

Cultures de demain, sans labour et sans glyphosate !

Par Baudelle E., Bultel R., Dangu T., Haquette H., Villette J. (étudiants en BTSA ANABIOTEC)
Becaert E (responsable laboratoire)

Mots-clés : Glyphosate, AMPA, nitrates, bougie poreuse, chromatographie liquide haute performance, chromatographie ionique, qualité de l'eau et du sol.

Introduction

L'exploitation agricole du lycée « Le Paraclet » vise une agriculture durable et respectueuse de l'environnement. Elle s'est engagée dans un projet CASDAR (compte d'affectation spécial développement agricole et rural) qui permet de financer des actions dans la transition agro-écologique de l'agriculture française. Dans ce cadre, elle participe avec d'autres exploitations agricoles de la région au développement de l'agriculture de conservation. Elle expérimente, entre autres, la mise en place des cultures sans labour, avec semis directs sous couvert végétal vivant, ou encore sans utilisation de produit phytosanitaire.

La destruction est une étape importante. C'est un compromis entre le développement optimal du couvert pour piéger les nitrates et couvrir le sol et éviter que le couvert ne perturbe, voire pénalise la culture suivante. Elle peut se réaliser chimiquement à l'aide de produits phytosanitaires comme le glyphosate, ou mécaniquement par labour ou sans labour. Dans ce dernier cas, différentes techniques peuvent être utilisées comme le broyage qui réduit le volume de végétation et laisse la totalité des résidus sur le sol ou l'utilisation de rouleau FACA qui couche et blesse le couvert végétal sans remuer le sol.

Des parcelles expérimentales de l'exploitation agricole du Paraclet sont ainsi mises à disposition (5 000 m²) et soumises à différents traitements de destruction du

couvert végétal : utilisation du glyphosate ou d'acide pélargonique (BELUCA), utilisation d'un rouleau écraseur (rouleau FACA) ou d'un broyeur mécanique, aucune destruction du couvert végétal.

Dans le cadre de ce projet, les étudiants en BTSA ANABIOTEC ont été sollicités pour suivre la rémanence du glyphosate et de son métabolite l'AMPA (l'acide aminométhyl-phosphonique). En effet, certaines études ont montré que le glyphosate et l'AMPA pouvaient rester dans le sol de nombreuses années après la dernière pulvérisation (1). Ils seraient retenus dans le sol de manière différente selon la composition et la capacité d'échanges cationiques (CEC) du sol. De plus une étude récente a montré que le glyphosate serait retenu de manière plus importante dans les sols labourés de manière conventionnelle comparé à des sols non labourés (2).

Parallèlement, le chef d'exploitation était intéressé par le suivi de la teneur en nitrates dans le sol des parcelles expérimentales. La demande en azote des plantes est importante et l'azote peut devenir un facteur limitant pour les cultures. On procède généralement à la fertilisation, par apport de nitrate sous forme d'engrais ou de lisier. Cependant cette dernière est souvent surdimensionnée, ce qui engendre une fuite importante de nitrate par lixiviation vers les nappes phréatiques. Or les nitrates présents dans l'eau à forte concentration peuvent engendrer une toxicité sur la faune et la flore et nuire à la biodiversité. Afin de limiter ce phénomène de lixiviation et mieux gérer les intrants, l'exploitation agricole du

lycée utilise des CIPAN (cultures intermédiaires, piège à nitrates) pour les couverts inter-cultures. Les CIPAN absorbent une grande partie de l'azote présent dans le sol après la récolte et produit par minéralisation estivale et automnale. Cet azote prélevé par les plantes ne sera pas lessivé vers les nappes d'eau souterraines pendant l'hiver et sera restitué en partie à la culture suivante. L'analyse des nitrates dans les parcelles permet de vérifier si le lessivage des nitrates est moins important sur les parcelles avec semis sous couvert végétal vivant. Elle peut également être un bon indicateur pour optimiser la fertilisation.

D'autres formations interviennent dans ce projet, les BTSA APV (Agronomie et Productions Végétales) pour la mise en œuvre des différentes parcelles expérimentales et les BTSA GEMEAU (Gestion et Maitrise de l'Eau) pour la mise en place de points de prélèvement de l'eau dans le sol à des fins d'analyses.

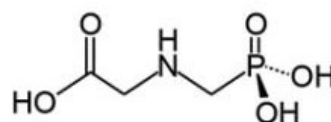
L'objectif du projet expérimental M58 est la **mise en place des méthodes** d'analyse afin d'étudier l'évolution du glyphosate et de son produit de dégradation, l'AMPA, ainsi que la teneur en nitrate dans les sols en fonction de la destruction des couverts végétaux pendant toute la durée de l'expérimentation (5 ans).

Choix de la méthode de dosage du glyphosate et de l'AMPA

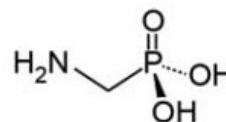
Depuis sa première introduction sur le marché en 1974, le glyphosate (N-phosphonométhyl glycine), herbicide systémique à large spectre, est le composé phytosanitaire le plus utilisé dans le monde. Sa popularité est liée à son efficacité agronomique et son coût faible. Modérément persistant dans le sol, $\frac{1}{2}$ vie de

20 à 100 jours, il subit une dégradation microbienne qui le métabolise au final en dioxyde de carbone et en composés inorganiques simples. Toutefois, son utilisation massive remet en question le côté « *relativement peu toxique* » pour l'environnement. En effet, il a été classé comme "*cancérogène probable pour l'Homme*" en mars 2015 par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), dépendant de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

Le principal produit de dégradation du glyphosate est l'AMPA (l'acide aminométhylphosphonique) qui possède les mêmes propriétés chimique et toxicologique que le glyphosate (fig. 1).



Glyphosate ou N (phosphonométhyl) glycine



AMPA (acide aminométhylphosphonique)

Figure 1 :
Molécules de glyphosate et de AMPA (3)

Le glyphosate est une molécule difficile à analyser, de la préparation de l'échantillon jusqu'à l'analyse finale. C'est une molécule très polaire, ionique, soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques, ce qui limite les possibilités pour son extraction. L'utilisation de l'eau est de ce fait inévitable pour cette étape. Toutefois, dans l'extrait aqueux, on va retrouver tous les autres composés hydrosolubles du sol qui vont interférer avec la détermination du glyphosate. Une

étape de purification sur une colonne SPE (Solid Extraction Phase) est délicate à cause du caractère amphotère du glyphosate. Une purification de type extraction liquide-liquide est la plus répandue dans la littérature (3). Toutefois, cette dernière requiert plus de manipulations et allonge le temps d'analyse.

De nombreuses publications font référence à des techniques ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), aux techniques chromatographiques en phase gaz (Gaz Chromatography ou GC) ou en phase liquide (high performance liquid chromatography ou HPLC) couplées à un spectromètre de masse (SM) pour l'analyse de cet herbicide et de son produit de dégradation. Le laboratoire de chimie analytique n'a pas de spectromètre de masse comme analyseur final, mais il est équipé d'une HPLC couplée à un fluorimètre et à un spectrophotomètre à barrette de diodes. Le glyphosate et l'AMPA ne possèdent pas de groupements chromophores permettant leur détection par fluorescence ou par absorption moléculaire dans l'ultra-violet. Aussi, une étape préalable à l'analyse est nécessaire pour que cet équipement puisse permettre le dosage du glyphosate et de l'AMPA. Il s'agit d'une réaction de dérivation à l'aide du 9-fluorenylméthyl-chloroformate (FMOC) qui va apporter un chromophore fluorescent à ces molécules (fig. 2). Le FMOC va se placer sur la fonction amine en libérant une molécule d'HCl. La réaction doit avoir lieu en milieu basique (on utilise un tampon borate-Na pH=9) pour neutraliser l'acide formé et favoriser le sens de la réaction vers la formation de glyphosate-FMOC ou de AMPA-FMOC. Le FMOC permet, grâce à son groupement hydrophobe, de réduire la polarité de la molécule de glyphosate, ou d'AMPA, et

d'augmenter sa rétention sur une colonne de type C18 (diméthyl octadécyl silane) (4) (5).

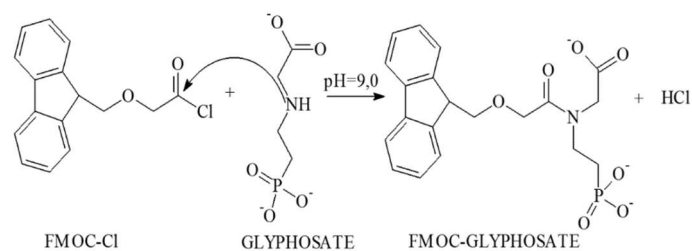


Figure 2 : Réaction de dérivation du glyphosate par le FMOC-Cl (6)

Le principe de séparation envisagé ici est le partage en phase inverse. La phase stationnaire est un liquide apolaire et la phase mobile est un mélange liquide polaire utilisé dans des conditions isocratiques. Le principe est basé sur la différence de solubilité des solutés dans les deux phases.

Choix de la méthode de dosage des nitrates

L'ion nitrate (NO_3^-) est la principale forme d'azote combiné trouvée dans les eaux naturelles. Il constitue le stade final de l'oxydation de l'azote. Les principales sources de rejet du nitrate sont les effluents industriels et municipaux ainsi que le lessivage des engrais inorganiques azotés utilisés pour fertiliser les terres agricoles. Les nitrates sont dangereux car ils peuvent donner naissance à des composés plus toxiques tels que les nitrites et les nitrosamines. Avec l'hémoglobine du sang, les nitrites forment la méthémoglobine incapable de transporter l'oxygène.

Il existe de nombreuses méthodes d'analyse des nitrates dans l'eau (ionométriques, spectrophotométriques, chromatographiques...). Le choix de la méthode dépend de la concentration de l'échantillon, de sa turbidité et des espèces interférentes. Les méthodes spectrophotométriques sont longues et

nécessitent des échantillons limpides. Nous avons opté pour une technique chromatographique échangeuse d'anions car notre laboratoire est équipé d'un chromatographe ionique muni d'un supprimeur et d'un détecteur conductimétrique (7).

La chromatographie ionique (CI) permet la séparation et l'analyse des ions d'une solution.

La phase mobile est constituée par une solution aqueuse ionique (mélange d'hydrogencarbonate et de carbonate de sodium) et la phase stationnaire est un solide qui joue le rôle d'échangeur anionique (résine constituée par un copolymère réticulé greffé avec des groupements ammonium quaternaire ($-\text{N}(\text{R})_3$).

Les parcelles à l'étude et l'extraction des molécules de la matrice « sol »

Le chef d'exploitation a mis à disposition des parcelles expérimentales pour le projet. Nous avons retenu deux parcelles pour le démarrage du projet : la parcelle que l'on appellera A qui n'a pas de couvert végétal car traitée au glyphosate en septembre 2019 et la parcelle que l'on appellera B qui n'a pas eu de traitement au glyphosate ni autre produit phytosanitaire depuis 3 ans et qui présente un couvert végétal.

L'analyse du glyphosate et de l'AMPA ou encore des nitrates du sol nécessite au préalable leurs extractions de la terre. Le sol est une matrice complexe avec des propriétés absorbantes plus ou moins importantes selon sa composition.

Les méthodes référencées font appel généralement à une succession de techniques de séparation classiques comme le tamisage, l'extraction liquide/liquide, la centrifugation, la filtration...qui nécessitent du matériel spécifique et qui sont relativement longues.

Comme les molécules recherchées sont toutes hydrosolubles, nous avons choisi une technique d'extraction innovante et très simple à mettre en œuvre : les bougies poreuses.

Les bougies poreuses permettent de récupérer la solution du sol par absorption de manière très localisée. Cette technique va donc permettre d'analyser les résidus de pesticides ou d'autres molécules comme les nitrates dans chacune des parcelles.

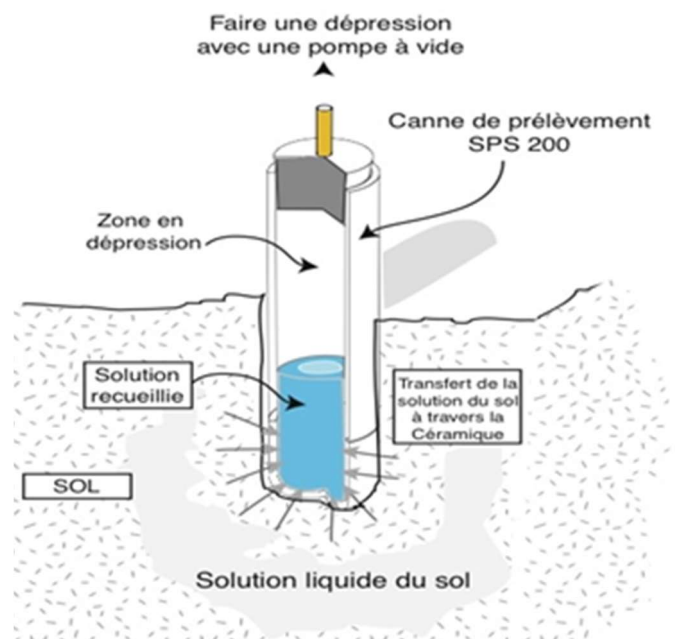


Figure 3 : Schéma de fonctionnement d'une bougie poreuse SPS200 (8)

Le principe est très simple, il s'agit d'une demi-sphère en céramique, poreuse, fixée à l'extrémité d'une canne PVC creuse, introduite dans le sol. Une dépression est faite à l'intérieur de la canne, à l'aide d'une pompe à vide, créant ainsi une succion dans la céramique et une circulation forcée de la solution du sol vers l'intérieur de la canne. Il suffit ensuite de recueillir cette solution dans un flacon pour les analyses en laboratoire. Facile à mettre en œuvre, cette technique permet, une fois les bougies installées, une analyse directe des composants présents dans l'eau extraite du sol et cela à différents temps de

l'expérimentation. Nous avons donc fait le choix des bougies poreuses pour le suivi analytique du glyphosate et des nitrates. Des bougies ont été installées dans les parcelles expérimentales par les étudiants en BTSA GEMEAU, à 3 emplacements différents par parcelle et à 90 cm de profondeur comme préconisé par le fabricant.

Parallèlement, nous avons également effectuer des prélèvements de sol sur ces mêmes parcelles, à proximité des bougies, afin de réaliser l'extraction des molécules d'intérêt par des méthodes classiques. Ceci afin de vérifier la corrélation des résultats avec les solutions récupérées à l'aide des bougies. Nous avons utilisé la publication de Vera Silva & Co (9) pour l'extraction du glyphosate et de l'AMPA et la norme NF ISO 14256-2 pour l'extraction des nitrates du sol (10).

Matériel et méthodes

Échantillonnage

Les échantillons sont prélevés sur les parcelles A et B à 3 endroits différents. Deux types de prélèvements ont été retenus, l'un par siphonage de la solution des bougies poreuses placées sur les parcelles et gérées par les BTSA GEMEAU, et l'autre par carottage de la terre à proximité des bougies.

- Prélèvement par siphonage

Matériel

- Bougies poreuses SDEC de 6,3cm de diamètre et 95cm de longueur
- Flacons de prélèvement en polypropylène (PP) de 100mL
- Pompe à vide

Protocole

Glisser un capillaire relié à un flacon de prélèvement dans la bougie poreuse jusqu'au niveau de la céramique et aspirer par

dépression la solution liquide contenu dans la canne. Prélever 150-200 mL par bougie environ toutes les 3 semaines (plus fréquemment en cas de fortes pluies). Un volume de 50mL est nécessaire au minimum pour chaque analyse.

Les prélèvements peuvent être conservés à +4°C jusqu'à une semaine avant l'analyse

- Prélèvement par carottage

Matériel

- Caisse réfrigérée (+4°C)
- Pelle
- Sacs de prélèvements (sacs de congélation)
- Tamis (maille de 2mm)
- Tarière manuelle

Protocole

-Prélever à l'aide de la tarière, environ 200g de terre sur 90cm de profondeur pour l'analyse du glyphosate, de ses dérivés et des nitrates.

- Éliminer tous les agrégats en homogénéisant la terre avec un tamis.

-Mettre les prélèvements dans des sacs de congélation et les conserver à +4°C avant analyse (maximum 3 jours), sinon les congeler à -20°C jusqu'à l'analyse (maximum 15 jours)

Analyse du glyphosate et de l'AMPA par HPLC après dérivation au FMOC (11) (12)

Matériel et instrumentation

- Agitateur magnétique
- Agitateur mécanique oscillant
- Agitateur type vortex
- Appareil à eau ultra haute qualité (UHQ) Millipore
- Appareil à ultrasons thermostatable
- Bain-marie
- Balance de précision Sartorius
- Centrifugeuse réfrigérée Sigma 202 MK + rotors
- Étuve universelle Jouan
- Évaporateur rotatif Heidolph

- Fiole à vide et entonnoir type Büchner
- Flacons en polypropylène (PP) de 50mL et 100mL
- Micropipette 0,1-2,5mL
- pH mètres multiparamètres Inolab + sonde de pH
- Réfrigérateur
- Seringue de 10mL pour filtration
- Sorbonne
- Tubes à centrifuger
- Verrerie courante de laboratoire
- Chaine HPLC Shimadzu comprenant :
 - Bac à éluants contenant les réservoirs de phase mobile clos et les solutions de rinçage.
 - Dégazeur à ultrasons
 - Mélangeur binaire
 - Deux pompes à piston
 - Injecteur automatique à boucle d'injection de 100 μ L avec volumes d'injection variables
 - Colonne et pré-colonne de silice greffée en C₁₈ (L=250 mm et \varnothing = 4,6 mm) (Nucleosil 100-5 C18 HD de chez Macherey-Nagel)
 - Four à colonne
 - Détecteur spectrophotométrique UV-visible et à barette de diodes (DAD)
 - Détecteur fluorimétrique
 - Ordinateur avec Logiciel de traitement de données Chroméléon

Produits et consommables

- Acétonitrile
- Acide borique
- Acide orthophosphorique 0,1M
- AMPA ou l'acide aminométhylphosphonique
- Cônes pour micropipette 0,1-2,5mL
- Éther diéthylique 99% (conservé à +4°C)
- Filtres Wathman n°1
- Flacons de 1mL (vials) pour l'HPLC avec bouchon percé et septum (à usage unique)
- FMOC ou 9-fluorenylméthyl-chloroformate
- Glyphosate (N-(phosphonométhyl) glycine)
- Hydroxyde de potassium KOH 3M

- Membrane de microfiltration pour seringue de porosité 0.22 μ m
- Phosphate de potassium KH₂PO₄
- Soude NaOH à 0,5M
- Échantillons de terre et solutions du sol à analyser

Protocole opératoire

Préparation du tampon de dérivation borate

0,2M pH9,0

- Peser 1.237 g d'acide borique et ajuster avec 90 ml d'eau ultra-pure
- Agiter à l'aide d'un barreau magnétique
- Ajuster le pH à 9.0 avec la solution de NaOH 0.5M
- Ajuster à 100 mL d'eau ultra-pure (conservation plusieurs mois à +4°C)

Préparation de la solution de KH₂PO₄ 0,005M à pH 6,3

- Peser 0,68 g de KH₂PO₄ et ajouter 900 ml d'eau ultra-pure
- Ajuster le pH à 6.3 avec la solution de KOH 3M
- Ajuster à 1L avec de l'eau ultra-pure
- Filtrer avec filtre 0.22 μ m (conservation 1 mois à +4°C)

Préparation de la phase mobile

- Mélanger 925 ml de tampon KH₂PO₄ et 75 ml d'acétonitrile.
- Agiter et dégazer dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes.

-Dégazer sous vide à l'aide d'un entonnoir Büchner et d'une fiole à vide. L'éluant doit être utilisé dans la journée.

Préparation de la solution de dérivation FMOC à 10 mg/L

- Peser 1mg de FMOC dans une fiole jaugée de 100mL et ajuster à 100mL avec de l'acétonitrile. Agiter (conservation 1 semaine à +4°C)

Préparation de la solution mère de glyphosate et des étalons.

- Préparer par pesée 100 mL d'une solution mère de glyphosate à 1g/L dans de l'eau

ultra-pure (conservation plusieurs semaines à +4°C)

-Diluer au 1/1000^{ème} pour obtenir une solution à 1 mg/L, soit 30 µL de la solution mère qsp 30 mL H₂O UHQ.

-Réaliser par dilution 5 points de gamme de calibration : 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 µg/L.

La gamme de calibration est à réaliser à chaque nouvelle série d'analyses.

Préparation de la solution mère de l'AMPA et des étalons

-Préparer par pesée 100 mL d'une solution mère d'AMPA à 1g/L dans de l'eau ultra-pure (conservation plusieurs semaines à +4°C).

-Réaliser par dilution 5 points de gamme de calibration : 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 µg/L.

Préparation des échantillons de terre

-Broyer finement au mortier environ 50g de terre (préalablement séchée) et prélever 25g.

-Ajouter 100mL d'acide ortho-phosphorique à 0,1M.

-Homogénéiser à l'aide d'un agitateur mécanique oscillant pendant 5 heures.

-Centrifuger à 5000 rpm pendant 20 minutes.

-Filtrer le surnageant sur filtre Wathman n°1.

-Le concentrer à 10 mL à l'aide d'un évaporateur rotatif à 95°C ou à l'étuve à 100°C.

-Filtrer le concentrât sur filtre membrane de 0,22µm avant analyse.

Préparation des échantillons issus des bougies poreuses

Aucun traitement particulier hormis une filtration sur filtre membrane de 0,22µm avant analyses

Dérivation des solutions étalons et échantillons

-Dans un tube en PP de 50mL, ajouter 3mL de solution à analyser, 1,5mL de tampon borate 0,2M pH9 et 3 mL de solution de dérivation FMOC à 10mg/L

-Vortexer 30 à 60 secondes et laisser reposer 2h à 30°C

-Ajouter 4mL d'éther diéthylique

-Vortexer 30 secondes et retirer la phase organique supérieure après décantation

-Renouveler 2 fois cette extraction liquide-liquide et récupérer l'extrait aqueux.

-Déposer 1 mL de la solution aqueuse dans un vial HPLC pour analyse.

Conditions d'analyse chromatographique

Phase mobile : Tampon KH₂PO₄-acétonitrile (92,5/7,5 (v/v))

Phase stationnaire C18 (Nucléosil 100-5 de 25 cm)

Température four à colonne : 30°C

Débit : 1 mL.min⁻¹

Volume d'injection : 50 µL

Détection fluorimétrique :

Longueur d'onde d'excitation 268nm

Longueur d'onde d'émission 313nm

Sensibilité haute

Gain : 1

-Équilibrer la colonne avec la phase mobile pendant 30 minutes à 1h jusqu'à stabilisation de la ligne de base du détecteur.

-Suivre la procédure « Chromeléon » et injecter dans l'ordre les solutions étalons puis en dernier les échantillons à analyser.

-Réaliser 2 séries d'injection de la gamme étalon et des échantillons à analyser.

Analyse des nitrates par chromatographie ionique (CI)

Matériel et instrumentation

-Appareil à eau ultra haute qualité (UHQ) Millipore

-Appareil à ultrasons thermostatable

-Agitateur mécanique oscillant

-Balance de précision Sartorius

-Centrifugeuse réfrigérée Sigma 202 MK + rotors

-Étuve universelle Jouan

-Réfrigérateur

-Tubes à centrifuger

- Seringue de 10 mL
- Verrerie de laboratoire en polypropylène (PP)
- Chromatographe Basic IC 792 Metrohm comprenant :
 - Pompes à piston
 - Vanne d'injection avec une boucle de 20 μ L
 - Colonne anionique Metrosep Anion Dual 1 (3x150 mm) à groupements ammonium quaternaires.
 - Suppresseur d'ions électrolytiques
 - Détecteur conductimétrique
 - Micro-ordinateur avec le logiciel « IC Net » qui permet de piloter entièrement tout l'appareillage et d'effectuer l'acquisition et le traitement des données.

Produits et consommables

- Carbonate de sodium Na₂CO₃
- Hydrogénocarbonate de sodium NaHCO₃
- Nitrate de sodium anhydre NaNO₃ (étuvé à 103°C et conservé dans un dessiccateur)
- Chlorure de potassium KCl
- Échantillons de terre et solutions du sol à analyser
- Filtres membrane de 0,45 μ m de porosité
- Filtres Wathman n°1

Protocole opératoire

Préparation de la solution de KCl à 1M

- Peser 74,55g de KCl dans une fiole de 1L, ajuster avec de l'eau ultra pure.

Préparation de la phase mobile

- Peser 0,084 g de NaHCO₃ et 0,339g de Na₂CO₃
- Ajuster à 1L avec de l'eau ultra-pure
- Agiter et dégazer dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes.
- Filtrer sur filtre membrane de 0,45 μ m et dégazer sous vide à l'aide d'un entonnoir Büchner et d'une fiole à vide. L'éluant doit être utilisé dans la journée.

Préparation de la solution mère de nitrate à 1 g/L et des étalons

- Peser 0,137g de Na₂NO₃ dans une fiole en PP de 100mL et ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultra pure.

- Réaliser par dilution 4 points de gamme de calibration : 25 ; 50 ; 75 et 100 mg/L

Préparation des échantillons de terre (13) (14)

- Broyer finement au mortier environ 50g de terre (préalablement séchée) et prélever 40g

- Ajouter 200mL de la solution de KCl à 1M

- Agiter mécaniquement pendant 1h à 20°C

- Centrifuger à 3000 rpm pendant 10 minutes

- Transférer le surnageant dans un bécher en PP

- Filtrer sur filtre membrane de 0,45 μ m de porosité

Préparation des échantillons issus des bougies poreuses

- Diluer au 1/10^{ème} les solutions du sol avant analyses

- Filtrer sur filtre membrane de 0,45 μ m de porosité

Conditions d'analyse chromatographique

Phase mobile : Na₂CO₃ 3,2 mM / NaHCO₃ 1 mM

Phase stationnaire Metrosep Anion Dual 1 de 15cm

Débit : 0,7 mL.min⁻¹

Volume d'injection : boucle de 20 μ L

Détection par conductimétrie

- Équilibrer la colonne avec la phase mobile pendant jusqu'à ce que le conductimètre se stabilise à environ 16 μ S/cm.

- Suivre la procédure « IC.Net » et injecter dans l'ordre les solutions étalons puis en dernier les échantillons à analyser.

- Réaliser 2 séries d'injection de la gamme étalon et des échantillons à analyser.

Résultats expérimentaux

Analyse du glyphosate et de l'AMPA par HPLC après dérivation au FMOC

La première étape a été d'établir une droite de calibration pour le glyphosate et pour l'AMPA après dérivation au FMOC. Cette étape est nécessaire pour pouvoir par la suite quantifier ces molécules dans les échantillons.

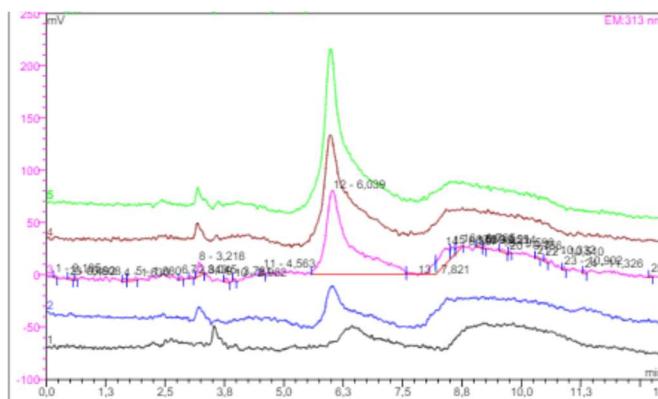


Figure 4 : Chromatogrammes de la gamme de calibration de glyphosate par HPLC
1 µg/L (noir); 2,5 µg/L (bleu); 5 µg/L (rose);
7,5 µg/L (marron) et 10 µg/L (vert)

Les chromatogrammes présentent un pic caractéristique de glyphosate à un temps de rétention de 6 minutes. Nous avons pu déterminer une LOD (limite de détection) de 0,5 µg/L et une LOQ (limite de quantification) de 1 µg/L (Rapport Signal/Bruit > 5).

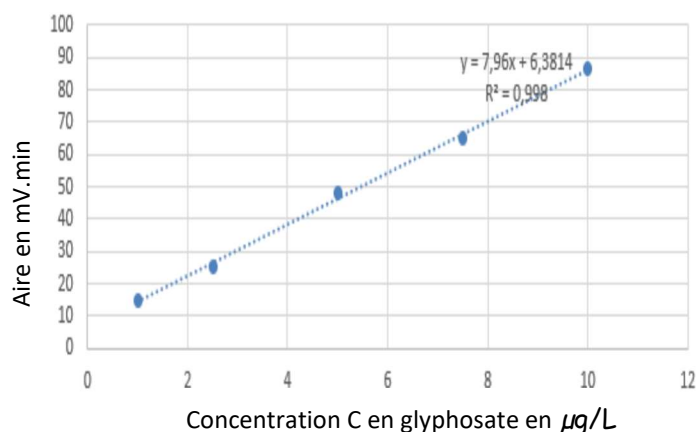


Figure 5 : Droite de calibration du glyphosate par HPLC

L'équation de la droite de calibration est :

$$\text{Aire} = 7,96 C_{\text{glyphosate}} (\mu\text{g/L}) + 6,3814$$

$$(r^2 = 0,998)$$

Les injections sont répétables (pour les temps de rétention T_r et pour les surfaces des pics) sur une même série de plusieurs injections et d'une journée à l'autre avec le même éluant. Par contre, les essais de répétabilité d'injections d'une même série après un changement d'éluant ont montré des modifications des profils chromatographiques.

Malgré de nombreux essais, le protocole utilisé pour l'analyse du glyphosate n'a pas permis l'observation du pic chromatographique de l'AMPA. Sa détection et sa quantification nécessitent des modifications des conditions chromatographiques ce qui rallonge d'autant les temps d'analyse. Aussi pour la suite de l'étude, son dosage dans les échantillons ne pourra pas être effectué.

Nous avons voulu vérifier l'efficacité des bougies poreuses à récupérer la totalité des molécules de glyphosate. En effet, les bougies sont préconisées par le fabricant pour les chlorures, les nitrates et le carbone organique dissous (8), aucune mention pour d'autres molécules. Pour cela nous avons préparé une solution pure de glyphosate de concentration connue et nous avons plongé une bougie poreuse dans cette solution. Nous avons ensuite comparé les profils chromatographiques de la solution de part et d'autre de la bougie. Les résultats sont présentés sur la figure 6.

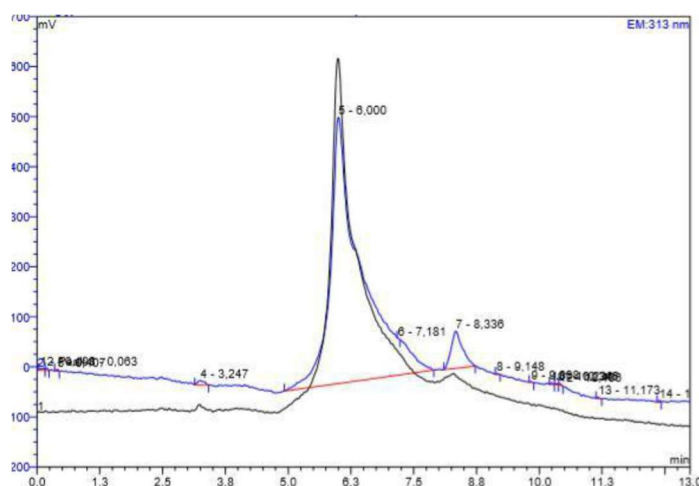


Figure 6 : Chromatogrammes d'une solution de glyphosate avant (noir) et après (bleu) passage dans une bougie poreuse.

On observe que le glyphosate a bien traversé la céramique poreuse (pics chromatographiques à 6 minutes de rétention). Cependant on remarque une légère diminution de l'aire du glyphosate dans la solution après passage dans la bougie. Le rapport d'aires nous montre un rendement de récupération du glyphosate par la bougie poreuse de 92,8%.

Nous avons testé notre méthode d'analyse sur les échantillons provenant des parcelles A et B après siphonage de l'eau des bougies.

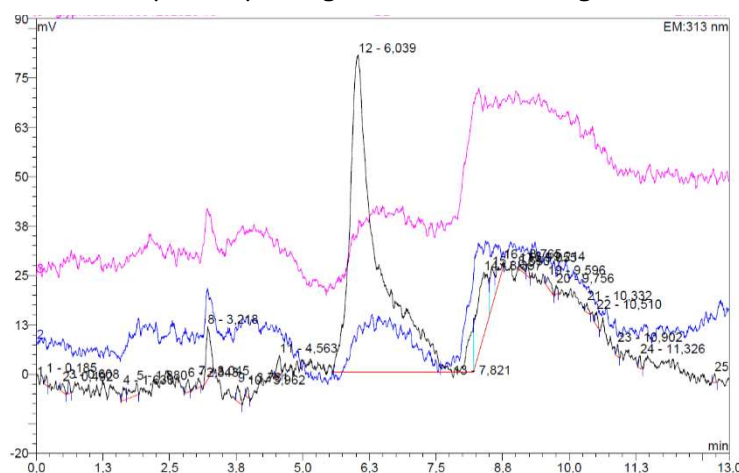


Figure 7 : Chromatogrammes des solutions extraites des bougies des parcelles A (bleu) et B (rose) et d'un point de gamme à 5 µg/L (noir)

Par comparaison à un point de gamme à 5 µg/L Les profils chromatographiques des parcelles A et B ne présentent pas de pics quantifiables de glyphosate.

Nous avons procédé, parallèlement à cette analyse, à l'extraction du glyphosate du sol par carottage à proximité des bougies (dans un rayon de 10 à 90 cm). Plusieurs méthodes d'extraction étaient à notre disposition mais aucune n'a donné de résultats exploitables. Les chromatogrammes obtenus présentaient de très nombreux pics qui ne permettaient pas de distinguer éventuellement la présence de glyphosate.

Analyse des nitrates par chromatographie ionique (CI)

Comme pour le glyphosate, la première étape a consisté à établir une droite de calibration du chromatographe pour quantifier les nitrates dans les échantillons.

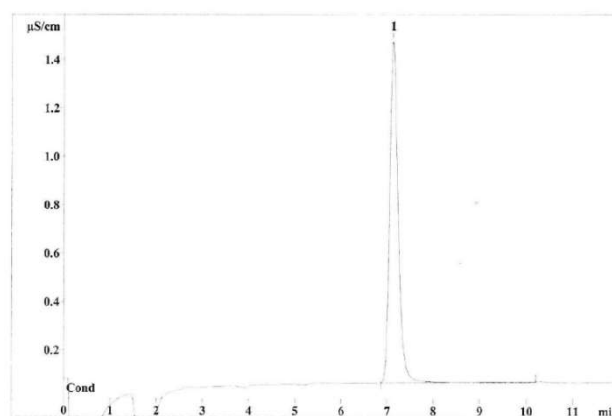


Figure 8 : Chromatogramme d'un étalon de nitrate à 25 mg.L⁻¹

Le chromatogramme étalon présenté pour exemple sur la figure 8 montre un pic caractéristique du nitrate à un temps de rétention de 7,1 minutes.

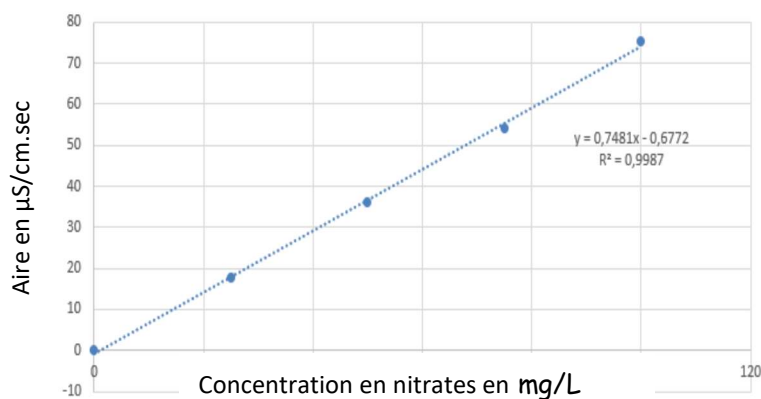


Figure 9 : Droite de calibration des nitrates par chromatographie ionique

L'équation de la droite de calibration est :

$$\text{Aire} = 0,7481 C_{\text{nitrates (mg/L)}} - 0,6772$$

($r^2 = 0,999$)

Le rendement des bougies pour la récupération des nitrates a été vérifié selon la même procédure que pour le glyphosate. Celui-ci atteint les 100% pour différentes concentrations en nitrates.

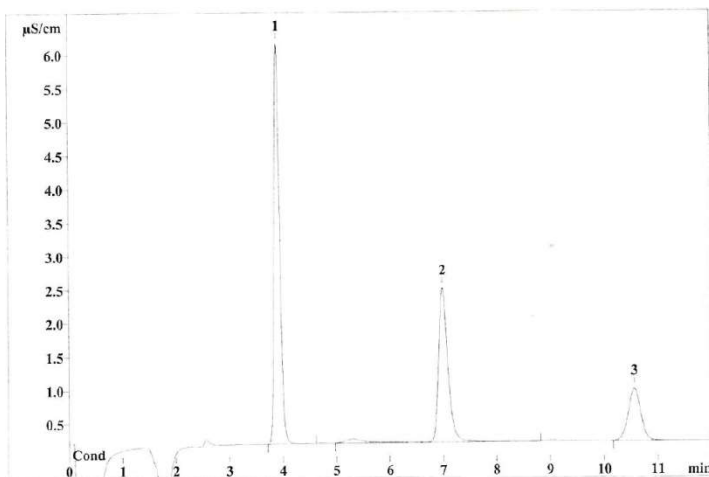


Figure 10 : Chromatogramme de la solution aqueuse des bougies de la parcelle A au 20/12/19

La figure 10 présente un exemple de chromatogramme obtenu par CI lors de l'analyse des nitrates dans la solution retenue dans les bougies poreuses installées sur la parcelle A. On observe le

pic caractéristique des nitrates à 7,1 minutes. D'autres pics apparaissent et correspondent à des anions présents dans l'eau. Le premier pic à 3,9 minutes correspond aux chlorures et le dernier pic à 10,6 minutes correspond aux sulfates.

Des prélèvements des bougies ont été faits également à la même date sur la parcelle B. D'autres prélèvements ont été effectués sur ces parcelles, 20 jours plus tard, le 9 janvier 2020. Les résultats sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : Concentrations en nitrates des solutions aqueuses recueillies dans les bougies poreuses des parcelles A et B à deux dates différentes.

Parcelle	Date	Dilution	Aire du pic* en µS/cm.sec	Concentration en nitrate en mg/L
A	20/12/19	10	29,55	404
	09/01/20		23,63	325
B	20/12/19		2,60	44
	09/01/20		5,46	82

*Moyenne de plusieurs essais

Parallèlement, on a procédé à des prélèvements de sol à proximité des bougies afin de faire corrélérer les résultats. La terre a été traitée au KCl à 1M pour extraire l'azote complexé. L'analyse des nitrates a été effectuée par CI.

Des problèmes ont été rencontrés lors de l'extraction des nitrates. La littérature préconisait un traitement de la terre avec une solution de chlorure de potassium à 1M afin de décomplexer l'azote. Or, à ces concentrations, les chlorures apportés par le chlorure de potassium entraînaient un pic chromatographique énorme masquant les autres ions et surtout risquant d'endommager de manière irréversible la colonne échangeuse d'anions. Aussi, d'autres

essais ont été effectués en utilisant une solution de KCl fortement diluée. Les résultats sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : Concentrations en nitrates dans les sols des parcelles A et B après traitement au KCl à 1 mM

Parcelle	Dilution	Aire du pic* en $\mu\text{S}/\text{cm}\cdot\text{sec}$	Concentration en nitrate en mg/L
A	10	2,26	39,26
B		2,09	36,99

*Moyenne de plusieurs essais

Des résultats similaires ont été obtenus sans aucun traitement au chlorure de potassium qui a été remplacé par de l'eau bouillie (Tableau III)

Tableau III : Concentrations en nitrates dans les sols des parcelles A et B après traitement à l'eau bouillie

Parcelle	Dilution	Aire du pic* en $\mu\text{S}/\text{cm}\cdot\text{sec}$	Concentration en nitrate en mg/L
A	10	1,54	29,66
B		1,67	31,40

*Moyenne de plusieurs essais

Discussion

Analyse du glyphosate et de l'AMPA par HPLC après dérivation au FMOC

La droite de calibration obtenue pour le glyphosate présente une bonne linéarité dans la gamme étudiée avec un r^2 très proche de 1. La méthode a été optimisée pour descendre la limite de quantification à $1 \mu\text{g}/\text{L}$, ce qui permet d'envisager l'analyse du glyphosate dans le projet.

Il est à noter qu'il est nécessaire de refaire une droite de calibration lors d'un changement de phase mobile.

Les bougies poreuses permettent le passage du glyphosate d'une solution aqueuse pure avec un rendement de 92,8%. Si ce rendement est confirmé par des résultats complémentaires, il faudra en tenir compte pour la quantification dans les échantillons. Cette efficacité doit cependant être vérifiée à partir de solutions aqueuses plus complexes, pour se rapprocher des conditions de prélèvement dans les sols.

Les protocoles d'extraction du glyphosate du sol sont largement améliorables. Après de nombreux essais nous avons opté pour l'utilisation de l'acide ortho-phosphorique pour décomplexer le glyphosate des autres ions présents dans le sol. Cependant, la baisse trop importante du pH par addition d'acide empêche la réalisation de la dérivation du glyphosate par le FMOC dans les conditions requises.

Les analyses du glyphosate dans les parcelles A et B après siphonage des bougies n'ont pas permis la quantification de glyphosate. Autant cela paraît normal dans la parcelle A non traitée depuis 3 ans, autant cela paraît étonnant pour la parcelle B traitée en septembre 2019. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- les parcelles ont été exposées à de fortes pluies qui ont pu entraîner le glyphosate par lessivage. Ce phénomène a pu être renforcé par le fait que le sol est très calcique
- malgré sa forte solubilité dans l'eau ($> 10 \text{ g}/\text{L}$), le glyphosate reste fortement adsorbé par les autres composants du sol. Le pH du sol semble constituer un facteur prédominant, conditionnant son adsorption dans le sol ; l'adsorption diminuerait quand le pH du sol augmenterait.

-le glyphosate s'est métabolisé en AMPA. La technique d'analyse de l'AMPA n'étant pas au point, nous n'avons pas pu le vérifier.

-les bougies sont trop profondément installées (90 cm) pour récupérer le glyphosate qui d'après la littérature se situerait plutôt à la surface du sol à environ 5-10 cm (2). Nous pensions que la profondeur de 90 cm pouvait permettre l'analyse à la fois du glyphosate et des nitrates, et évitait ainsi un surcoût de l'analyse. Au vu de nos résultats, il semble que cette profondeur n'est pas adaptée à l'analyse des glyphosates.

Les résultats chromatographiques obtenus à partir des échantillons de sol après extraction liquide-liquide n'ont pas pu être exploités. De nombreux problèmes ont été rencontrés lors de la mise en place de la méthode pré-analytique :

-la purification du glyphosate est insuffisante pour détecter correctement le pic chromatographique

-la multiplication des étapes de purification entraîne des pertes importantes.

-l'utilisation de l'acide ortho-phosphorique pour décomplexer le glyphosate des autres ions du sol entraîne une diminution importante du pH qui est incompatible avec la technique de dérivation du glyphosate par le FMOC.

Analyse des nitrates par chromatographie ionique (CI)

La droite de calibration de la CI a donné des résultats très satisfaisants. La linéarité est très bonne jusqu'à 100 mg/L. La limite de quantification (LOQ) vérifiée est de 1 mg/L. La méthode est répétable et reproductible. Elle avait été validée dans un précédent projet.

Les bougies poreuses donnent un excellent rendement d'extraction des nitrates dans

les conditions du laboratoire à partir de solutions aqueuses pures.

Les résultats obtenus à partir des solutions recueillies dans les bougies des parcelles A et B montrent tous la présence de nitrates. La concentration est cependant beaucoup plus élevée dans la solution d'eau recueillie sur la parcelle A. Ceci tend à prouver que le sol nu de la parcelle A traitée au glyphosate favorise le lessivage des nitrates du sol qui se retrouvent dans l'eau drainée dans les bougies. La concentration est importante (plusieurs centaines de milligramme). L'eau recueillie par les bougies de la parcelle B donne des résultats en nitrates conformes à la littérature. Le couvert végétal « piège à nitrate » semble donc bien retenir les nitrates du sol.

Les concentrations en nitrates dans une même parcelle semblent évoluer dans le temps comme le montre les résultats obtenus 20 jours après les premiers prélèvements. Nous n'avons malheureusement pas pu confirmer cette évolution puisque la pandémie du covid-19 et le confinement qui a suivi ont empêché le projet de se poursuivre.

Comme pour le glyphosate, nous avons voulu vérifier la cohérence des résultats entre l'extraction par les bougies poreuses et une extraction directe dans le sol après décomplexation par du KCl. Il s'est avéré que la méthode pré-analytique retenue n'était pas compatible avec l'analyse par chromatographie ionique. La raison principale étant l'apport très important de chlorure dans les échantillons, qui risquait d'endommager la colonne anionique. Les adaptations du protocole d'extraction qui ont consisté essentiellement à diminuer fortement la concentration en KCl, voire à l'éliminer totalement n'ont pas donné de résultats concluants. La norme suivie concerne en fait l'extraction de l'azote du sol sous toutes

ses formes pour obtenir de l'azote minéral (ammoniacal NH_4^+ et nitrique NO_3^-). Ceux sont surtout les ions ammonium NH_4^+ qui sont susceptibles de se fixer sur les sites négatifs des sols. D'où l'utilisation de K^+ (apporté par KCl) pour les déplacer et les faire passer dans la solution du sol (14). Les ions nitrates NO_3^- , très solubles dans l'eau, ne nécessiteraient donc peut-être pas d'une extraction préalable au dosage.

Conclusion

La méthode d'analyse qualitative et quantitative du glyphosate par HPLC avec détection fluorimétrique après dérivation au FMOC a été mise au point et optimisée pour les solutions aqueuses. Les résultats sont fiables linéaires dans la gamme utilisée et répétables avec une limite de quantification de $1 \mu\text{g/L}$.

Nous n'avons pas à ce jour réussi à obtenir des conditions chromatographiques permettant l'analyse de l'AMPA. Il faut accentuer les efforts sur l'optimisation de la méthode analytique de l'AMPA, principal produit du métabolisme du glyphosate. En effet, le glyphosate selon la nature du sol peut être rapidement métabolisé en AMPA, et celui-ci devient alors le principal contaminant de l'eau du sol. L'idéal serait d'utiliser une seule et même méthode de dosage du glyphosate et de l'AMPA. D'autres essais sont nécessaires pour optimiser la méthode. Nous avons opté pour un mode d'éluion isocratique, il faudrait tester le mode d'éluion avec un gradient croissant d'acétonitrile sur une colonne de type C18-RP. Une autre option serait d'utiliser une colonne de type NH_2 très souvent citée dans la littérature. Cette dernière option nécessite d'investir dans une colonne dédiée à l'analyse du glyphosate et de l'AMPA.

La méthode d'extraction du glyphosate par les bougies poreuses s'est montrée efficace. Cette méthode peut être adoptée pour la suite du projet car elle facilite le travail pré-analytique. Elle présente l'avantage d'un prélèvement direct du liquide du sol qui évite un prélèvement du sol *in situ* suivi d'une extraction longue et fastidieuse. Cette méthode reste cependant coûteuse. Elle est, de plus, dépendante de nombreux facteurs comme l'humidité du sol, la dépression exercée, le colmatage des bougies ou encore la profondeur de l'installation. De plus, l'installation des bougies peut représenter une gêne pour l'agriculteur lors du passage des outils agricoles. Idéalement, cette technique d'extraction doit être associée à des mesures complémentaires à partir de prélèvement de sol *in situ*. Ne serait-ce que pour faire corrélérer les concentrations trouvées dans les solutions aqueuses à celles réellement présentes dans le sol. En effet, Le sol est une matrice très complexe qui adsorbe plus ou moins fortement de nombreuses molécules.

Les techniques d'extraction liquide-liquide utilisées lors de cette étude n'ont pas permis une purification suffisante pour l'analyse chromatographique du glyphosate. Cette technique pourrait être améliorée en ajoutant une technique d'extraction sur cartouche SPE (Solid Phase Extraction) comme le préconise certaines publications (16). En effet la combinaison des deux types d'extraction permettrait de purifier les extraits et d'éliminer les éventuels effets de matrice. La technique de purification sur cartouche SPE donne également la possibilité de concentrer l'échantillon

Il faudrait installer des bougies à 10 cm de profondeur pour l'analyse spécifique du glyphosate et de l'AMPA, la profondeur de 90 cm ne semble pas adaptée.

La méthode d'analyse qualitative et quantitative des nitrates par CI avec détection conductimétrique a été optimisée pour les solutions aqueuses allant de 1 mg/L à 100 mg/L.

Le rendement d'extraction des nitrates des bougies est voisin de 100%. Cette technique est bien adaptée pour l'analyse des nitrates présents dans l'eau du sol. Le maintien de la profondeur de 90 cm pour l'installation des bougies implique de doubler le nombre de bougies à installer. Une réévaluation avec des tests de répétabilité serait cependant souhaitable pour valider cette technique.

Les premiers résultats d'analyse des nitrates dans la solution du sol montrent un lessivage moins important dans le sol de la parcelle sous couvert végétal de type CIPAN et donc une certaine efficacité du couvert végétal à retenir les nitrates. L'évolution dans le temps n'a pas pu être réalisée pour cause de covid-19.

Les tentatives d'extraction des nitrates complexés aux autres constituants du sol se sont avérées infructueuses. Une recherche bibliographique plus poussée sur la technique d'extraction des nitrates du sol compatible avec la méthode d'analyse par CI est nécessaire.

Pour rappel, l'expérimentation de cette année consistait à mettre au point deux méthodes d'analyse : le dosage du glyphosate et de l'AMPA par HPLC avec détection fluorimétrique et le dosage des nitrates par chromatographie ionique.

La mise ne place des protocoles d'analyse du glyphosate et de son dérivé l'AMPA d'une part et des nitrates d'autre part a nécessité de très nombreuses adaptations. Les résultats obtenus à partir des solutions pures sont très satisfaisants

et permettent de valider les méthodes d'analyse retenues.

Les techniques d'extraction des molécules par l'intermédiaire des bougies poreuses ont montré des résultats encourageants.

Les techniques d'extraction liquide-liquide du sol *in situ* se sont avérées compliquées, onéreuses et les résultats peu exploitables.

Les premiers résultats, qui restent à vérifier, montrent

⋮

Ce travail n'a pas permis d'établir un « point zéro » pour le projet mais présente le commencement de nombreuses autres analyses à venir et s'inscrit bien dans une continuité méthodologique à long terme du projet CASDAR.

Grâce à ce projet, nous avons pu découvrir le domaine de l'agroécologie. Nous avons été sensibilisé aux thématiques actuelles dans le monde agricole comme « Produire différemment en utilisant des pratiques plus respectueuses de l'environnement ». Nous avons apprécié travailler en collaboration avec d'autres formations de BTSA dans un but commun. Nous espérons la poursuite de ce projet par d'autres promotions d'étudiants qui permettrait à l'exploitation la réduction des produits phytosanitaires comme le glyphosate ou encore l'optimisation des intrants comme les nitrates.

Références bibliographiques

1-Glyphosate i northern ecosystems, Helander et al., trends in plant science 17(10) :569-74, june 2012

2-Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage, Elena Okada , José Luis Costa , Francisco Bedmar , Geoderma , volume 263, fevrier 2016 p 78-85

[3-\[https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-studied-molecules-a-Glyphosate-b-Aminomethylphosphonic-acid_fig1_236922515\]\(https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-studied-molecules-a-Glyphosate-b-Aminomethylphosphonic-acid_fig1_236922515\)](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-studied-molecules-a-Glyphosate-b-Aminomethylphosphonic-acid_fig1_236922515)

4-Le glyphosate dans tous ces états, S. Gosciny et V. Hanot. Institut Scientifique de Santé Publique Unité Pesticides

5-NF ISO 21458 : Qualité de l'eau - Dosage du glyphosate et de l'AMPA - Méthode par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et détection fluorimétrique (2009)

6- Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization.

V.E.Olivo, A.Tansini, F.Carasek, D.Cordenuzzi, S.Fernandes, M.A. Fiori, A.Fragoso, J.Dal Magro. Rev.Ambient.Água vol.10 no.2 Taubaté Apr./ June 2015

7-Analyse des eaux : aspects réglementaires et techniques, Franck Rejsek, CRDP Aquitaine 2002 p64-66 ; p93-100

8-<https://www.sdec-france.com/lysimetres-de-sol-ceramiques-poreuses.html>

9-Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union Vera Silva , Luca Montanarella , Arwyn Jones , Oihane Fernández-Ugalde , Hans G.J. Mol ,

Coen J. Ritsema , Violette Geissen

10-NF ISO 14256-2 : Qualité du sol - Dosage des nitrates, des nitrites et de l'ammonium dans des sols bruts par extraction avec une solution de chlorure de potassium (mars 2007)

11-Optimization and Performance Evaluation of the Analysis of Glyphosate and AMPA in Water by HPLC with Fluorescence Detection. B. LeBat, K.Colliaux, D.Pelle, C.Briens, R.Seux, M.Clément.

Chromatographia 2002, 56, August (n°3/4) 161-164

12- Dosage du glyphosate par HPLC après extraction et dérivation à l'OPA. Gains Kouakou, Ardjouma Dembele, Lazare Brou Yao, Seydou Tiho. Int. J. Biol. Chem. Sci. 9(3): 1384-1398, June 2015

13-Viaux Ph., 1981. Conservation des échantillons de sol en vue d'un dosage de l'azote minéral. Science du Sol, 1, 73-88.

14-Sterckeman, T., Ciesielski, H., 1991. Principaux facteurs influant sur la détermination de l'azote minéral des sols. In « L'azote et le soufre des sols » - Troisièmes journées de l'analyse de terre - Blois , Ed Frontières, Gif sur Yvette, 101-121.

15-Impact sur l'environnement d'un herbicide non sélectif, le glyphosate : approche modélisée en conditions contrôlées et naturelles. Abdul Jabbar Al Rajab Thèse de doctorat Institut polytechnique de Lorraine (juin 2007)

16-Développement et validation d'une méthode permettant le dosage du glyphosate et de l'AMPA dans les eaux surface par HPLC-ESI-MS/MS N.T. Tran Thi N. Mazzella F. Delmas