.J. & Pye, K. (2001). GRADISTAT: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Earth Surf. Process. Landforms*, 26, 1237-1248.

Bolan, N.., Naidu, R., Choppala, G., Park, J., Mora, M.L., Budianta, D., et al. (2010). Solute Interactions in Soils in Relation to the Bioavailability andEnvironmental Remediation of Heavy Metals and Metalloids, 53, 1-18.

Bolan, N.S., Adriano, D.C., Duraisamy, P., Mani, A. & Arulmozhiselvan, K. (2003b). Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. I. Effect of phospahte addition. *Plant and Soil*, 250, 83-94.

Bonneau, M. (1979). *Pédologie.* Masson, Paris; New York; Barcelone...etc.

Bonten, L., Groenenberg, J., Weng, L. & Vanriemsdijk, W. (2008). Use of speciation and complexation models to estimate heavy metal sorption in soils. *Geoderma*, 146, 303-310.

Borrok, D., Turner, B.F. & Fein, A.B. (2005). A universal surface complexation framework for modeling proton binding onto bacterial surfaces in geologic settings. *American Journal of Science*, 305, 826-853.

Bossuyt, H., Six, J. & Hendrix, P. (2006). Interactive effects of functionally different earthworm species on aggregation and incorporation and decomposition of newly added residue carbon. *Geoderma*, 130, 14-25.

Bossuyt, H., Six, J. & Hendrix, P.F. (2005). Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 251-258.

Bourrelier, P.H., Berthelin, J. & Pedro, G. (1998). *Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion*. Technique et Documentation Lavoisier, Paris.

Brandt, K.K., Frandsen, R.J.N., Holm, P.E. & Nybroe, O. (2010). Development of pollution-induced community tolerance is linked to structural and functional resilience of a soil bacterial community following a five-year field exposure to copper. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 748-757.

Bronick, C. & Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124, 3-22.

Brown, G.G., Barois, I. & Lavelle, P. (2000). Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activityin the drilosphere and the role of interactionswith other edaphic functional domains§. *European Journal of Soil Biology*, 36, 177-198.

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

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

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

Buekers, J., Van Laer, L., Amery, F., Van Buggenhout, S., Maes, A. & Smolders, E. (2007). Role of soil constituents in fixation of soluble Zn, Cu, Ni and Cd added to soils. *Eur J Soil Science*, 58, 1514-1524.

Buffle, J. (1993). *Environmental particles.* Lewis, Boca Raton (Fla.).

Buffle, J.A.E. (1977). Les substances humiques et leurs interactions avec les ions minéraux. Présenté à Conference Proccedings de la Commission d'Hydrologie Appliquée de l'A.G.H.T.M, Université d'Orsay.

C

Calvet, R. (2003). *Le sol: propriétés et fonctions.* Ed. France agricole; Dunod, Paris.

Carter, M. & Stewart, B.A. (1996). *Structure and organic matter storage in agricultural soils*. Lewis Publishers, Boca Raton FL.

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

Chaignon, V., Bedin, F. & Hinsinger, P. (2002). Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. *Plant and Soil*, 243, 219-228.

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

Chemidlin Prevost-Boure, N., Maron, P.-A., Ranjard, L., Nowak, V., Dufrene, E., Damesin, C., et al. (2011). Seasonal dynamics of the bacterial community in forest soils under different quantities of leaf litter. *Applied Soil Ecology*, 47, 14-23.

Chenu, C. (1989). Influence of a fungal polysaccharide, scleroglucan, on clay microstructures. *Soil Biology and Biochemistry*, 21, 299-305.

Chenu, C. (1993). Clay- or sand-polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil: water related properties and microstructure. *Geoderma*, 56, 143-156.

Chenu, C. & Bruand, A. (1998). Constituants et organisation du sol. Dans: *Sol interface fragile*. Stengel,P. et Gelin, S., p. 3-17.

Chenu, C. & Plante, A.F. (2006). Clay-sized organo-mineral complexes in a cultivation chronosequence: revisiting the concept of the « primary organo-mineral complex ». *Eur J Soil Science*, 57, 596-607.

Chenu, C. & Stotzky, G. (2002). Interactions between microorganisms and soil particles: An overview. Dans: *Interactions between soil particles ans microorganisms : impact on the terrestrial ecosystem*. Huang PM, Bollag JM, Senesi N, p. 3-40.

Chenu, C., Le Bissonnais, Y. & Arrouays, D. (2000). Organic Matter Influence on Clay Wettability and Soil Aggregate Stability. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 1479-1486.

Chenu, C., Hassink, J. & Bloem, J. (2001). Short-term changes in the spatial distribution of microorganisms in soil aggregates as affected by glucose addition. *Biology and Fertility of Soils*, 34, 349-356.

Chotte, J., Schwartzmann, A., Bally, R. & Jocteur Monrozier, L. (2002). Changes in bacterial communities and Azospirillum diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19years of natural fallow. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1083-1092.

Christensen, B.T. (2001). Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *Eur J Soil Science*, 52, 345-353.

Conder, J.M., Lanno, R.P. & Basta, N.T. (2001). Assessment of Metal Availability in Smelter Soil Using Earthworms and Chemical Extractions. *Journal of Environment Quality*, 30, 1231.

D

Dawson, J., Campbell, C., Towers, W., Cameron, C. & Paton, G. (2006). Linking biosensor responses to Cd, Cu and Zn partitioning in soils. *Environmental Pollution*, 142, 493-500.

Dechesne, A., Pallud, C., Bertolla, F. & Grundmann, G.L. (2005). Impact of the Microscale Distribution of a Pseudomonas Strain Introduced into Soil on Potential Contacts with Indigenous Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8123-8131.

Dellamico, E., Mazzocchi, M., Cavalca, L., Allievi, L. & Andreoni, V. (2008). Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. *Microbiological Research*, 163, 671-683.

Denef, K., Six, J., Bossuyt, H., Frey, S.D., Elliott, E.T., Merckx, R., et al. (2001a). Influence of dry-wet cycles on the interrelationship between aggregate, particulate organic matter, and microbial community dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1599-1611.

Denef, K., Six, J., Merckx, R. & Paustian, K. (2002). Short-term effects of biological and physical forces on aggregate formationin soils with different clay mineralogy. *Plant and Soil*, 246, 185-200.

Denef, K., Six, J., Paustian, K. & Merckx, R. (2001b). Importance of macroaggregate dynamics in controlling soil carbon stabilization: short-term effects of physical disturbance induced by dry–wet cycles. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 2145-2153.

Devez, A., Gomez, E., Gilbin, R., Elbaz-Poulichet, F., Persin, F., Andrieux, P., et al. (2005). Assessment of copper bioavailability and toxicity in vineyard runoff waters by DPASV and algal bioassay. *Science of The Total Environment*, 348, 82-92.

Dorioz, J., Robert, M. & Chenu, C. (1993). The role of roots, fungi and bacteria on clay particle organization. An experimental approach. *Geoderma*, 56, 179-194.

Ducaroir, J. & Lamy, I. (1995). Evidence of trace metal association with soil organic matter using particle size fractionation after physical dispersion treatment. *Analyst*, 120, 741.

Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S. & Benedetti, M. (2006). Study of the trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soils. *Environmental Pollution*, 142, 521-529.

E

Edwards, A.P. & Bremner, J.M. (1967). Microaggregates in soils 1. *Journal of Soil Science*, 18, 64-73.

El-Swaify, S.A. & Emerson, W.W. (1975). Changes in the Physical Properties of Soil Clays Due to Precipitated Aluminum and Iron Hydroxides: I. Swelling and Aggregate Stability After Drying1. *Soil Science Society of America Journal*, 39, 1056.

Elliott, E.T. (1986). Aggregate Structure and Carbon, Nitrogen, and Phosphorus in Native and Cultivated Soils1. *Soil Science Society of America Journal*, 50, 627.

Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J. & Fry, J.C. (2003). Cultivation-Dependent and -Independent Approaches for Determining Bacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3223-3230.

Ettema, C.H. & Wardle, D.A. (2002). Spatial soil ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 177-183.

F

Fall, S., Nazaret, S., Chotte, J.L. & Brauman, A. (2004). Bacterial Density and Community Structure Associated with Aggregate Size Fractions of Soil-Feeding Termite Mounds. *Microb Ecol*, 48, 191-199.

Fernández-Calviño, D., Nóvoa-Muñoz, J.C., López-Periago, E. & Arias-Estévez, M. (2008a). Changes in copper content and distribution in young, old and abandoned vineyard acid soils due to land use changes. *Land Degrad. Dev.*, 19, 165-177.

Fernández-Calviño, D., Pateiro-Moure, M., López-Periago, E., Arias-Estévez, M. & Nóvoa-Muñoz, J.C. (2008b). Copper distribution and acid-base mobilization in vineyard soils and sediments from Galicia (NW Spain). *Eur J Soil Science*, 59, 315-326.

Ferrand, E., Dumat, C., Leclerc-Cessac, E. & Benedetti, M.F. (2006). Phytoavailability of zirconium in relation to its initial added form and soil characteristics. *Plant Soil*, 287, 313-325.

Fisher, M.M. & Triplett, E.W. (1999). Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4630-4636.

Flores-Velez, L.M., Ducaroir, J., Jaunet, A.M. & Robert, M. (1996). Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *Eur J Soil Science*, 47, 523-532.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006). *World reference base for soil resources, 2006: a framework for international classification, correlation and communication.* 2006[e] edn. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fordham, A. & Norrish, K. (1983). The nature of soil particles particularly those reacting with arsenate in a series of chemically treated samples. *Aust. J. Soil Res.*, 21, 455.

G

Gale, W.J., Cambardella, C.A. & Bailey, T.B. (2000). Root-Derived Carbon and the Formation and Stabilization of Aggregates. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 201-207.

Ghabbour, E. & Davies, G. (2005). Humic substances: molecular details and applications in land and water conservation. Taylor and Francis, New York.

Giller, K.E., Witter, E. & McGrath, S.P. (2009). Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 2031-2037.

Giller, K.E., Witter, E. & Mcgrath, S.P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1389-1414.

Goyal, H.B., Seal, D. & Saxena, R.C. (2008). Bio-fuels from thermochemical conversion of renewable resources: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12, 504-517.

Green, J.L., Holmes, A.J., Westoby, M., Oliver, I., Briscoe, D., Dangerfield, M., et al. (2004). Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature*, 432, 747-750.

Grosbellet, C., Vidal-Beaudet, L., Caubel, V. & Charpentier, S. (2011). Improvement of soil structure formation by degradation of coarse organic matter. *Geoderma*, 162, 27-38.

Grundmann, G.L. (2004). Spatial scales of soil bacterial diversity - the size of a clone. *FEMS Microbiology Ecology*, 48, 119-127.

Guine, V. (2006). Approche expérimentale et théorique de la réactivité de surface et de la mobilité des colloïdes bactériens en milieux poreux.Terre univers Environnement. Institut national polytechnique de Grenoble, Grenoble, p.231.

Guine, V., Martins, J., Causse, B., Durand, A., Gaudet, J. & Spadini, L. (2007). Effect of cultivation and experimental conditions on the surface reactivity of the metal-resistant bacteria Cupriavidus metallidurans CH34 to protons, cadmium and zinc. *Chemical Geology*, 236, 266-280.

Guiné, V., Martins, J. & Gaudet, J.P. (2003). Facilitated transport of heavy metals by bacterial colloids in sand columns. *J. Phys. IV France*, 107, 593-596.

Guiné, V., Spadini, L., Sarret, G., Muris, M., Delolme, C., Gaudet, J.-P., et al. (2006). Zinc Sorption to Three Gram-Negative Bacteria: Combined Titration, Modeling, and EXAFS Study. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 1806-1813.

H

Hartwig, A., Asmuss, M., Ehleben, I., Herzer, U., Kostelac, D., Pelzer, A., et al. (2002). Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ. Health Perspect*, 110 Suppl 5, 797-799.

Hattori, T. (1988). Soil aggregats as microhabitats of microorganisms. *Reports of the Institue for Agricultural Research Tohoku University*, 37, 23-36.

Haynes, R.J. & Swift, R.S. (1990). Stability of soil aggregates in relation to organic constituents and soil water content. *J. Soil Sciences*, 41, 73-83.

Heijnen, C.E. & van Veen, J.A. (1991). A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *FEMS Microbiology Letters*, 85, 73-80.

Hillel, D. (1998). *Environmental soil physics*. Academic Press, San Diego CA.

Hinsinger, P. (1998). How Do Plant Roots Acquire Mineral Nutrients? Chemical Processes Involved in the rhizosphere. Dans: *Advances in Agronomy*. Elsevier, p. 225-265.

Horner-Devine, M.C., Carney, K.M. & Bohannan, B.J.M. (2004). An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271, 113-122.

I

Irving, H. & Williams, R.J.P. (1953). The stability of transition-metal complexes. *J. Chem. Soc.*, 3192-3210.

J

Jacobson, A.R., Dousset, S., Andreux, F. & Baveye, P.C. (2007). Electron Microprobe and Synchrotron X-ray Fluorescence Mapping of the Heterogeneous Distribution of Copper in High-Copper Vineyard Soils. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 6343-6349.

Janusauskaite, D., Ozeraitiene, D. & Fullen, M. (2009). Distribution of populations of micro-organisms in different aggregate size classes in soil as affected by long-term liming management. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Sc.*, 59, 544-551.

Jastrow, J.D. (1996). Soil aggregate formation and the accural of particulate and mineral-associated organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 665-676.

Jocteur Monrozier, L., Guez, P., Chalamet, A., Bardin, R., Martins, J. & Gaudet, J.P. (1993). Distribution of microorganisms and fate of xenobiotic molecules in unsaturated soil environments. *Science of The Total Environment*, 135, 121-133.

Jocteur Monrozier, L., Ladd, J., Fitzpatrick, R., Foster, R. & Rapauch, M. (1991). Components and microbial biomass content of size fractions in soils of contrasting aggregation. *Geoderma*, 50, 37-62.

John, B., Yamashita, T., Ludwig, B. & Flessa, H. (2005). Storage of organic carbon in aggregate and density fractions of silty soils under different types of land use. *Geoderma*, 128, 63-79.

Juste, C., Chassin, P., Gomez, A., Lineres, M., Mocquot, B., Feix, I., et al. (1995). *Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines*. ADEME-INRA, Angers.

K

Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (1992). *Trace elements in soils and plants*. 2^{e} edn. CRC Press, Boca Raton.

Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (2001). *Trace elements in soils and plants*. 3^{e} edn. CRC Press, Boca Raton Fla.

Kabir, M., Chotte, J.L., Rahman, M., Bally, R. & Monrozier, L.J. (1994). Distribution of soil fractions and location of soil bacteria in a vertisol under cultivation and perennial grass. *Plant Soil*, 163, 243-255.

Kandeler, E., Tscherko, D., Bruce, K.D., Stemmer, M., Hobbs, P.J., Bardgett, R.D., et al. (2000). Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biology and fertility of soils*, 32, 390-400.

Kandeler, F., Kampichler, C. & Horak, O. (1996). Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol Fertil Soils*, 23, 299-306.

Karathanasis, A.D., Johnson, D.M.. & Matocha, C.J. (2005). Biosolid colloid-mediated transport of copper, zinc, and lead in waste-amended soils. *Journal of environmental quality*, 34, 1153-1164.

Khan, M. & Scullion, J. (2000). Effect of soil on microbial responses to metal contamination. *Environmental Pollution*, 110, 115-125.

Kilbertus, G. (1980). Etude des microhabitats contenus dans les agrégats du sol. Leur relation avec la biomasse bactérienne et la taille des procaryotes présents. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 17, 543-557.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 16, 111-120.

Komarek, M., Szakova, J., Rohoskova, M., Javorska, H., Chrastny, V. & Balik, J. (2008). Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: A case study from the Czech Republic. *Geoderma*, 147, 16-22.

Komárek, M., Čadková, E., Chrastný, V., Bordas, F. & Bollinger, J.-C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, 36, 138-151.

Konert, M. & Vandenberghe, J. (1997). Comparison of laser grain size analysis with pipette and sieve analysis: a solution for the underestimation of the clay fraction. *Sedimentology*, 44, 523-535.

Kumpiene, J., Lagerkvist, A. & Maurice, C. (2007). Stabilization of Pb- and Cu-contaminated soil using coal fly ash and peat. *Environmental Pollution*, 145, 365-373.

Kunito, T., Saeki, K., Oyaizu, H. & Matsumoto, S. (1999a). Influences of Copper Forms on the Toxicity to Microorganisms in Soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, 174-181.

Kunito, T., Senoo, K., Saeki, K., Oyaizu, H. & Matsumoto, S. (1999b). Usefulness of the Sensitivity–Resistance Index to Estimate the Toxicity of Copper on Bacteria in Copper-Contaminated Soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, 182-189.

L

Ladd, J., Foster, R. & Skjemstad, J. (1993). Soil structure: carbon and nitrogen metabolism. *Geoderma*, 56, 401-434.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.

Ledin, M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*, 51, 1-31.

Lejon, D.P.H., Chaussod, R., Ranger, J. & Ranjard, L. (2005). Microbial Community Structure and Density Under Different Tree Species in an Acid Forest Soil (Morvan, France). *Microb Ecol*, 50, 614-625.

Lejon, D.P.H., Martins, J.M.F., Lévêque, J., Spadini, L., Pascault, N., Landry, D., et al. (2008). Copper Dynamics and Impact on Microbial Communities in Soils of Variable Organic Status. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 2819-2825.

Lejon, D.P.H., Pascault, N. & Ranjard, L. (2010). Differential copper impact on density, diversity and resistance of adapted culturable bacterial populations according to soil organic status. *European Journal of Soil Biology*, 46, 168-174.

Lejon, D.P.H., Sebastia, J., Lamy, I., Chaussod, R. & Ranjard, L. (2007). Relationships between Soil Organic Status and Microbial Community Density and Genetic Structure in Two Agricultural Soils Submitted to Various Types of Organic Management. *Microb Ecol*, 53, 650-663.

Lemaitre, C. (1998). *Biodétérioration des matériaux*. EDP Sciences, Les Ulis [France].

Lenoir, T. & Manceau, A. (2010). Number of Independent Parameters in the Potentiometric Titration of Humic Substances. *Langmuir*, 26, 3998-4003.

Li, P., Wang, X., Zhang, T., Zhou, D. & He, Y. (2008). Effects of several amendments on rice growth and uptake of copper and cadmium from a contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 449-455.

Li, W., Zhang, M. & Shu, H. (2005). Distribution and Fractionation of Copper in Soils of Apple Orchards (5 pp). *Env Sci Poll Res Int*, 12, 168-172.

Lugato, E., Simonetti, G., Morari, F., Nardi, S., Berti, A. & Giardini, L. (2010). Distribution of organic and humic carbon in wet-sieved aggregates of different soils under long-term fertilization experiment. *Geoderma*, 157, 80-85.

M

Madejon, E., Madejon, P., Burgos, P., Perezdemora, A. & Cabrera, F. (2009). Trace elements, pH and organic matter evolution in contaminated soils under assisted natural remediation: A 4-year field study. *Journal of Hazardous Materials*, 162, 931-938.

Maderova, L., Watson, M. & Paton, G.I. (2011). Bioavailability and toxicity of copper in soils: Integrating chemical approaches with responses of microbial biosensors. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 1162-1168.

Manceau, A. & Matynia, A. (2010). The nature of Cu bonding to natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74, 2556-2580.

Marinissen, J.C.Y. & Dexter, A.R. (1990). Mechanisms of stabilization of earthworm casts and artificial casts. *Biol Fertil Soils*, 9, 163-167.

Marschner, P. (2003). Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 453-461.

Martins, J.M., Jocteur Monrozier, L., Chamalet, A. & Bardin, R. (1997). Microbial response to repeated applications of low concentrations of pentachlorophenol in an alfisol under pasture. *Chemosphere*, 35, 1637-1650.

Martins, J.M.F. (2008). Microbiogéochimie, transfert réactif et impact des micropolluants dans les sols. Approche couplée multi-échelles et modélisation.

Martins, J.M.F., Navel, A., Manceau, A., Ranjard, L., Maron, P.-A., Lamy, I., et al. (2010). Rôle de la matière organique et de la biocénose dans le devenir d'une pollution chronique et diffuse au cuivre dans un sol viticole. MOBiPo-Cu. Colloque de restitution du programme EC2CO. Toulouse.

Matynia, A., Lenoir, T., Causse, B., Spadini, L., Jacquet, T. & Manceau, A. (2010). Semi-empirical proton binding constants for natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74, 1836-1851.

McLaren, R.G. & Crawford, D.V. (1973). Studies on soil copper. *Journal of Soil Science*, 24, 443-452.

Mench, M., Vangronsveld, J., Didier, V. & Clijsters, H. (1994). Evaluation of metal mobility, plant availability and immobilization by chemical agents in a limed-silty soil. *Environmental Pollution*, 86, 279-286.

Milleret, R., Le Bayon, R.-C., Lamy, F., Gobat, J.-M. & Boivin, P. (2009). Impact of roots, mycorrhizas and earthworms on soil physical properties as assessed by shrinkage analysis. *Journal of Hydrology*, 373, 499-507.

Mohamed, I., Ahamadou, B., Li, M., Gong, C., Cai, P., Liang, W., et al. (2010). Fractionation of copper and cadmium and their binding with soil organic matter in a contaminated soil amended with organic materials. *J Soils Sediments*, 10, 973-982.

Monreal, C.M., Schulten, H.-R. & Kodama, H. (1997). Age, turnover and molecular diversity of soil organic matter in aggregates of a Gleysol. *Canadian Journal of Soil Science*, 77, 379-388.

Mummey, D., Holben, W., Six, J. & Stahl, P. (2006). Spatial Stratification of Soil Bacterial Populations in Aggregates of Diverse Soils. *Microb Ecol*, 51, 404-411.

Mummey, D.L. & Stahl, P.D. (2004). Analysis of Soil Whole- and Inner-Microaggregate Bacterial Communities. *Microb Ecol*, 48, 41-50.

N

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Science*, 54, 655-670.

Navel, A., Martins, J.M.F., Ranjard, L., Maron, P.-A., Manceau, A., Lamy, I., et al. (2011). Control of copper impact on bacterial community by microscale localisation of microorganisms and added copper and organic matter in a vineyard loamy soil. Présenté à ISMOM, Montpellier, France.

Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., Crawford, J.W. & Ritz, K. (2002). In Situ Spatial Patterns of Soil Bacterial Populations, Mapped at Multiple Scales, in an Arable Soil. *Microbial Ecology*, 44, 296-305.

Nybroe, O., Brandt, K.K., Ibrahim, Y.M., Tom-Petersen, A. & Holm, P.E. (2008). Differential bioavailability of copper complexes to bioluminescent pseudomonas fluorescens reporter strains. *Environ Toxicol Chem*, 27, 2246.

O

Oades, J. (1993). The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma*, 56, 377-400.

Oades, J.M. (1984). Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant Soil*, 76, 319-337.

Oades, J.M. (1988). The retention of organic matter in soils. *Biogeochemistry*, 5, 35-70.

Oorts, K., Bossuyt, H., Labreuche, J., Merckx, R. & Nicolardot, B. (2007). Carbon and nitrogen stocks in relation to organic matter fractions, aggregation and pore size distribution in no-tillage and conventional tillage in northern France. *Eur J Soil Science*, 58, 248-259.

P

Padmavathiamma, P. & Li, L. (2009). Phytoremediation of Metal-Contaminated Soil in Temperate Humid Regions of British Columbia, Canada. *Int. J. of Phytoremediation*, 11, 575-590.

Padmavathiamma, P. & Li, L. (2010). Effect of Amendments on Phytoavailability and Fractionation of Copper and Zinc in a Contaminated Soil. *Int. J. of Phytoremediation*, 12, 697-715.

Parat, C., Chaussod, R., Leveque, J., Dousset, S. & Andreux, F. (2002). The relationship between copper accumulated in vineyard calcareous soils and soil organic matter and iron. *Eur J Soil Science*, 53, 663-670.

Parkhurst, D.L. & Appelo, C.A.J. (1999). User's guide to PhreeqC (version 2) - A computer program for speciation batch-reaction, one dimensional transport and invers geochemical calculation. *Water Ressources Investigation Report*, 99-4259.

Pelmont, J. (2005). Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP sciences, Les Ulis France.

Pietrzak, U. & Mcphail, D. (2004). Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma*, 122, 151-166.

Piotrowska-Seget, Z. & Kozdroj, J. (2008). Changes in culturable bacterial community of soil treated with high dosages of Cu or Cd. *Plant Soil & Environment*, 54, 520-528.

R

Ramos, L., Hernandez, L.M. & Gonzalez, M.J. (1994). Sequential Fractionation of Copper, Lead, Cadmium and Zinc in Soils from or near Doñana National Park. *Journal of Environment Quality*, 23, 50.

Ranjard, L. & Richaume, A. (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152, 707-716.

Ranjard, L., Brothier, E. & Nazareth, S. (2000). Sequencing Bands of Ribosomal Intergenic Spacer AnalysisFingerprints for Characterization and Microscale Distribution ofSoil Bacterium Populations Responding to Mercury Spiking. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5334-5339.

Ranjard, L., Lejon, D.P.H., Mougel, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D. & Chaussod, R. (2003). Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ Microbiol*, 5, 1111-1120.

Ranjard, L., Nowak, V., Echairi, A., Faloya, V. & Chaussod, R. (2008). The dynamics of soil bacterial community structure in response to yearly repeated agricultural copper treatments. *Research in Microbiology*, 159, 251-254.

Ranjard, L., Richaume, A., Jocteur-Monrozier, L. & Nazaret, S. (1997). Response of soil bacteria to Hg (II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiology Ecology*, 24, 321-331.

Rasmussen, L.D. & Sorensen, S.J. (2001). Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36, 1-9.

Remenant, B., Grundmann, G. & Jocteurmonrozier, L. (2009). From the micro-scale to the habitat: Assessment of soil bacterial community structure as shown by soil structure directed sampling. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 29-36.

Remon, E., Bouchardon, J., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J. & Faure, O. (2005). Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. *Environmental Pollution*, 137, 316-323.

Richaume, A., Steinberg, C., Jocteurmonrozier, L. & Faurie, G. (1993). Differences between direct and indirect enumeration of soil bacteria: The influence of soil structure and cell location. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 641-643.

Robert, M. (1996). Le Sol : interface dans l'environnement: ressource pour le développement. Masson, Paris (etc.).

Rousseau, M. (2003). Transport préférentiel de particules dans un sol non saturé: de l'expérimentation en colonne lysimétrique à l'élaboration d'un modèle à base physique.

Ruamps, L.S., Nunan, N. & Chenu, C. (2011). Microbial biogeography at the soil pore scale. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 280-286.

Rumpel, C., Eusterhues, K. & Kogel-Knabner, I. (2004). Location and chemical composition of stabilized organic carbon in topsoil and subsoil horizons of two acid forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 177-190.

Ryan, J. & Elimelech, M. (1996). Colloid mobilization and transport in groundwater. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 107, 1-56.

S

Saison, C., Degrange, V., Oliver, R., Millard, P., Commeaux, C., Montange, D., et al. (2006). Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environ Microbiol*, 8, 247-257.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method - A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4, 406-425.

Salam, D. & El-Fadel, M. (2008). Mobility and Availability of Copper in Agricultural Soils Irrigated from Water Treated with Copper Sulfate Algaecide. *Water Air Soil Pollut*, 195, 3-13.

Sauvé, S., McBride, M., Norvell, W. & Hendershot, W. (1997). copper solubility and speciation of in situ contaminated soil: effects of copper level, pH and organic matter. *Water, Air and Soil Pollution*, 133-149.

Schmitt, D. (2003). NOM-facilitated transport of metal ions in aquifers: importance of complex-dissociation kinetics and colloid formation. *Water Research*, 37, 3541-3550.

Schoeneberger, P.J. (2003). *Field Book for Describing and Sampling Soils, Version 2.0*. United States Government Printing Office.

Schulten, H.-R. & Schnitzer, M. (1993). A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*, 80, 29-30.

Schäfer, A., Ustohal, P., Harms, H., Stauffer, F., Dracos, T. & Zehnder, A.J.B. (1998). Transport of bacteria in unsaturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology*, 33, 149-169.

Sebastia, J. (2007). Prise en compte de la réactivité de différentes fractions des matières organiques du sol dans la prévision de la spéciation des métaux: cas du cuivre.

Sebastia, J., van Oort, F. & Lamy, I. (2008). Buffer capacity and Cu affinity of soil particulate organic matter (POM) size fractions. *Eur J Soil Science*, 59, 304-314.

Sen, T. & Khilar, K. (2006). Review on subsurface colloids and colloid-associated contaminant transport in saturated porous media. *Advances in Colloid and Interface Science*, 119, 71-96.

Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H. & Kandeler, E. (2001). Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4215-4224.

Shahnavaz, B. (2009). Communautés bactériennes de sols alpins et filtres environnementaux.

Shuman, L.M. (1985). Fractionation Method For Soil Microelements. *Soil Science*, 140, 11-22.

Sigg, L., Behra, P. & Stumm, W. (2001). Chimie des milieux aquatiques chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. 3e edn. Dunod, Paris.

Six, J., Bossuyt, H., Degryse, S. & Denef, K. (2004). A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics*1. *Soil and Tillage Research*, 79, 7-31.

Six, J., Paustian, K., Elliott, E.T. & Combrink, C. (2000). Soil Structure and Organic Matter. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 681.

Slaveykova, V.I. & Wilkinson, K.J. (2005). Predicting the Bioavailability of Metals and Metal Complexes: Critical Review of the Biotic Ligand Model. *Environ. Chem.*, 2, 9.

Spadini, L., Schindler, P.W., Charlet, L., Manceau, A. & Ragnarsdottir, K.V. (2003). Hydrous ferric oxide: evaluation of Cd–HFO surface complexation models combining CdK EXAFS data, potentiometric titration results, and surface site structures identified from mineralogical knowledge. *Journal of Colloid and Interface Science*, 266, 1-18.

Sposito, G. (1984). *The surface chemistry of soils*. Oxford University Press; Clarendon Press, New York; Oxford.

Sposito, G. (1989). *The chemistry of soils*. Oxford University Press, New York.

Stengel, P. (1979). Utilisation de l'analyse des systèmes de porosité pour la caractérisation de l'état physique du sol in situ. *Annales Agronomiques*, 30, 27-49.

Stevenson, F. (1994). *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2e edn. Wiley, New York.

Sumner, M. (2000). *Handbook of soil science*. CRC Press, Boca Raton Fla.

T

Tarfa, M. (2011). Towards a metranscriptomic comparison of two alpine soils under contrasted snow cover.

Thioulouse, J., Chessel, D., Dole, S. & Olivier, J.M. (1997). ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and computing*, 7, 75-83.

Tisdall, J.M. & Oades, J.M. (1982). Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science*, 33, 141-163.

Tom-Petersen, A., Hansen, H. & Nybroe, O. (2004). Time and Moisture Effects on Total and Bioavailable Copper in Soil Water Extracts, 33, 505-512.

Tom-Petersen, A., Hosbond, C. & Nybroe, O. (2001). Identification of copper-induced genes in Pseudomonas fluorescens and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 38, 59-67.

Torkzaban, S., Bradford, S., Vangenuchten, M. & Walker, S. (2008). Colloid transport in unsaturated porous media: The role of water content and ionic strength on particle straining. *Journal of Contaminant Hydrology*, 96, 113-127.

Tournassat, C., Ferrage, E., Poinsignon, C. & Charlet, L. (2004). The titration of clay mineralsII. Structure-based model and implications for clay reactivity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273, 234-246.

Turchenek, L.W. & Oades, J.M. (1979). Fractionation of organo-mineral complexes by sedimentation and density techniques. *Geoderma*, 21, 311-343.

V

Vacapaulin, R., Estelleralberich, M., Lugodelafuente, J. & Zavaletamancera, H. (2006). Effect of sewage sludge or compost on the sorption and distribution of copper and cadmium in soil. *Waste Management*, 26, 71-81.

Virto, I., Barre, P. & Chenu, C. (2008). Microaggregation and organic matter storage at the silt-size scale. *Geoderma*, 146, 326-335.

Vollandtuduri, N. (2004). Direct analysis of microaggregates shrinkage for drying: Application to microaggregates from a Brasilian clayey Ferralsol. *Comptes Rendus Geosciences*, 336, 1017-1024.

W

Wakelin, S.A., Chu, G., Lardner, R., Liang, Y. & McLaughlin, M. (2010). A single application of Cu to field soil has long-term effects on bacterial community structure, diversity, and soil processes. *Pedobiologia*, 53, 149-158.

Weng, L., Vanriemsdijk, W. & Hiemstra, T. (2008). Cu2+ and Ca2+adsorption to goethite in the presence of fulvic acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72, 5857-5870.

Woese, C.R. & Fox, G. (1977). Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5088-5090.

Worms, I., Simon, D.F., Hassler, C.S. & Wilkinson, K.J. (2006). Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie*, 88, 1721-1731.

X

Xu, R. & Di Guida, O. (2003). Comparison of sizing small particles using different technologies. *Powder Technology*, 132, 145-153.

Xue, S., Zhao, Q., Wei, L. & Ren, N. (2009). Behavior and characteristics of dissolved organic matter during column studies of soil aquifer treatment. *Water Research*, 43, 499-507.

Y

Young, I.M. & Crawford, J.W. (2004). Interactions and Self-Organization in the Soil-Microbe Complex. *Science*, 304, 1634-1637.

Z

Zhang, P., Zheng, J., Pan, G., Zhang, X., Li, L. & Rolf, T. (2007). Changes in microbial community structure and function within particle size fractions of a paddy soil under different long-term fertilization treatments from the Tai Lake region, China. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58, 264-270.

Zhao, L., Schulin, R., Weng, L. & Nowack, B. (2007). Coupled mobilization of dissolved organic matter and metals (Cu and Zn) in soil columns. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 3407-3418.

Annexes

Annexe A : Distribution en taille des particules. _____ *215*

Annexe A-1 : Comparaison de la distribution de taille des particules (DTP) du sol de Clessé sous différent mode de gestion en matière organique. _____ **215**

Annexe A-2 Comparaison de la distribution en taille des particules entre les différents modes de gestion en matière organique. _____ **216**

Annexe B : Echantillonnage, préparation et contamination des sols _____ *218*

Annexe B-1 : Echantillonnage des sols sur la parcelle viticole de Clessé _____ **218**

Annexe B-2 : Contamination et incubation des sols en mésocosmes de laboratoire _____ **218**

Annexe C : Milieux de culture des bactéries _____ *219*

Annexe D : Méthode d'analyse des bactéries du sol de Clessé _____ *220*

Annexe D-1 : Enumération des bactéries cultivables hétérotrophes totales (B^{Tot}) et résistantes au cuivre (B^{Cu}) _____ **220**

Annexe D-2 : Séquençage de l'ADNr des bactéries cultivables _____ **220**

Annexe D-3 : Empreinte génétique des communautés bactériennes du sol de Clessé par ARISA _____ **221**

Annexes E : Distribution de la concentration totale en cuivre sur la parcelle viticole ___ *222*

Annexe F : Dynamique des communautés bactériennes dans les sols non fractionnés __ *223*

Annexe G Théorie des titrages acide-base des surfaces réactives du sol de Clessé _____ *224*

Annexe H : Modélisation de la réactivité aux protons des fractions granulométriques du sol de Clessé _____ *226*

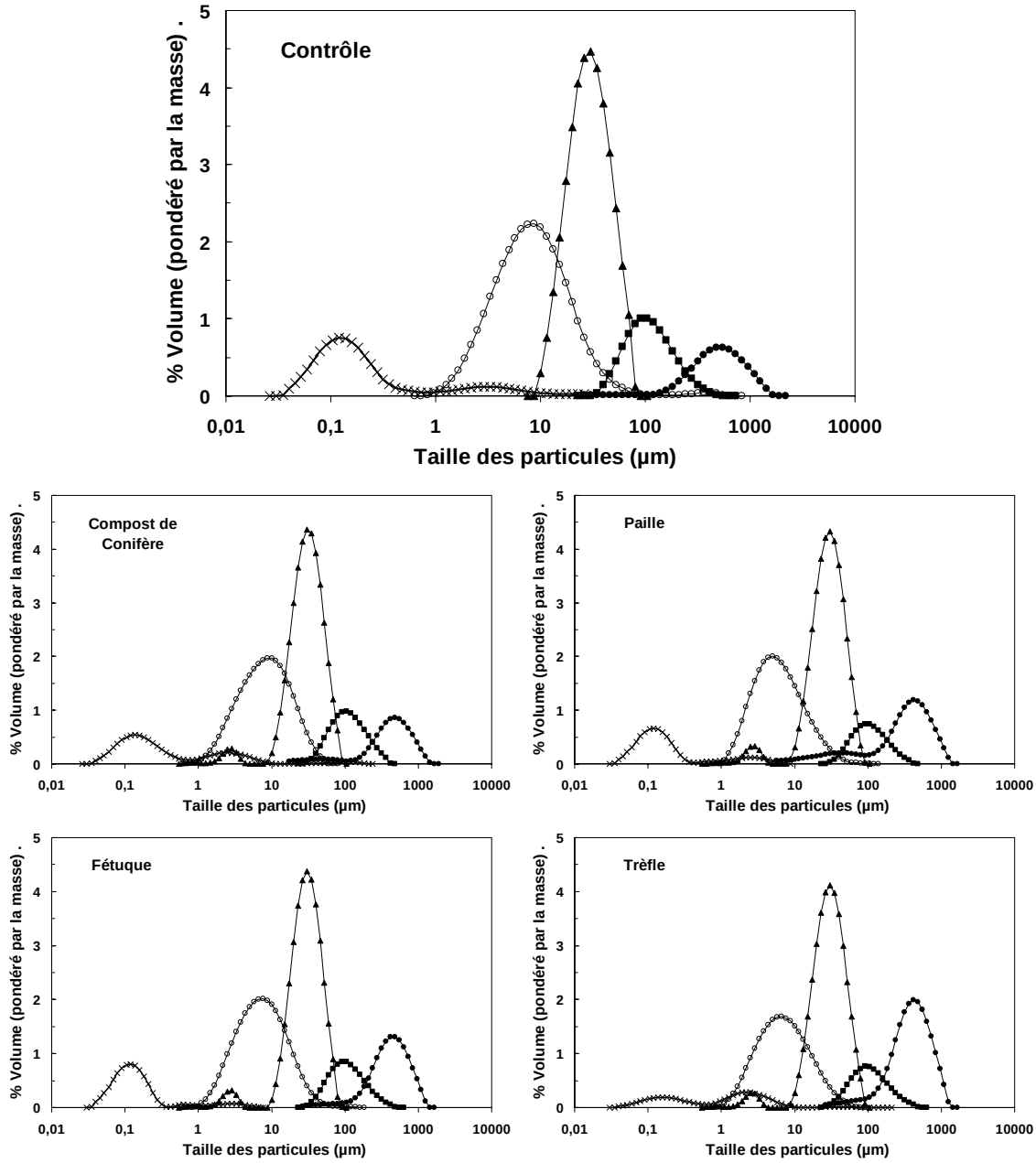
Annexe I : Modélisation de la concentration en cuivre échangeable dans les fractions granulométriques. (PhreeqC Interactive) _____ *228*

Annexe J : Modélisation du transfert du Cuivre (PhreeqC interactive) _____ *232*

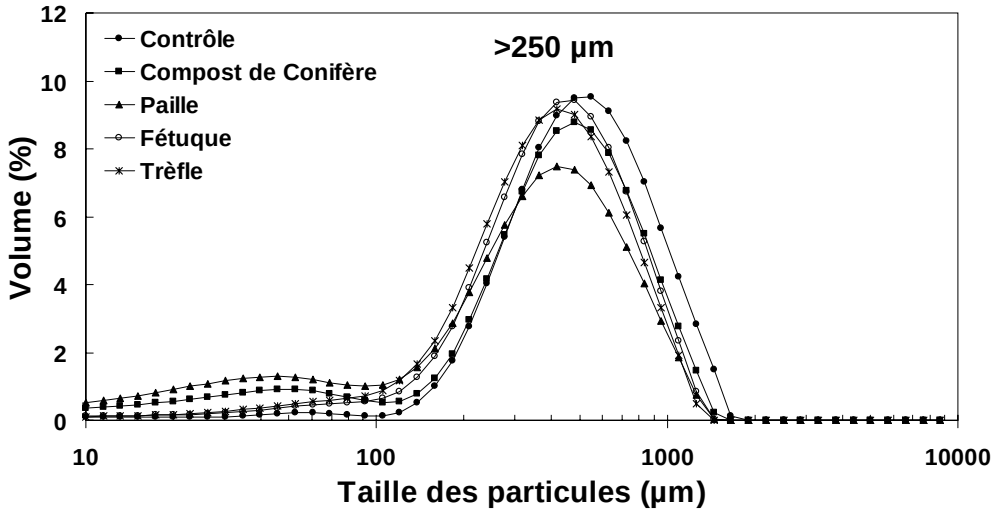
Annexe K : Concentrations ne cations majeurs normalisées dans les fractions granulométriques. _____ *235*

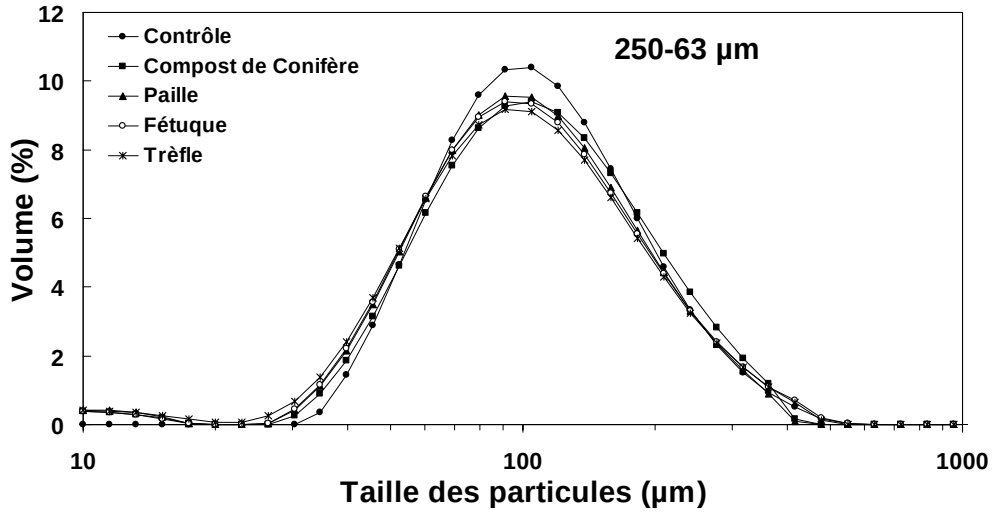
Annexe A : Distribution en taille des particules.

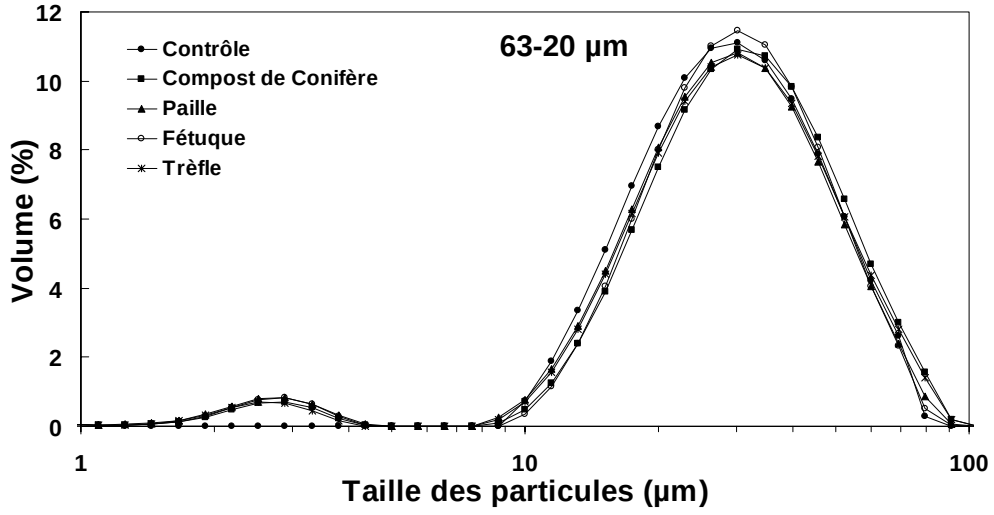
Annexe A-1 : Comparaison de la distribution de taille des particules (DTP) du sol de Clessé sous différent mode de gestion en matière organique.

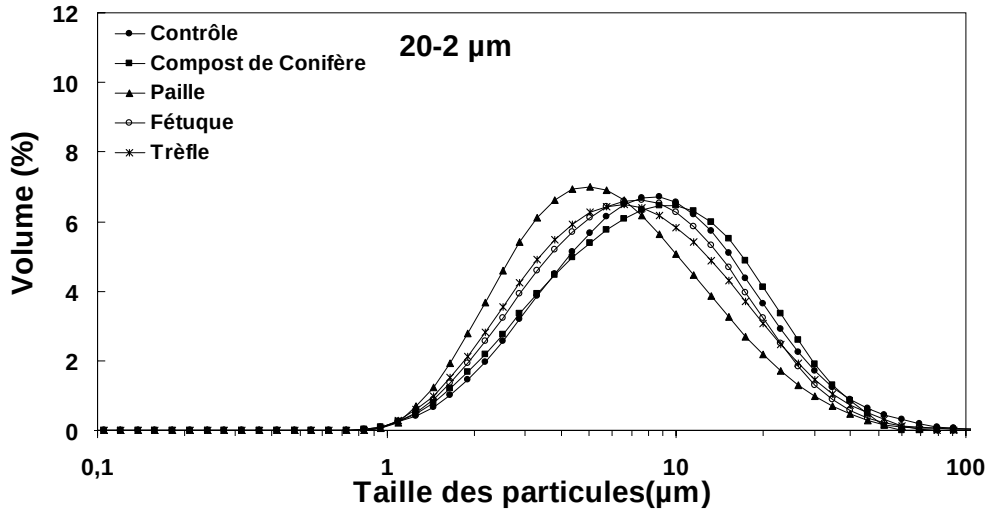


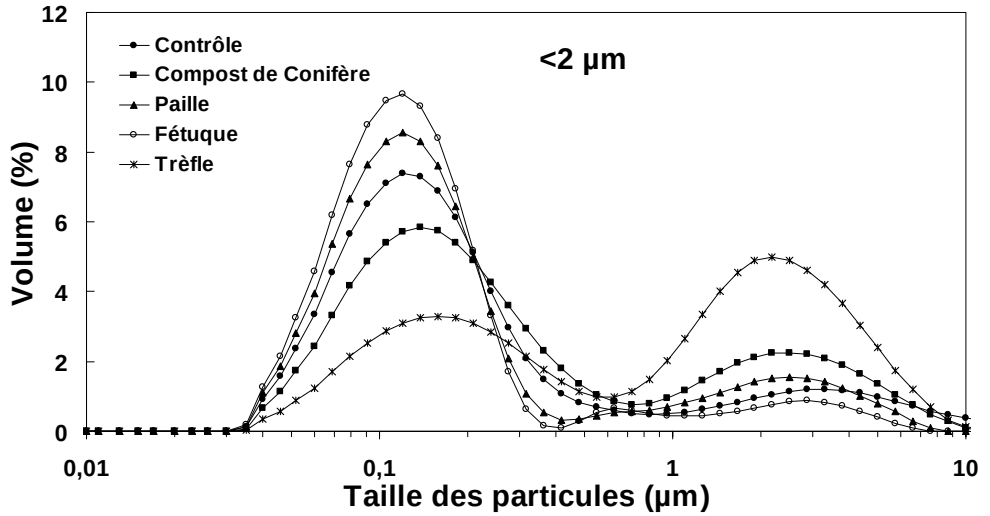
Annexe A-2 Comparaison de la distribution en taille des particules entre les différents modes de gestion en matière organique.








20-2 µm
Contrôle
Compost de Conifère
Paille
Fétuque
Trèfle
Volume (%)
0
2
4
6
8
10
12
0,1
1
10
100
Taille des particules(µm)


<2 µm
Contrôle
Compost de Conifère
Paille
Fétuque
Trèfle
Volume (%)
0
2
4
6
8
10
12
0,01
0,1
1
10
Taille des particules (µm)

Annexe B : Echantillonnage, préparation et contamination des sols

Annexe B-1 : Echantillonnage des sols sur la parcelle viticole de Clessé

1 : vue de la parcelle viticole de Clessé. 2 : Surface du sol d'une sous parcelle amendé en compost de conifère. 3 : Retrait des débris de la surface. 4 : Traçage du carré de prélèvement du sol. 5 : Prélèvement à la pelle des 5 premiers cm du sol. 6 : Vérification de la profondeur de prélèvement. 7 : Zone de prélèvement après extraction du sol. 8 : Quantité de sol prélevée sur la parcelle.

Annexe B-2 : Contamination et incubation des sols en mésocosmes de laboratoire

Séchage

Tamisage

Homogénéisation

Contamination

Annexe C : Milieux de culture des bactéries

Composition du milieu de culture LB (Luria – Bertani broth) :

Préparation pour 1 litre :

- bactotryptone (triptone) : 10g
- extrait de levure : 5g
- NaCl : 5g
- Eau déminéralisée : 1L
- Agar : 13g
- Ajuster le pH à 7
- Passer la solution à l'autoclave et couler dans les boite de pétri quand T = 50 °C. Il commence à se solidifier à 35°C.

Composition du milieu de culture YG-Cu :

Préparation pour 1 litre :

- Extrait de levure : 1g
- K_2HPO_4 : 0,3g
- KH_2PO_4 : 0,2g
- $MgSO_4$, $7H_2O$: 0,2g
- Agar : 15g
- Ajuster à pH 8 passer à l'autoclave et attendre T = 50°C
- Ajout des autres produits par filtration à 0.2µm
- Glucose : 1g
- $CuCl_2$: 4mL à 0,5 mol/L (concentration, final du milieu YG_Cu à 2 mmol/L)
- Cycloheximide (fongicide) : 4 mL réalisé en diluant 500mg dans 10mL d'éthanol (concentration final en YG_Cu égale à 200mg/L)

Le glucose, $CuCl_2$ et cycloheximide sont filtrés à 0,2µm.

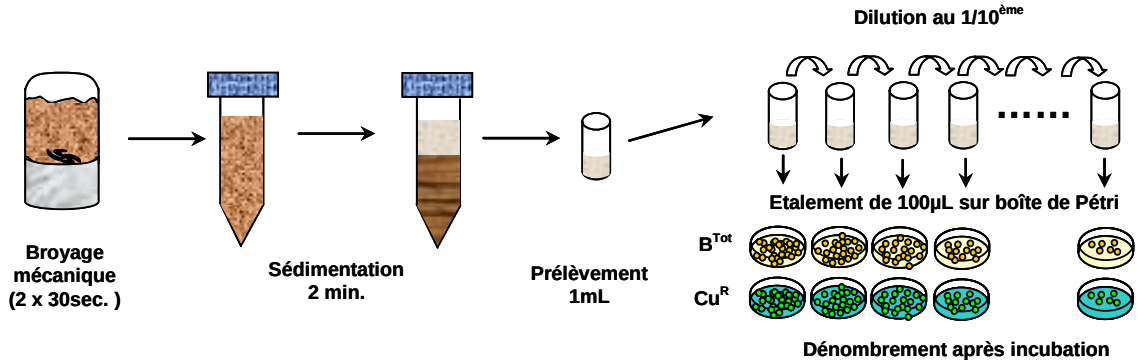
Composition du milieu de culture DMM :

Préparation pour 500mL :

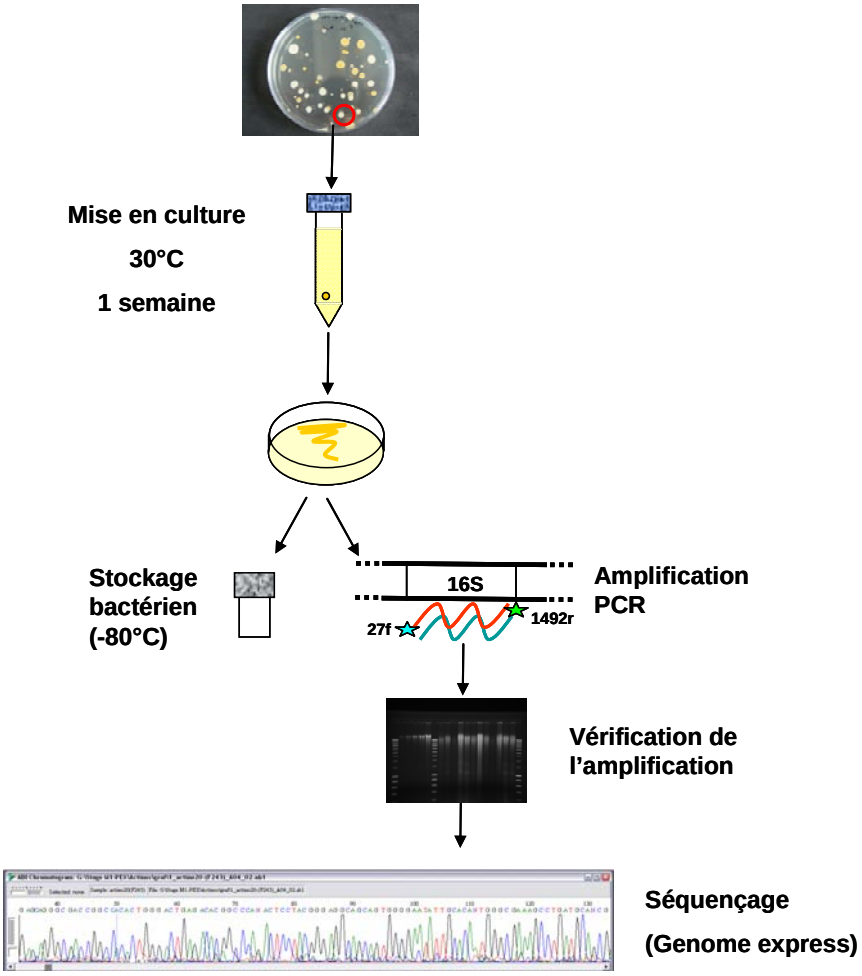
- $(NH_4)_2SO_4$ 0.5g
- $MgSO_4(7H_2O)$ 0.05g
- KPO_4 dibasique 3.5g
- KPO_4 monobasique 1.5g
- Citrate $Na(3H_2O)$ 0.25g
- Peptone Casein 1g
- Extrait de levure 1g
- Autoclave à 121°C pendant 20 minutes
- Ajout de 0.8% glucose au final

Annexe D : Méthode d'analyse des bactéries du sol de Clessé

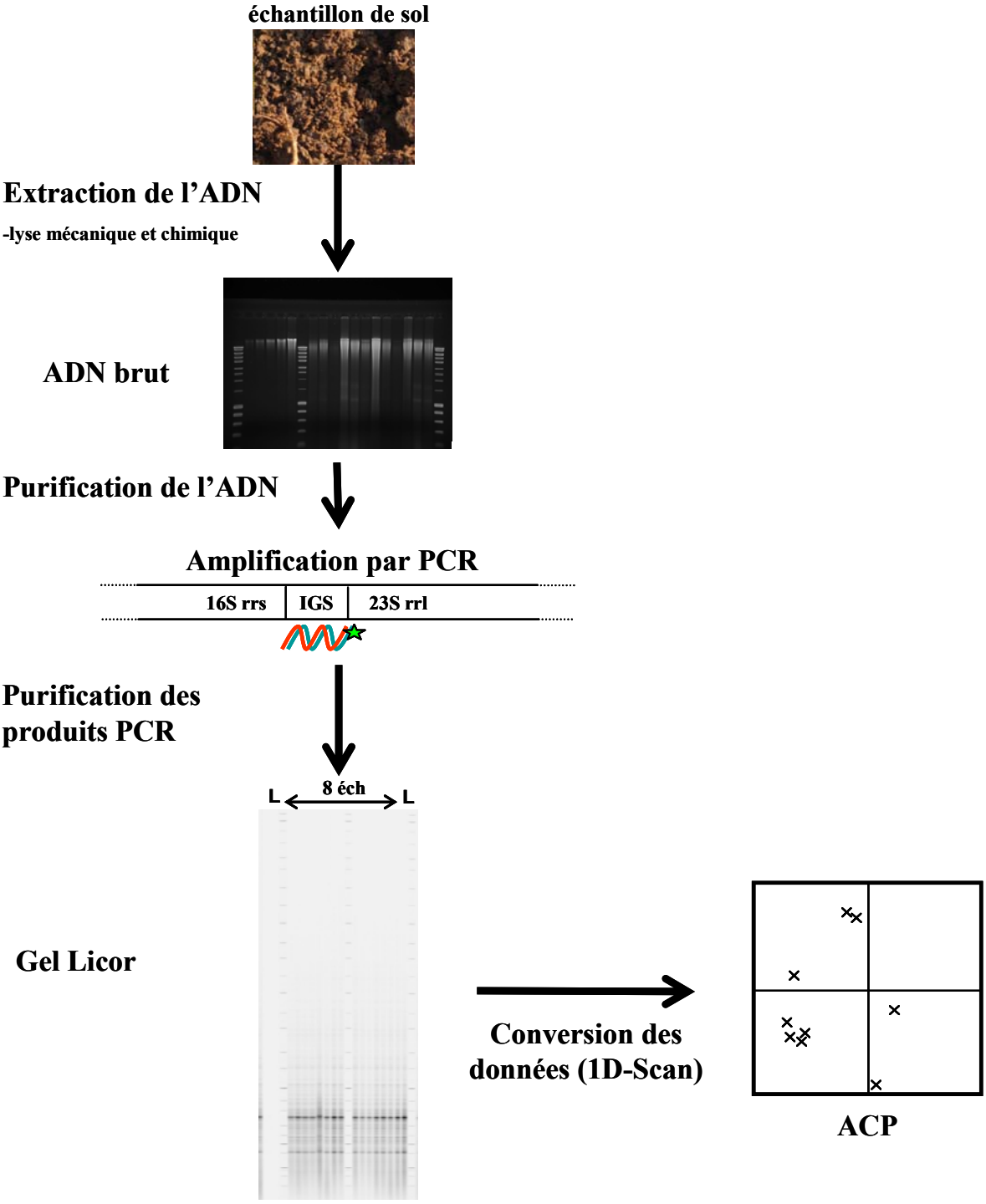
Annexe D-1 : Enumération des bactéries cultivables hétérotrophes totales (B^{Tot}) et résistantes au cuivre (B^{Cu})



Annexe D-2 : Séquençage de l'ADNr des bactéries cultivables

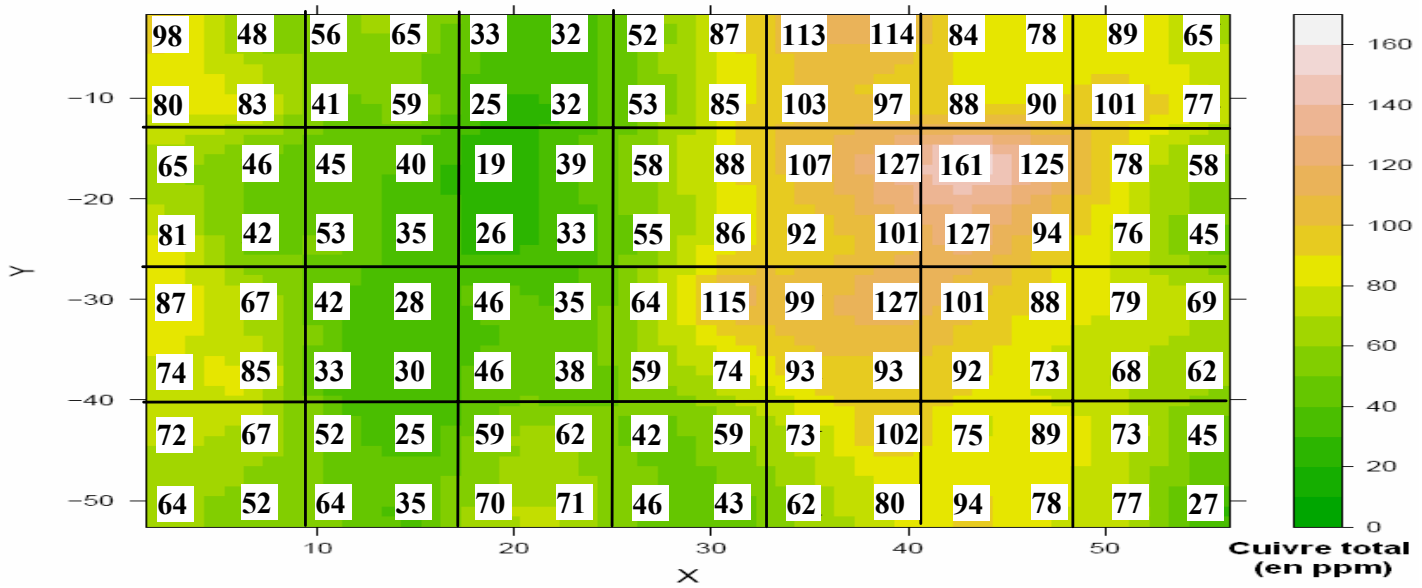


Annexe D-3 : Empreinte génétique des communautés bactériennes du sol de Clessé par ARISA



Annexes E : Distribution de la concentration totale en cuivre sur la parcelle viticole

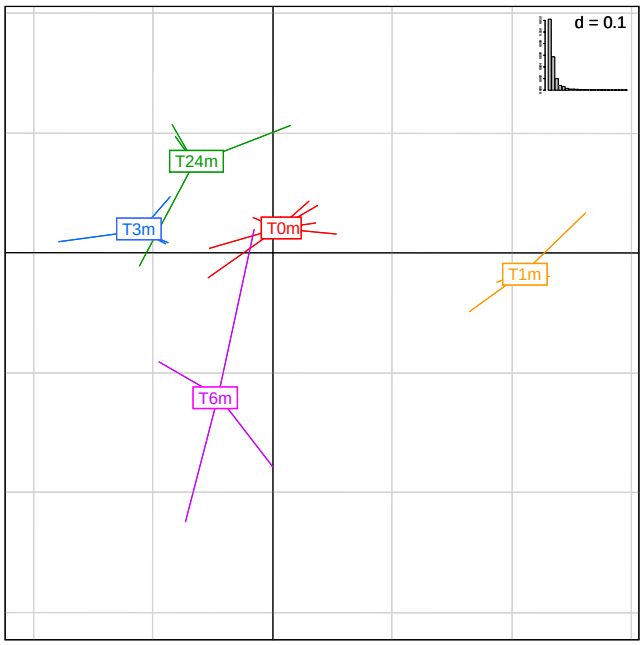
Chaque valeur correspond à la concentration totale en cuivre mesurée sur chaque prélèvement de la parcelle, ayant permis d'obtenir la cartographie de la répartition du cuivre sur la parcelle viticole de Clessé.



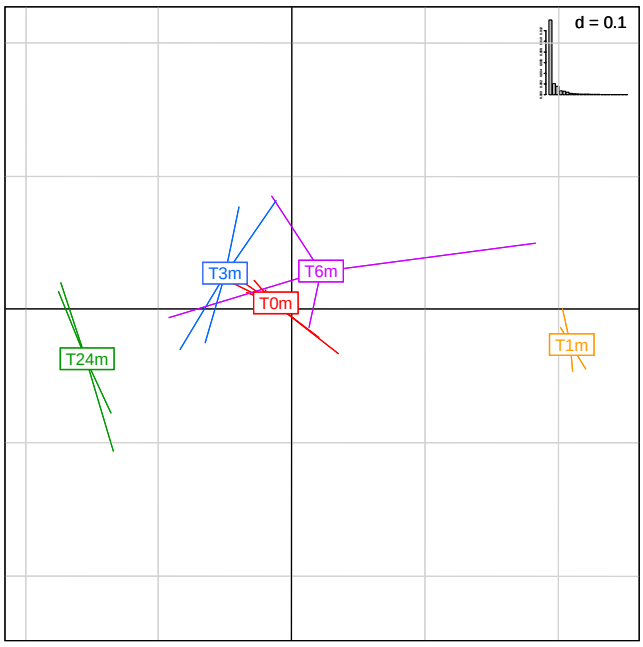
Annexe F : Dynamique des communautés bactériennes dans les sols non fractionnés

Les figures ci-dessous présentent les ACP de la dynamique des communautés bactériennes dans les sols non fractionnés non amendé (a) et amendé en compost de conifère (b). Les résultats d'empreinte génétique des sols non et contaminés sont regroupés pour calculer l'amplitude des modifications de la structure des communautés des bactériennes à l'aide des calculs de distance euclidienne (DE).

a



b



Annexe G Théorie des titrages acide-base des surfaces réactives du sol de Clessé

Les méthodes titrimétriques permettent d'évaluer la capacité d'échange de protons d'un composé en solution aqueuse. Outre les acides et bases sous formes liquide, d'autres particules sont susceptibles de relarguer des protons en solutions. En effet, ces composés réactifs peuvent être capables d'adsorber ou relarguer des protons en solutions, en fonction des variations de pH du milieu. Cette capacité d'échange de protons se quantifie aisément au laboratoire par des méthodes titrimétriques classique.

Par convention, on désignera [Hs] comme étant la concentration en protons mis en solution depuis la surface solide. Dans le processus chimique suivant :

$$\textit{Site}H \rightarrow H^+ + \textit{Site}^- \qquad \textbf{[Annexe-1]}$$

*Site*H désigne le site de surface protoné, et *Site*$^-$, le même déprotoné, H^+ désigne le proton provenant de la surface *Site*H ayant été mis en solution, désigné par la suite comme Hs. Dans la réaction suivante :

$$SiteH \leftrightarrow H^+ + Site^- \quad ; \log K \qquad \textbf{[Annexe-2]}$$

Les *Site*H et *Site*$^-$ désignent les activités des deux types de sites, et H+ désigne l'activité des protons en solution.

Un site est considéré comme une unité structurale pouvant s'associer à un proton, par exemple : un groupe carboxyle d'un composé organique, ou un hydroxyle d'un oxyde.

La concentration en proton de la surface libérée en solution [Hs] peut être quantifiée par un calcul de bilan de masse des protons. La concentration en [Hs] apparaît alors comme un excès de protons par rapport à la concentration initiale d'acides, et des acides et bases fortes ajoutés au réacteur au cours du titrage. Dans un titrage acide-base on mesure donc une différence de concentrations de protons, ce qui requiert une bonne précision analytique. Dans notre cas, le bilan des protons est donné par l'équation suivante :

$$[H^+] = [H°] - [B] + [OH^-] + [Hs] \qquad \textbf{[Annexe-3]}$$

Avec :

- $[H^+]$: la concentration des protons en solution, mesurée à l'aide d'une électrode pH combinée.
- [H°] : la concentration d'acide fort présent dans le réacteur au début du titrage (ajouté pour atteindre un pH de consigne pour le démarrage du titrage). Sa concentration, est précisément connue du fait de l'utilisation de solutions acides standardisées (Fixanal titrisol).
- [B] : la concentration précise de base ajoutée au réacteur. Au cours d'un titrage un ion OH^- ajouté par la burette neutralise un ion H^+, d'où le signe négatif devant [B].

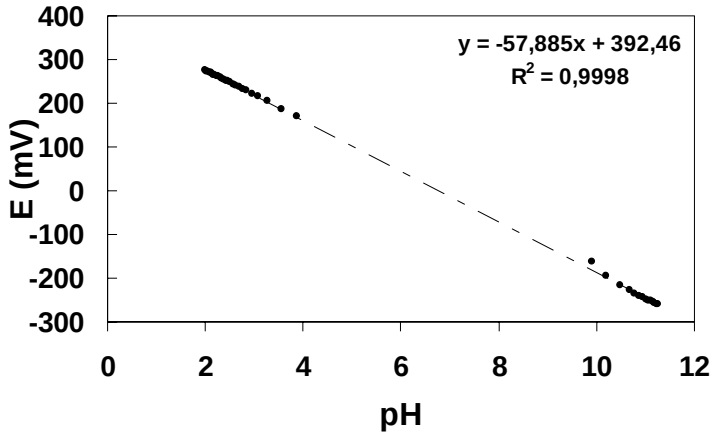
- $[OH^-]$ la concentration en ions OH^- dans le réacteur, générée par autodissociation des molécules d'eau. La nécessité de considérer la concentration en OH^- s'illustre par le fait que le bilan de protons d'une solution d'eau pure s'écrit comme suit : $[H^+] = [OH^-]$. Sa concentration est égale à $K_w^{FI} / [H^+]$, avec K_w^{FI} le produit ionique de l'eau à la force ionique (FI) du milieu.
- [Hs] : la concentration des protons libérés de la surface vers la solution. On quantifiera ce terme par la différence à tous les autres termes connus.

Les titrages ont été acquis en conditions standard, 20 ±2 °C, une pression atmosphérique de 1 bar, et en absence de gaz atmosphérique CO_2 interférant dans le bilan des protons grâce au bullage d'azote dans le réacteur. Les titrages ont été faits à force ionique constante (FI = 0.1 M NaNO3) ce qui permet de fixer les coefficients d'activité, et également de calibrer l'électrode pH précisément en concentration (Guiné et al. 2006), selon l'équation suivante :

$$E = E^{o\prime} + k \log [H^+] \quad \text{et} \quad E^{\circ\prime} = E^\circ + k \log \gamma_H \qquad \textbf{[Annexe-4]}$$

Avec :

- E (mV) le potentiel de l'électrode pH, lu sur le pH-mètre,
- E^O et k le potentiel standard et le facteur de Nernst (Sigg et al. 2001) et E'^O le potentiel standard corrigé obtenu par régression linéaire sur des données E en fonction du pH.



Exemple de droite de calibration de l'électrode pH.

Annexe H : Modélisation de la réactivité aux protons des fractions granulométriques du sol de Clessé

Modélisation de la réactivité des fractions granulométriques à partir de 3 substrats réactifs : la matière organique (MO), les argiles, et les autres composés du sol (Res).

Paramètres de la modélisation :

- Molécule unitaire de la MO :
  - Formule chimique :$C_{12}H_{16}O_8$
  - Masse molaire : 288 $g.mol^{-1}$
  - Nombre de site par gramme de carbone : 6.94 $mmol_{site}.g^{-1}_{C}$
- Facteur de pondération de la concentration en Al : 200000
- Facteur de correction lié à la phase résiduel : 0.0045.

HsC_{calc} = 6.94/(COT/1000)
$HsAl_{calc}$ = ([Al]*200000)*1000

Sol	Fraction	$\Delta Hs_{4\text{-}10}$ (Hs_{exp})	[Al]	COT	HsC_{calc}*	$HsAl_{calc}$*	$HsRes_{calc}$*	$Hs(C+Al+Res)_{calc}$*
	µm	mmol g^{-1}	mg.g^{-1}	$mg_C.g^{-1}_{ss}$	mmol g^{-1}	mmol g^{-1}	mmol g^{-1}	mmol g^{-1}
Contrôle (NA)	>250	0,254	9,9	34,7	0,241 (95%)	0,049 (19%)	0,045 (18%)	0,335 (132%)
	250-63	0,285	16,3	23,6	0,164 (57%)	0,081 (29%)	0,045 (16%)	0,290 (102%)
	63-20	0,080	4,0	3,0	0,021 (26%)	0,020 (25%)	0,045 (57%)	0,086 (108%)
	20-2	0,217	18,9	19,0	0,132 (61%)	0,094 (43%)	0,045 (21%)	0,271 (125%)
	<2	0,410	43,5	15,3	0,106 (26%)	0,217 (53%)	0,045 (11%)	0,369 (90%)
	ST	0,176	20	15,3	0,106 (60%)	0,100 (50%)	0,045 (26%)	0,240 (136%)
Amendé (CC)	>250	0,393	7,6	107,6	0,747 (190%)	0,038 (10%)	0,045 (11%)	0,830 (211%)
	250-63	0,370	8,8	51,1	0,355 (96%)	0,044 (12%)	0,045 (12%)	0,444 (120%)
	63-20	0,103	3,5	5,0	0,035 (34%)	0,017 (17%)	0,045 (44%)	0,097 (94%)
	20-2	0,269	17,8	22,8	0,158 (59%)	0,089 (33%)	0,045 (17%)	0,292 (109%)
	<2	0,394	40,5	21,0	0,146 (37%)	0,202 (51%)	0,045 (11%)	0,393 (100%)
	ST	0,213	20	30	0,208 (98%)	0,100 (37%)	0,045 (21%)	0,332 (156%)

*La valeur entre parathèse correspond au pourcentage de la réactivité du substrat par rapport à la réactivité total expérimentale de la fractions : HsC_{calc}/Hs_{exp} $HsAl_{calc}$ / Hs_{exp} $HsRes_{calc}/Hst_{exp}Hs(C+Al+Res)_{calc}/Hs$

Annexe I : Modélisation de la concentration en cuivre échangeable dans les fractions granulométriques. (PhreeqC Interactive)

Exemple du script de la modélisation de la concentration en cuivre échangeable à T0 mois d'incubation.

```
PHASES
Fix-pH ; H+ = H+ ; log_k 0
user_graph ;
 -chart_title "Fraction speciation calculation"
 -axis_titles "Fraction" "Log Conc. mol/l"
 -axis_scale x_axis 1 24
 -axis_scale y_axis 0 0.01
 -head Fraction Sx- Sy- Sz- SxCu+ SyCu+ SzCu+ SxCa+ SyCa+ SzCa+2 Ca++ Cu++ pH
-start ;  10 graph_x  "Fraction"
  15 graph_y mol("Sx-"), mol("Sy-"), mol("Sz-"), mol("CuSx+"), mol("CuSy+"), mol("CuSz+"), mol("CaSx+"), mol("CaSy+"), mol("CaSz+"), mol("Ca+2"), mol("Cu+2"), -LA("H+")
End

SOLUTION_MASTER_SPECIES
Sx       Sx-    0.0    C 12.0111
Sy       Sy-    0.0    C 12.0111
Sz       Sz-    0.0    C 12.0111

SOLUTION_SPECIES       # constante pour les sols non contaminés en laboratoire
Sx- = Sx- ;  log_k 0   # Site Carbone
Sy- = Sy- ; log_k 0    # Site Argile
Sz- = Sz- ; log_k 0    # Site Résiduel

Sx- + H+ = SxH ; log_k 5.097  #constante de protonation du malate
Sx- + 2H+ = SxH2+ ; log_k 8.556 #deuxième cste de protonation du malate

Sy- + H+ = SyH ; log_k 5.097  #constante de protonation du malate
Sy- + 2H+ = SyH2+ ; log_k 8.556 #deuxième cste de protonation du malate

Sz- + H+ = SzH ; log_k 5.097  #constante de protonation du malate
Sz- + 2H+ = SzH2+ ; log_k 8.556 #deuxième cste de protonation du malate
Cu+2 + Sx- = CuSx+ ;     log_k   5.83  #  5.53 malate cste
Ca+2 + Sx- = CaSx+ ;    log_k    2.72   # 2.72 malate cste
```

Cu+2 + Sy- = CuSy+ ; log_k **4.83** # 4.53 malate cste
Ca+2 + Sy- = CaSy+ ; log_k 2.72 # 2.72 malate cste

Cu+2 + Sz- = CuSz+ ; log_k **5.83** # 5.53 malate cste
Ca+2 + Sz- = CaSz+ ; log_k 2.72 # 2.72 malate cste

 # Sol NATW
solution 1 ; Sx 5.2 ; Sy 3.7 ; Sz 3.4 ; Cu(+2) 0.11 ; pH 7.6; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.6 HNO3 ; end **# > 250 µm** #Sx= 15.5

solution 1 ; Sx 12.3 ; Sy 7.1 ; Sz 3.9 ; Cu(+2) 0.17 ; pH 7.55; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.4 HNO3 ; end **# 250à63 µm**

solution 1 ; Sx 4.9 ; Sy 5.5 ; Sz 12.4 ; Cu(+2) 0.13 ; pH 7.3; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.1 HNO3 ; end **# 63à20 µm**

solution 1 ; Sx 28.3 ; Sy 23.6 ; Sz 11.3 ; Cu(+2) 0.36 ; pH 7.4; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.25 HNO3 ; end **# 20à2 µm**

solution 1 ; Sx 5.7 ; Sy 13.6 ; Sz 2.8 ; Cu(+2) 0.12 ; pH 7.5; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.05 HNO3 ; end **# <2 µm**

SOLUTION_SPECIES

Cu+2 + Sx- = CuSx+ ; log_k **5.53** # 5.53 malate cste
Ca+2 + Sx- = CaSx+ ; log_k 2.72 # 2.72 malate cste

Cu+2 + Sy- = CuSy+ ; log_k **4.53** # 5.53 malate cste
Ca+2 + Sy- = CaSy+ ; log_k 2.72 # 2.72 malate cste

Cu+2 + Sz- = CuSz+ ; log_k **5.53** # 5.53 malate
Ca+2 + Sz- = CaSz+ ; log_k 2.72 # 2.72 malate cste

 # Sol CCTW
solution 1 ; Sx 16.0 ; Sy 2.9 ; Sz 3.4 ; Cu(+2) 0.15 ; pH 7.5; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.4 HNO3 ; end **# > 250 µm** #valeur Sx=48

solution 1 ; Sx 26.6 ; Sy 3.8 ; Sz 3.9 ; Cu(+2) 0.15 ; pH 7.5; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.3 HNO3 ; end **# 250à63 µm**
solution 1 ; Sx 8.2 ; Sy 4.8 ; Sz 12.4 ; Cu(+2) 0.09 ; pH 7.3; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.05 HNO3 ; end **# 63à20 µm**

solution 1 ; Sx 33.9 ; Sy 22.3 ; Sz 11.3 ; Cu(+2) 0.39 ; pH 7.2; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.2 HNO3 ; end **# 20à2 µm**

solution 1 ; Sx 7..8 ; Sy 12.6 ; Sz 2.8 ; Cu(+2) 0.11 ; pH 7.2; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.0 HNO3 ; end **# <2 µm**

SOLUTION_SPECIES #constante pour les sols contaminés T0
Cu+2 + Sx- = CuSx+ ; log_k **5.53**
Ca+2 + Sx- = CaSx+ ; log_k 2.72

Cu+2 + Sy- = CuSy+ ; log_k **4.53**
Ca+2 + Sy- = CaSy+ ; log_k 2.72

Cu+2 + Sz- = CuSz+ ; log_k **5.53**
Ca+2 + Sz- = CaSz+ ; log_k 2.72

 # Sol NACuAc
solution 1 ; Sx 5.2 ; Sy 3.7 ; Sz 3.4 ; Cu(+2) 0.41 ; pH 7.6; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.5 HNO3 ; end **# > 250 µm** #Sx= 15.5

solution 1 ; Sx 12.3 ; Sy 7.1 ; Sz 3.9 ; Cu(+2) 0.56 ; pH 7.6; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.35 HNO3 ; end **# 250à63 µm**

solution 1 ; Sx 4.9 ; Sy 5.5 ; Sz 12.4 ; Cu(+2) 0.50 ; pH 7.2; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.0 HNO3 ; end **# 63à20 µm**

solution 1 ; Sx 28.3 ; Sy 23.6 ; Sz 11.3 ; Cu(+2) 1.87 ; pH 7.2; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.2 HNO3 ; end **# 20à2 µm**

solution 1 ; Sx 5.7 ; Sy 13.6 ; Sz 2.8 ; Cu(+2) 0.57 ; pH 7.5; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.0 HNO3 ; end **# <2 µm**

SOLUTION_SPECIES
Cu+2 + Sx- = CuSx+ ; log_k **5.53** # 4.53 malate cste
Ca+2 + Sx- = CaSx+ ; log_k 2.72 # 2.72 malate cste

Cu+2 + Sy- = CuSy+ ; log_k **4.53** # 4.53 malate cste
Ca+2 + Sy- = CaSy+ ; log_k 2.72 # 2.72 malate cste

Cu+2 + Sz- = CuSz+ ; log_k **5.53** # 4.53 malate cste
Ca+2 + Sz- = CaSz+ ; log_k 2.72 # 2.72 malate cste

 # Sol CCCuAc

solution 1 ; Sx 16.0 ; Sy 2.9 ; Sz 3.4 ; Cu(+2) 0.52 ; pH 7.1; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.3 HNO3 ; end **# > 250 µm** #valeur Sx=48

solution 1 ; Sx 26.6 ; Sy 3.8 ; Sz 3.9 ; Cu(+2) 0.73 ; pH 7.25; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.1 HNO3 ; end **# 250à63 µm**

solution 1 ; Sx 8.2 ; Sy 4.8 ; Sz 12.4 ; Cu(+2) 0.47 ; pH 6.9; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -5.9 HNO3 ; end **# 63à20 µm**

solution 1 ; Sx 33.9 ; Sy 22.3 ; Sz 11.3 ; Cu(+2) 1.84 ; pH 7.1; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -6.0 HNO3 ; end **# 20à2 µm**

solution 1 ; Sx 7.8 ; Sy 12.6 ; Sz 2.8 ; Cu(+2) 0.45 ; pH 7.2; reaction ; Ca(NO3)2 ; 0.14 ; equilibrium_phases ; Fix-pH -5.8 HNO3 ; end **# <2 µm**

Annexe J : Modélisation du transfert du Cuivre (PhreeqC interactive)

Exemple d'un Script PhreeqC de la modélisation de la concentration en carbone organique dissous et en cuivre lessivé, pour le sol NA, car les deux script sont similaires seule les constantes diffèrent.

#Colonnes Aline NA soil

#Lessivage de Cu++ et MO particulaire et dissoute.

#Analyses en sortie de colonnes : [Cu++], COD, bactéries cultivables, pH,

#Analyses solide : COT, Cutot, CEC argiles,

```
SOLUTION_MASTER_SPECIES
 #Element   species    Alk    gfw       gfw_of_element
     Ms       Ms-1       0   121.14    121.14    # Mobile site creation

SURFACE_MASTER_SPECIES
Ss_m          Ss_m        #Surface site for mobile site attachment : creation
Ss_h          Ss_h        #Surface site for H and Cu attachment    : creation

SOLUTION_SPECIES
   Ms-1     = Ms-1  ; log_k  0              # Mobile site definition
   Ms-1 + H+ = MsH   ; log_k  4.7           # Mobile site exchanges a proton
   Ms-1 + Cu+2   = MsCu+ ; log_k   7        # Mobile site complexes copper   #CC21j=7

SURFACE_SPECIES

Ss_m = Ss_m                  ; log_k  0.0 #Definition of the Surface site fixing the mobile sites
Ss_m + Ms-1= Ss_mMs-1  ; log_k  4.05    # Surface site attaches mobile site
Ss_m + Ms-1 + H+= Ss_mMsH   ; log_k  8.75    # the attache mobile site exchanges a proton
        # this logK equals logK(MsH) + logK(SX) = 4.7 + 4.05 = 8.75 to keep the same
        microscopic affinity on bound and free COT
Ss_m + Ms-1 + Cu+2=Ss_mMsCu+; log_k 11.05  # the attached mobile site complexes a
copper ion
        # this logK equals logK(MsCu) + logK(SX) = 7.0 + 4.05 = 11.05 to keep the same
        microscopic affinity on bound and free COT


Ss_h=Ss_h                ; log_k  0  #Definition of the  Surface site fixing H+ and Cu++
Ss_h + H+ = Ss_hH+ ; log_k  4.7          #(Cu,H)-Surface site exchanges a proton
Ss_h + Cu+2   = Ss_hCu+2   ; log_k 7.55 #(Cu,H)-Surface site complexes Cu
        #7.35/7.40/7.55/7.55=NA0_7_21/180/360/720j 7=NA
```

```
############# Simulation 1 ####################

SOLUTION 1-10 # Define initial solution in the column before flushing
units mmol/kgw
pH       3.2 #charge
C(4) 1  CO2(g) -3.5 1
Cu(+2) 11   # 11 mmol=340µg/g/10 la charge totale, 11=100% (21j), et 5.5=64% (720j): ,
Ms    0.60 #=NA 0.8=CC   # Concentration totale des sites mobiles, valeur arbitraire
end

Solution 0
pH       7 charge
C(4) 1  CO2(g) -3.5 1
end


SURFACE 1-10  # Surface adsorption in column cells
#Densité de site : 1.5% MO massique, estimé 3 mmol/g de densité de site: 15 g/1000g * 3 mmol/g = 45 mmol/kg
# porosité 0.35 (Veau/Vtot); masse volumique apparente 1.35  kg/L
# 45 mmol/kg x 1.35 kg/L / 0.35 = 174 mmol/L
# -equilibrate with solution 1 ;
 -no_edl
Ss_m     0.0013 ; -no_edl  # valeur arbitraire
Ss_h    0.097 ; -no_edl  # 0.097 pour NA Valeur calculée 0.24
END

END  # prevent from selecting out (in file) the solution composition

TRANSPORT   #  Flush column with bidistilled water prior entering metals
        -cells    10
        -shifts  250 # 30
        -time_step  319
        -flow_direction   forward
        -boundary_conditions    flux  flux
        -lengths  10*0.0108
        -dispersivities  10*0.0008
        -correct_disp  true
#     -diffusion_coefficient   0.144 # unit m2/s  = 0.4 cm2/h
        -stagnant 0
        -warnings true
        -punch_cells 10
```

```
        -print_cells 10

SELECTED_OUTPUT
        -file   out.sel
        -selected_out     true
        -high_precision   false
        -reset  false
        -solution  true
        -distance  true
        -time true
        -step true
        -pH true
        -alkalinity false
#Colloïdes  en solution   MOD en solution          colloïde attaché              MOD
attaché             Site de surface
#-molalities  Ms-   MsH MsCu+  Dc-   DcH   DcCu+   Ss_mMs-   Ss_mMsH
Ss_mMsCu+          Ss_dDc-    Ss_dDcH    Ss_dDcCu+  Ss_h   Ss_hH+   Ss_hCu+2
Cu+2
        -molalities  Cu+2
          -totals Ms Cu
END
```

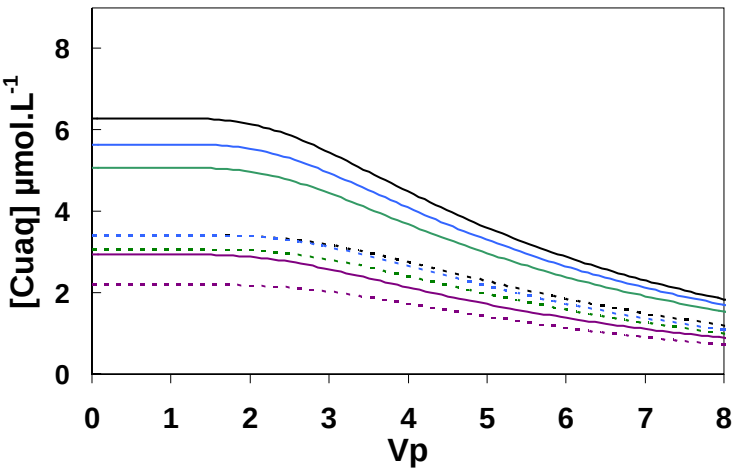


Figure : Courbes de la modélisation de la concentration en cuivre lessivé dans le sol de Clessé non amendé (NA, trait pointillé) et amendé en compost de conifère (CC, trait plein) au cours des deux d'incubation. T0m : noir, T1m : bleu, T7m : vert, T24m : violet.

Annexe K : Concentrations ne cations majeurs normalisées dans les fractions granulométriques.

Tableau du pourcentage de la concentration en cations majeurs normalisée dans les fractions granulométriques (>250, 250-63, 63-20, 20-2 et <2 µm) du sol de Clessé amendé en compost de conifère (CC) ou non (NA)

Sol	Fractions	Concentration en éléments (%)							
	µm	Fe	Mn	Al	Ca	Mg	K	Na	Cu
Contrôle (NA)	>250	30,1	63,7	10,7	38,0	10,0	9,2	14,1	33,7
	250-63	14,4	15,5	17,6	23,6	18,9	18,8	21,1	30,1
	63-20	4,2	2,7	4,3	3,2	5,5	4,4	1,4	2,4
	20-2	17,3	8,6	20,4	13,8	25,3	21,3	21,1	15,7
	<2	34,0	9,5	47,0	21,4	40,2	46,3	42,3	18,1
Compost de Conifère (CC)	>250	21,8	62,0	9,8	35,3	12,6	8,6	16,7	37,7
	250-63	14,2	16,0	11,2	23,4	11,0	10,8	16,7	24,6
	63-20	4,9	3,4	4,4	4,3	6,1	4,5	n.d.	2,9
	20-2	19,4	8,9	22,8	16,1	26,2	24,3	16,7	17,4
	<2	39,7	9,8	51,8	21,0	44,1	51,8	50,0	17,4