

Le pH en image !

Suivi spatio-temporel du pH dans la rhizosphère à l'aide d'optodes planaires.

Gabrielle Daudin¹, Daniela Obermaier², Isabelle Bertrand¹, Esther Guillot¹, Claire Marsden¹, Agnès Robin¹, Philippe Hinsinger¹

Résumé. Le sol est un environnement complexe, hétérogène et dynamique, lieu de multiples processus biogéochimiques essentiels au fonctionnement des plantes et des écosystèmes. L'étude des interactions sol-racine dans les différents horizons du sol est cruciale pour appréhender la dynamique des nutriments et du carbone, ainsi que le rôle joué par les microorganismes associés au niveau de la rhizosphère. Ces interactions relèvent de processus à fines échelles et de dynamiques temporelles difficilement accessibles *in situ*. Nous présentons ici une méthode de mesure *in situ* du pH du sol, paramètre clé des interactions sol-racine-microorganisme, via une technique d'imagerie, les optodes planaires. Ces capteurs optiques et chimiques permettent un suivi temporel non invasif du pH du sol et sa spatialisation à l'échelle millimétrique, voire infra. Nous présentons une application de cet outil novateur au suivi *in situ* du pH de la rhizosphère de céréales et de légumineuses.

Mots clés : optode, mesure *in situ*, rhizosphère, pH, imagerie

Abstract. The soil is a complex, heterogeneous and dynamic environment, it is there that various and essential biogeochemical processes take place for the functioning of plants and their ecosystems. The study of soil-roots interactions in the different soil horizons is crucial to understand the dynamics of nutrients and carbon as well as the role played by micro-organisms associated to the rhizosphere. These interactions take into account processes at tiny scales and temporal dynamics that cannot be reached easily *in situ*. We present here a method of measure of the soil pH *in situ*, a key parameter of the soil-roots-micro-organisms interactions through an imaging technique called planar optodes. These optical and chemical sensors allow to follow over time without invasion the soil pH and its spatialization at millimeter or infra scale. We present an application of this new tool to follow *in situ* rhizosphere pH of cereals and legumes.

Keywords : optode, *in situ* measure, rhizosphere, pH, imaging

Introduction

Le sol est un environnement très hétérogène qui est le lieu de processus biogéochimiques complexes induisant de fortes variabilités spatiales depuis la micro-échelle jusqu'à l'échelle du paysage (Young and Crawford, 2004). L'un des principaux « hotspots » d'activité biologique dans le sol est la rhizosphère, définie comme le volume de sol autour des racines vivantes qui est influencé par l'activité racinaire (Hinsinger et al., 2009). La rhizosphère est le

¹ UMR Eco&Sols, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, IRD, Montpellier, France
gabrielle.daudin@inrae.fr

² PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Allemagne

siège d'interactions multiples entre les particules de sol et les racines en lien avec l'absorption d'eau et de nutriments, la respiration, et l'excrétion de composés organiques et minéraux. Ces processus modifient les communautés microbiennes et les équilibres chimiques autour des racines (Hinsinger et al., 2005 et 2009), en particulier via la modification locale du pH du sol. En effet, le pH est impacté par les échanges de cations et d'anions entre la racine et la solution du sol, l'excrétion d'exsudats organiques, la dynamique de l'oxygène et du potentiel rédox, qui dépendent du pouvoir tampon du sol et de la nutrition de la plante (Hinsinger et al., 2003). En retour, ces changements de pH rhizosphérique modifient considérablement la disponibilité des nutriments et des éléments toxiques. Aussi, ces processus rhizosphériques sont très dynamiques dans les dimensions spatiales et temporelles, induisant de fortes variations (jusqu'à 2 unités de pH) à une échelle millimétrique (Hinsinger et al., 2009; York et al., 2016). Une meilleure compréhension de ces interactions sol-racine nécessite la mesure du pH à une telle échelle. Le défi méthodologique est de pouvoir suivre de telles variations du pH de la rhizosphère *in situ* de manière non invasive, afin d'accéder à une information à la fois spatiale et temporelle dans un milieu confiné tel que le sol.

La mesure du pH dans les sols et la rhizosphère s'effectue principalement par prélèvement, extraction puis mesure en laboratoire en solution aqueuse selon des protocoles bien établis (Norme ISO 10390:2005). Cette approche présente l'inconvénient majeur d'être destructive. Elle ne permet pas de suivre l'évolution du pH au cours du temps sur un même dispositif de culture, ni d'accéder à une résolution spatiale adaptée pour appréhender les gradients millimétriques de pH dans la rhizosphère *in situ*. En effet, la séparation du sol rhizosphérique de celui non influencé par les racines est peu évidente *in situ*, variant selon les types de sol, leur texture notamment et les conditions d'humidité, conduisant ainsi à une part d'arbitraire. Enfin, la résolution spatiale de cette approche est au mieux de quelques millimètres. La seconde approche est l'utilisation de méthodes invasives mais non destructives par l'insertion d'électrodes ou de micro-électrodes dans le sol. Ce type de mesure présente l'avantage d'un temps de réponse très court et d'une mesure spatialement résolue dans le cas des micro-électrodes (Pedersen et al., 2015). Cependant, ces micro-électrodes sont fragiles, consomment une quantité non négligeable d'analyte, et nécessitent l'insertion de nombreuses électrodes pour couvrir la zone d'étude. Cette approche ne répond donc pas de manière satisfaisante au besoin d'une mesure non invasive, à forte résolution spatiale et temporelle.

Alternativement, une méthode non invasive de mesure du pH dans la rhizosphère a été développée par Häussling et al. en 1985, fondée sur l'emploi d'indicateurs colorés sensible au pH. Cette méthode était appliquée à des milieux de culture synthétiques transparents de type gélose. Par la suite, la vidéodensitométrie, c'est-à-dire la combinaison de ces indicateurs avec des techniques d'analyse d'image a été utilisée pour quantifier et cartographier à haute résolution spatiale le pH de la rhizosphère (Jaillard et al., 1996). Cette méthode fut la première approche permettant de mesurer les variations spatiales et temporelles du pH dans la rhizosphère. Cependant, elle n'est utilisable qu'en milieu synthétique transparent et donc éloignée des conditions réelles du sol.

Comment donc associer mesure *in situ* non invasive et suivi spatio-temporel dans des systèmes proches des conditions réelles ?

Un outil de mesure, appelé optode, a été développé dans les années 1990 pour suivre les variations de concentration en oxygène dans des profils sédimentaires (Glud et al., 1996). La mesure est fondée sur une modification réversible des propriétés de fluorescence d'une sonde sensible à l'oxygène greffée sur un support inerte. Le capteur est mis en contact de l'échantillon et le signal émis est enregistré par un système optique. Ce principe a ensuite été étendu à la mesure du pH. De par sa réversibilité et le découplage entre le capteur sensible et le détecteur, cet outil permet des mesures non invasives avec une dynamique temporelle. Par cette approche, il est actuellement possible de suivre les variations de pH, mais aussi des concentrations en O₂ et de pCO₂. Cette technique a été principalement utilisée dans des milieux sédimentaires pour étudier les gradients d'oxygène dans des profils sédimentaires (Glud et al., 1996) ou dans la rhizosphère de cultures immergées telles que le riz (Larsen

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (?)

et al., 2015). Elle a aussi été utilisée pour mieux comprendre les processus rhizosphériques en milieu aéré ou anoxique, par un suivi du pH et de la concentration en O_2 (Blossfeld et al., 2007; Schreiber et al., 2012 ; Blossfeld et al., 2013) et dans une moindre mesure de la pCO_2 (Koop-Jakobsen et al., 2018). Enfin, cet outil est aussi appliqué dans le monitoring de procédés biologiques en réacteur (Kermis et al., 2002). Appliquée pour la première fois en 2007 dans des dispositifs contenant du sol pour étudier les interactions sol-racine en milieu immergé (Blossfeld et Gansert, 2007), cette approche est encore peu utilisée malgré un potentiel important pour répondre au défi méthodologique présenté ci-dessus (Blossfeld et al., 2013).

Cet article présente le principe de cette méthode originale, un exemple-type d'application dans des dispositifs d'étude des interactions sol-racine-microorganisme, ainsi que les avantages et les limites de cette approche après quelques années d'utilisation et d'adaptation dans différents systèmes expérimentaux de l'UMR Eco&Sols.

Optodes pH : principe et outils

Une optode est un capteur chimique et optique composé de deux parties distinctes et découplées : une partie chimique, en contact avec l'échantillon et une partie optique qui enregistre le signal émis par le capteur chimique. Plusieurs types d'optodes existent selon le mode d'enregistrement du signal et le format de la donnée de sortie. Typiquement, on distingue les mesures par fibre optique donnant une information ponctuelle en un point et les mesures par prise d'images, donnant une matrice de données 2-D avec une dimension spatiale. Les optodes planaires, présentées dans cet article, désignent les systèmes utilisant l'imagerie comme moyen d'enregistrement du signal.

La partie chimique, communément appelée l'optode est constituée d'un support inerte transparent sur lequel est greffée une couche de polymère contenant deux sondes fluorescentes. C'est la partie sensible du capteur. L'une des deux sondes est sensible aux protons, l'autre sonde y est insensible et sert de référence interne. En présence de protons, l'équilibre des formes protonées/déprotonées de la sonde fluorescente est modifié. Cette réaction chimique modifie ses propriétés de fluorescence et notamment l'intensité de la lumière émise. Cette réaction est réversible. En revanche, la sonde de référence présente un signal constant quel que soit le pH du milieu. Ces deux sondes possèdent des longueurs d'onde d'émission distinctes permettant de séparer les signaux sur 2 canaux différents : le Rouge et le Vert. L'optode, qui ressemble à une feuille de papier, est découpée à la taille souhaitée pour couvrir la zone d'intérêt puis fixée sur un support optiquement transparent et mince (< 5mm) de type verre ou plexiglass en évitant la présence de bulle d'air entre le support et l'optode. La vitre est ensuite placée au contact de l'échantillon. (Fig. 1)

La partie optique enregistre les signaux de fluorescence émis par l'optode au contact de l'échantillon. Elle est composée d'une source de lumière de type LED (Light Emitted Diode) émettant une lumière d'excitation sur l'optode et d'une caméra CMOS (Complementary Metal Oxyde Semiconductor) équipée d'un filtre d'émission enregistrant le signal de fluorescence émis par l'optode (Fig. 1). On obtient donc comme résultat une image de l'optode. Grâce à la capacité des capteurs CMOS à capter la lumière selon sa longueur d'onde sur trois canaux Rouge-Vert-Bleu (RVB), les signaux de fluorescence émis par la sonde pH et par la sonde de référence sont enregistrés de manière différenciée sur le canal Rouge (signal de référence) et sur le canal Vert (signal pH) de la caméra. Le signal enregistré sur le canal Bleu correspond à la lumière d'excitation résiduelle. Cette lumière est bloquée par le filtre d'émission de la caméra. Le signal sur ce canal est donc très faible. La source de lumière et la caméra sont positionnées face à la vitre et à une distance fixe de l'optode. Au cours de la prise d'image, l'ensemble du dispositif est placé à l'abri de la lumière ambiante. Ainsi, l'optode reçoit uniquement la lumière provenant de la source d'excitation et la lumière enregistrée par la caméra n'est pas polluée par la lumière ambiante ; elle est donc spécifique de la fluorescence émise par l'optode. De plus, cela assure une ambiance lumineuse résiduelle homogène au cours de la mesure.

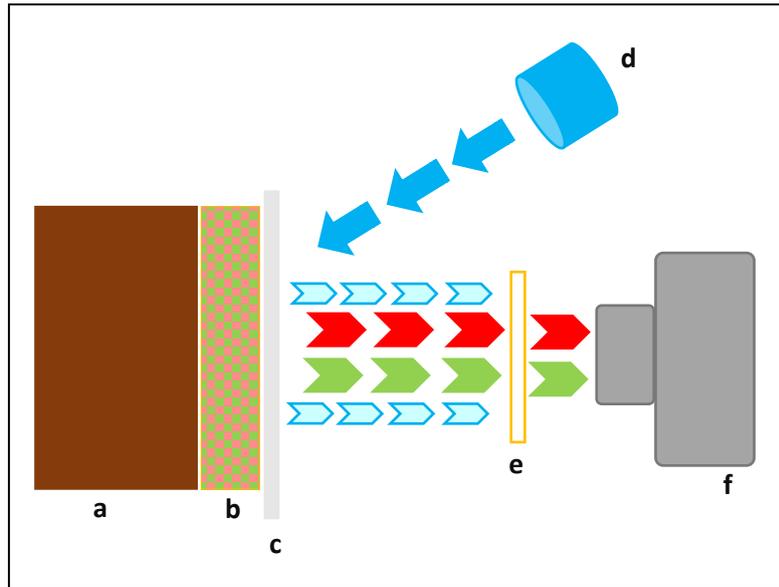


Figure 1 : Schéma d'une optode plane avec (a) échantillon, (b) optode, (c) support transparent, (d) source de lumière d'excitation, (e) filtre d'émission, (f) camera.

Les données acquises sont des images dont chaque pixel contient l'information relative à chaque sonde fluorescente et donc au pH du milieu, associée à une coordonnée spatiale. **Le traitement de données** s'effectue en 3 étapes (Fig.2). Tout d'abord, l'image de type RVB est décomposée afin d'obtenir l'image du canal Rouge et l'image du canal Vert en format 8-bit. Ensuite, un calcul de ratio est réalisé entre ces deux images. On obtient alors une image en format 32-bit, dont chaque pixel correspond à une valeur de ratio R. Cette approche appelée FRIM (Fluorescence Ratiometric Imaging Measurement) permet de limiter les biais de mesure liés à une source de lumière non homogène ou instable, ainsi qu'à un déficit d'homogénéité de la distribution des sondes fluorescentes dans le polymère. La valeur de ce ratio est corrélée à la valeur de pH selon l'équation de Boltzmann :

$$(1) \quad R = \frac{R_{min} - R_{max}}{1 + e^{\left(\frac{pH - pKa'}{dpH}\right)}} + R_{max}$$

R est le ratio d'intensité, **R_{min}** et **R_{max}** sont des constantes correspondant aux asymptotes de la courbe, **pKa'** est la constante de dissociation de la sonde pH dans les conditions d'utilisation, **dpH** est la pente de la courbe. Enfin, à partir de cette équation, dont les paramètres sont déterminés par une courbe d'étalonnage réalisée avec des solutions tampons de pH connu, le pH est calculé pour chaque pixel de l'image par l'équation suivante :

$$(2) \quad pH = pKa' + dpH \cdot \ln\left(\frac{R_{min} - R_{max}}{R - R_{max}} - 1\right)$$

On obtient alors une image du pH de la zone couverte par l'optode.

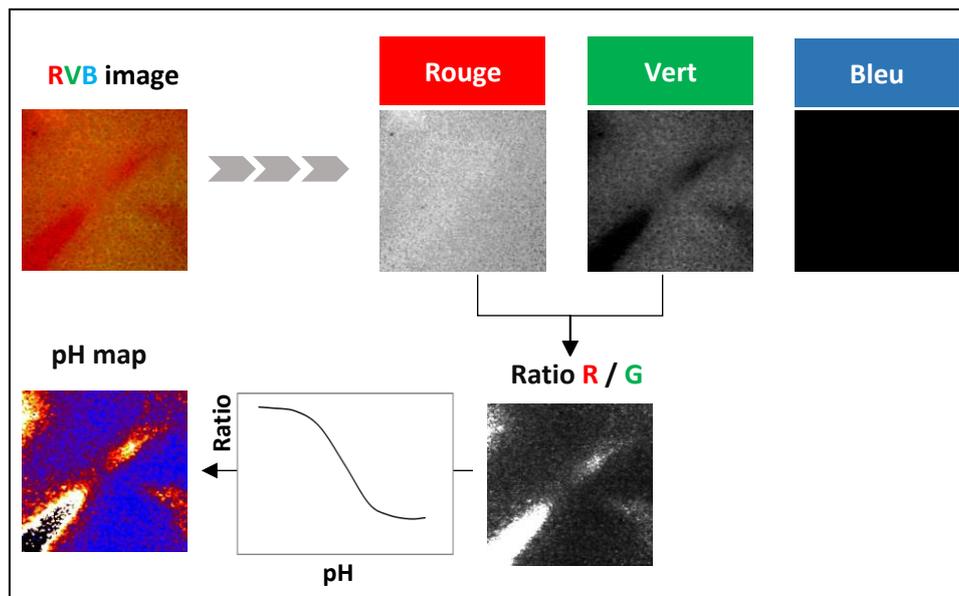


Figure 2 : Schéma de principe du traitement de l'image acquise

Ce traitement des données est réalisé par un logiciel de traitement d'image de type ImageJ (logiciel libre (<https://imagej.nih.gov/ij/>)). Ce logiciel permet d'automatiser le processus par l'écriture de macros et de procéder ainsi au traitement d'importantes séries d'images. De plus, ImageJ permet de réaliser un prétraitement de l'image si nécessaire comme par exemple un alignement spatial des images lors de l'acquisition de séries temporelles. Enfin, ces images sont ensuite utilisables pour procéder à des extractions d'informations spatiales et temporelles.

L'ensemble du système - optode et dispositif optique - peut être soit acheté directement dans le commerce via la société PreSens GmbH, soit fabriqués par soi-même. Ces derniers sont adaptables aux besoins spécifiques des utilisateurs mais demandent des compétences particulières, notamment en matière de fabrication de sondes fluorescentes et de chimie des matériaux. Le système commercial est moins flexible mais plus robuste et facile à mettre en œuvre. C'est ce dernier qui est présenté dans cet article.

En conclusion, cet outil est peu invasif puisque l'optode est posée en surface de l'échantillon. C'est donc une mesure *in situ*, non destructive. On obtient une information spatialisée puisque chaque pixel de l'image correspond à une valeur de pH. Les systèmes actuels permettent d'accéder à une résolution spatiale théorique inférieure à 100 μm et donc de suivre les phénomènes rhizosphériques à une échelle très fine, millimétrique, voire infra-millimétrique. De plus, l'utilisateur décide de la surface d'échantillon à suivre puisque l'optode peut être découpée à la taille souhaitée. Enfin, le phénomène de fluorescence étant réversible, des suivis temporels peuvent être réalisés sans perturbation de l'échantillon. Ces caractéristiques répondent bien à notre besoin pour suivre la dynamique des processus rhizosphériques à fine échelle.

Exemple d'application : suivi du pH rhizosphérique

L'application présentée ci-après a été réalisée dans le cadre d'un projet ayant pour objectif l'étude de la création d'hétérogénéités de propriétés du sol induites par des organismes « ingénieurs de l'écosystème » tels que les végétaux (une céréale et/ou une légumineuse) et la faune du sol (vers de terre), associés ou non. Les optodes ont été utilisées pour mesurer les variations spatio-temporelles du pH dans le sol, la rhizosphère des plantes étudiées et la drilosphère (sol autour des galeries de vers de terre). Les détails de la mise en œuvre expérimentale et les résultats présentés ont pour vocation d'explicitier l'utilisation pratique de cet outil et d'illustrer le type de résultats obtenus par cette technique.

Matériels et méthodes

Dispositif expérimental

L'expérimentation a été conduite en rhizobox (16 cm x 40 cm x 0.5 cm) remplis de sol tamisé à 2 mm (Luvisol, UE Auzeville) dont le pH initial était de 7.3 (Betencourt et al, 2012). Les rhizobox sont des systèmes d'observation sol-racine dans lesquelles une espèce végétale est mise en culture sur une couche de sol recouverte par une vitre transparente (ou un plexiglass) permettant de visualiser la croissance racinaire (Fig 3). L'ensemble est incliné de manière à assurer un développement des racines à la surface du sol contre la vitre. L'humidité du sol était maintenue proche de la capacité au champ par capillarité via une mèche de papier buvard. Afin de protéger la mince couche de sol lors de l'ouverture des rhizobox au cours de l'expérimentation, une toile à bluter (nylon, 30 μ m) a été positionnée à la surface du sol. L'ensemble a été fermé par une vitre en plexiglass (3 mm d'épaisseur) et recouvert d'une feuille de papier aluminium.

Après germination, les plantules de pois chiche (*Cicer arietinum* L. variété ILC 01302) inoculées avec une souche de *Rhizobium* (*Mesorhizobium ciceri*) et de blé dur (*Triticum turgidum durum* L. variété LA1823) ont été déposées à la surface du sol. Chaque rhizobox contenait deux plantules d'une même espèce ou des deux espèces en association. Les dispositifs ont été maintenus en serre pendant six semaines en position inclinée afin d'assurer un développement racinaire en surface du sol et donc visible à travers la vitre en plexiglass.

Suivi du pH par les optodes

Pour chaque rhizobox, 9 optodes pH (PreSens GmbH, HP5R, gamme de pH 5-7.5) de 1 cm² ont été fixées sur la face interne de la vitre transparente et mise au contact du sol et des racines lors de la fermeture de la rhizobox. La position des optodes a été préalablement définie de manière randomisée selon une grille régulière couvrant des zones avec et sans racines (Fig. 3). Les optodes ont été laissées en place durant toute la durée de l'expérimentation. Les rhizobox étaient recouvertes de papier aluminium afin de protéger les optodes et les racines de la lumière. En effet, une exposition prolongée des optodes à la lumière induit une dégradation prématurée des sondes fluorescentes par le phénomène de photobleaching (Lakowicz, 2006).

Les images d'optodes ont été réalisées à l'aide du système d'acquisition et d'intégration VisiSens (PreSens GmbH). Il est constitué d'une petite caméra CMOS de type microscope USB (VisiSens Detector Unit DU02) avec 8 LEDs bleues intégrées et pilotées par le logiciel VisiSens Analytical 2. L'acquisition des images est réalisée sous un carton épais et opaque afin d'éviter toute perturbation lumineuse. La résolution des images est de 1280 x 1024 pixels avec une résolution spatiale théorique de 10 μ m x 10 μ m dans nos conditions d'utilisation. La caméra est placée contre la vitre s'assurant ainsi d'une distance fixe entre l'optode et la caméra pour toutes les images. Les mesures ont commencé trois jours après la pose des optodes et une semaine après la mise en place des plantules dans les rhizobox. Elles ont été réalisées quotidiennement pendant cinq semaines.

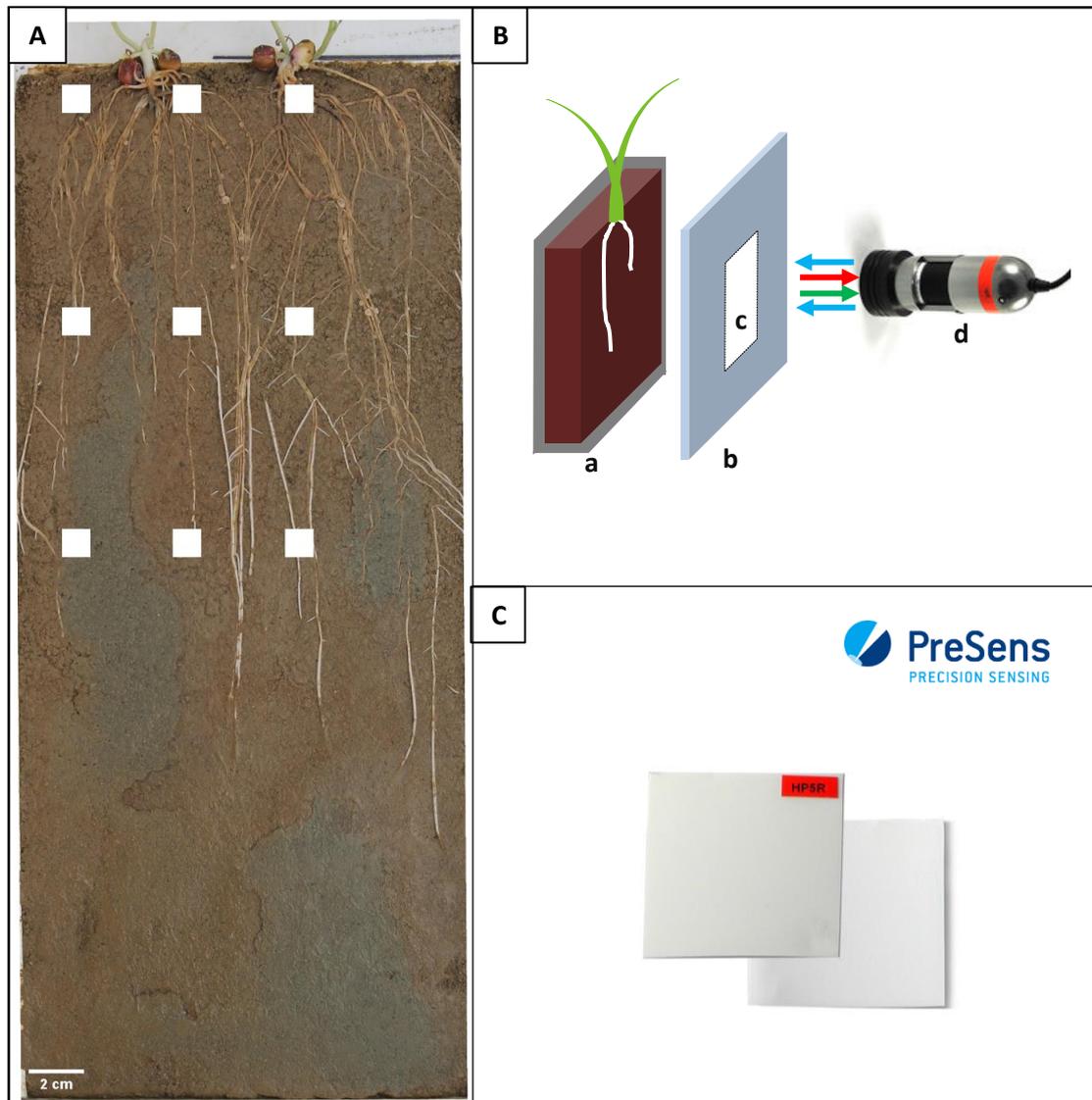


Figure 3 : Présentation du dispositif expérimental et de mesure. **A.** Photo d'une rhizobox avec deux plants de pois chiche (15j après mise en place des plantules). Les optodes de 1 cm² sont représentées par les carrés blancs. **B.** Schéma du dispositif de mesure en rhizobox avec : (a) rhizobox, (b) vitre transparente, (c) optode, (d) caméra avec LEDs intégrées. **C.** Photo d'optode pH (PreSens GmbH).

L'étalonnage des optodes a été réalisée en solution tampon phosphate-NaCl ajustée à une force ionique proche de celle de la solution du sol. Les optodes sont fixées sur une vitre de plexiglass d'une épaisseur équivalente à celle utilisée pour l'expérimentation en rhizobox (3 mm) et mises en contact avec chaque solution tampon pendant 30 minutes. Dans cet exemple, 8 solutions tampon ont été successivement utilisées, couvrant la gamme de pH de validité des optodes utilisées.

Les images sont analysées à l'aide du logiciel libre Fiji, une distribution du logiciel ImageJ (<https://fiji.sc/>). Le ratio correspondant à chaque pH est déterminé sur une ROI (région d'intérêt) définie pour l'ensemble des images acquises. La courbe d'étalonnage des optodes est présentée en figure 4. Les paramètres de l'équation de la courbe d'étalonnage sont ensuite déterminés avec le logiciel R (<https://cran.r-project.org>) par un ajustement non linéaire. A partir de l'équation (2), chaque valeur de pixel des images obtenues au cours de l'expérimentation est transformée en valeur de pH.

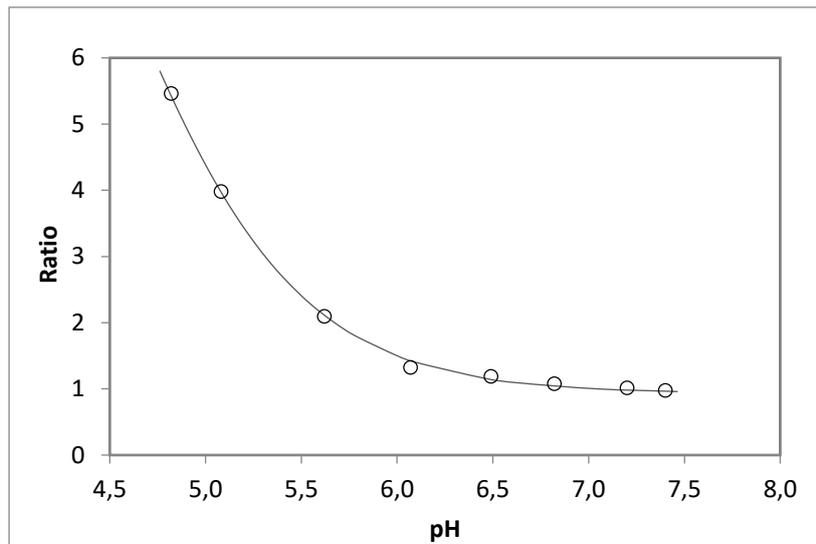


Figure 4 : Courbe d'étalonnage d'optode pH en tampon phosphate (Ratio calculé sur une ROI de 40000 pixels et moyenne de 4 étalonnages distincts)

Résultats

A partir des images quotidiennes réalisées au cours des cinq semaines d'expérimentations et de l'étalonnage des optodes, des cartes de pH sont produites. Les figures 5 et 6 présentent un exemple de carte de pH obtenues pour chaque espèce végétale, pour une optode donnée et sur une période de 10 jours. L'objectif est d'illustrer le type d'information spatiale et temporelle que l'on peut obtenir avec cette méthode sur deux espèces végétales contrastées.

La zone couverte par l'optode (4 mm x 9 mm) dans la rhizosphère du pois chiche présente un pH médian de 6.0. Sur l'ensemble de la série temporelle présentée, après un signal d'acidification intense au niveau racinaire à 15J, on note une diffusion de l'acidification qui devient moins intense au niveau de la racine, sur l'ensemble de la rhizosphère du pois chiche au cours du temps. De plus, on observe l'émergence de hotspots d'acidification localisés au niveau de l'apparition des apex des racines secondaires à 19J et 23J (Fig. 5). En revanche, la rhizosphère du blé dur présente un pH médian de 6.8 sur la zone couverte (5 mm x 4.5 mm). Les cartes de pH correspondantes présentent une évolution constante du pH sans hotspots d'acidification distinctifs, malgré l'apparition à 25J d'une racine jeune (Fig. 6).

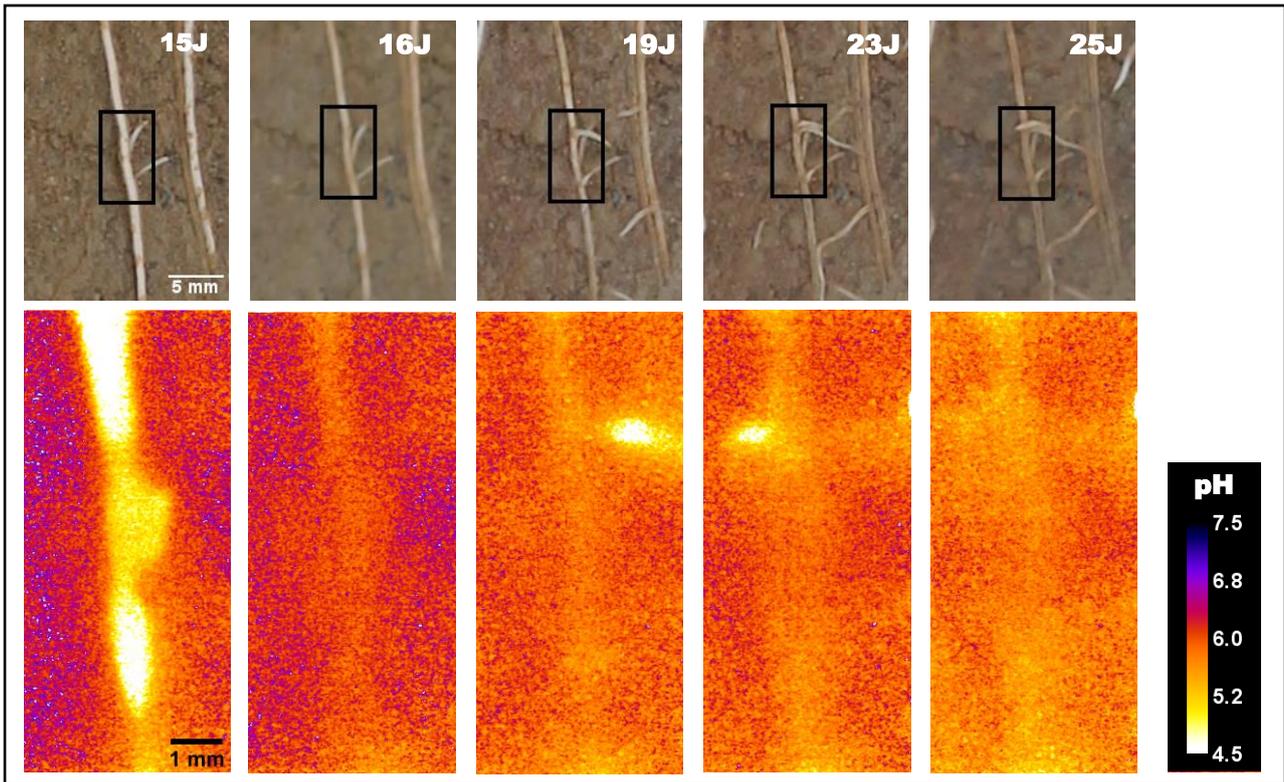


Figure 5 : Evolution du pH dans la rhizosphère du pois chiche sur une période de 10 jours (en bas). Les images en haut correspondent aux photographies de la surface de la rhizobox réalisées le même jour que la mesure après enlèvement de la vitre.

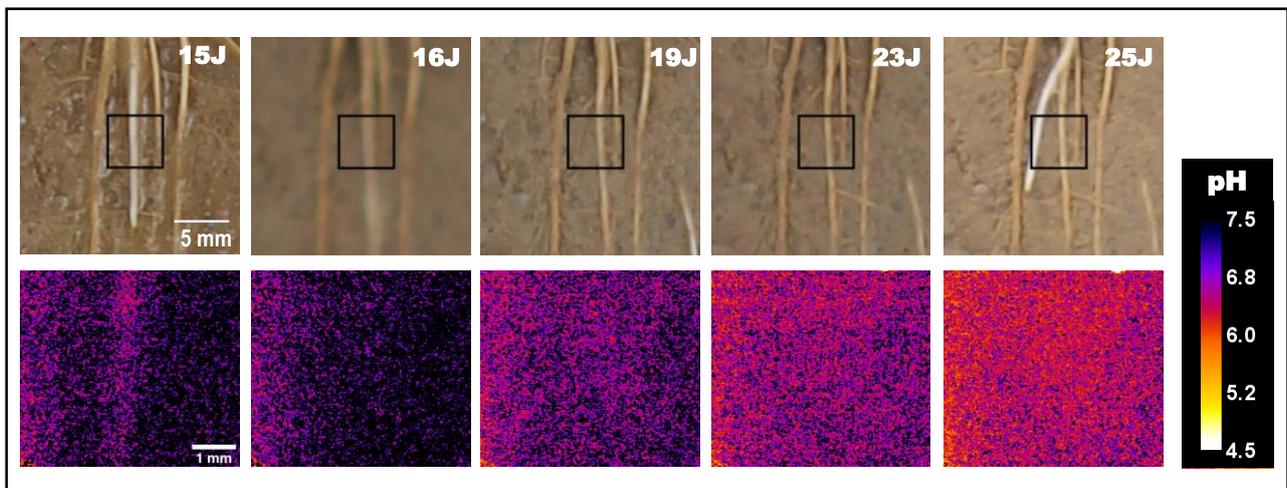


Figure 6 : Evolution du pH dans la rhizosphère du blé dur sur une période de 10 jours (en bas). Les images en haut correspondent aux photographies de la surface de la rhizobox réalisées le même jour que la mesure après enlèvement de la vitre.

Les cartes de pH présentent donc deux tendances contrastées entre le pois chiche et le blé dur, avec une très forte acidification (pH inférieur à 4.5) correspondant à l'émergence de racines de pois chiche, alors que pour le blé dur, la présence et le développement de racines induisent un changement de pH à peine visible par rapport au pH du sol environnant. Ceci est illustré par la figure 7, présentant un profil de pH sur un transect correspondant à une zone de 4 mm autour de la racine, pour le blé dur et le pois chiche.

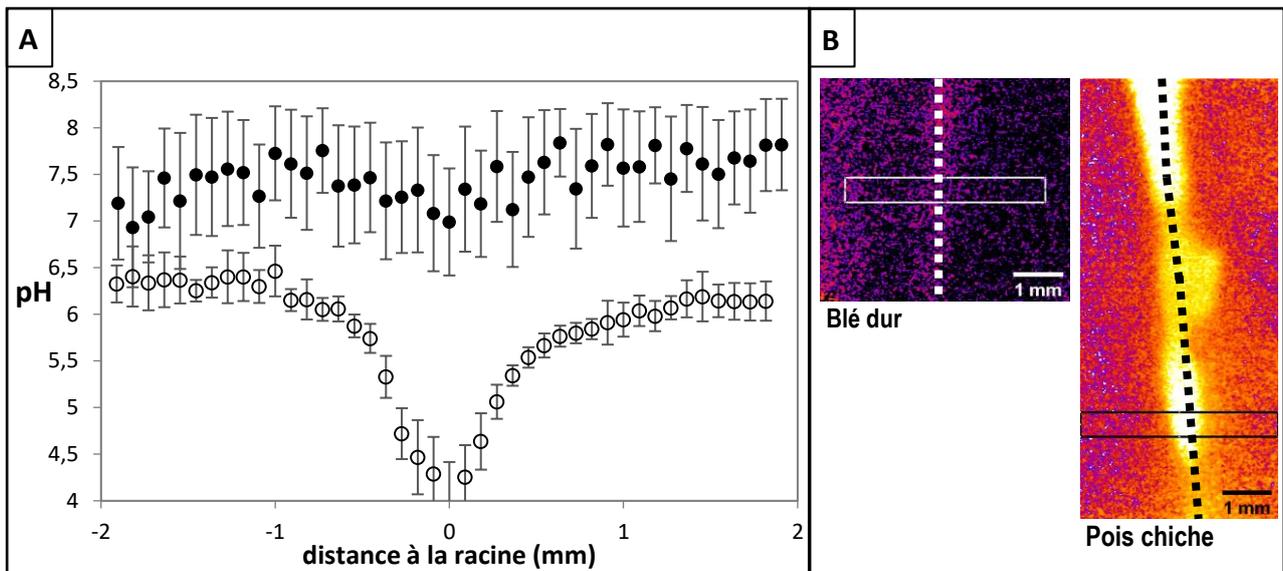


Figure 7 : A. Profil de l'évolution du pH en fonction de la distance au centre de la racine de pois chiche (○) et de blé dur (●). Chaque point représente le pH moyen de 55 pixels. B. Carte de pH avec l'emplacement de la racine indiqué en ligne pointillée et le transect en trait plein (zone de 2 mm de chaque côté de la racine).

Cet exemple de résultat montre un fonctionnement contrasté des racines selon l'espèce végétale dans des conditions de culture et de nutrition similaire, en accord avec des travaux antérieurs sur ce même sol et ces mêmes espèces végétales (Betencourt et al., 2012, Blossfeld et al., 2013). L'acidification autour des racines du pois chiche peut s'expliquer par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique N_2 grâce à la symbiose avec des bactéries symbiotiques. L'absorption de l'azote sous forme de N_2 , non chargée, induit un déséquilibre de charges lors de l'acquisition des nutriments par les racines, en faveur d'un excès de cations tels que le calcium et le potassium. L'équilibre cations/anions est alors maintenu par excrétion de protons par les racines (Bolan et al., 1991), conduisant à une forte acidification de la rhizosphère (Hinsinger et al., 2003). Cette stratégie d'acquisition de l'azote est spécifique des légumineuses. Les céréales comme le blé dur, ne pouvant fixer l'azote atmosphérique prélèvent l'azote minéral dans le sol sous forme d'ions NO_3^- (ou NH_4^+). Ainsi, en cas d'absorption majoritaire d'ions NO_3^- , les racines de blé peuvent produire une alcalinisation de la rhizosphère due à l'excrétion d'ion hydroxydes (OH^-) pour contrebalancer l'absorption d'anions (Hinsinger et al., 2003). Cette alcalinisation a été notamment montrée par Blossfeld et al. (2013), par cette même technique. Dans le cas présent, l'absence de modification de pH notable dans la rhizosphère du blé dur suggère qu'il s'est produit une acquisition de nutriments sensiblement équilibrée entre anions et cations majeurs.

Grâce à cet outil d'imagerie, l'hétérogénéité spatiale du pH rhizosphérique a été mise en évidence une nouvelle fois avec une variation spatiale infra-millimétrique et des variations temporelles selon le développement racinaire. De plus, les optodes nous ont permis de visualiser le fonctionnement contrasté de deux espèces végétales différentes, et de montrer les fortes variations localisées de pH (>2-3 unités de pH). Elles permettent surtout une quantification précise de ces modifications et leur suivi dans le temps à forte résolution spatiale ou temporelle.

Retour d'expérience

A partir de l'exemple présenté et de notre expérience après plusieurs années d'implémentation et d'adaptation dans divers dispositifs expérimentaux, nous présentons ci-dessous un retour d'expérience balayant les limites

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (?)

inhérentes au principe de la méthode et au domaine particulier d'application du sol ainsi que les avantages démontrant le potentiel de cette approche pour mieux comprendre la dynamique des processus rhizosphériques.

Limites & points de vigilance

Au regard de l'exemple présenté, la technique des optodes paraît une approche facile de mise en œuvre, notamment en utilisant le système commercial, mais l'application dans des systèmes complexes et hétérogènes tels que le sol impose une adaptation et une connaissance des limites de cet outil de mesure. Ces limites et les contraintes sont de deux ordres, celles inhérentes au principe de la méthode et celles liées au domaine d'application.

Tout d'abord, en termes de **gamme de pH**, les mesures sont limitées à des valeurs autour de $pK_a \pm 1,5$. Actuellement, les optodes disponibles sont adaptées pour des gammes de pH de 5 à 7,5 et 2,5 à 4,5 (PreSens GmbH, <https://www.presens.de/>). En dehors de ces gammes, il existe de rares publications sur la conception d'optodes adaptées à des pH alcalins (Larsen et al., 2011 ; Han et al., 2016).

Les sondes pH fluorescentes sont sensibles à la **force ionique** et l'influence est variable selon le nombre de charges des sondes (Weidgans et al., 2004; Zhu et al., 2005). La sensibilité des optodes au changement de pH diminue à faible force ionique et la courbe d'étalonnage sera donc différente selon les niveaux de force ionique du milieu d'application. Typiquement, PreSens GmbH recommande une force ionique supérieure à 50 mM, i.e. une valeur bien au-delà des forces ioniques le plus souvent rencontrées dans les solutions de sols (généralement entre 1mM et 30mM selon le type de sol et la modalité d'extraction (Alva et al., 1991; Black and Campbell, 1982). Ces optodes sont utilisables dans des milieux de faible force ionique mais il est nécessaire de réaliser les étalonnages à une force ionique proche de celle de l'échantillon.

Par ailleurs, le principe de la méthode est fondé sur une réaction chimique entre la solution du sol et les sondes fluorescentes greffées dans la matrice. Cela suppose une **quantité d'eau suffisante** dans l'échantillon permettant d'assurer d'une part un bon contact entre l'optode et l'échantillon et d'autre part une diffusion des protons dans la matrice de l'optode. Cette contrainte explique que la majorité des publications portant sur l'application d'optodes pH dans des systèmes sols concernent des études en milieu saturé ou proche de la saturation avec des humidités autour de 80 % de la capacité de rétention d'eau du sol (Hofer et al., 2017; Sun et al., 2019) et en milieu immergé (Rudolph et al., 2013; Williams et al., 2014). Les mesures dans des sols non saturés en eau sont possibles mais supposent d'être vigilant (1) à la qualité du contact entre l'optode et le sol et (2) au temps de contact nécessaire pour obtenir un signal stable. Par exemple, dans des sols sableux, il a été observé un impact de la quantité d'eau et du temps de contact sur la mesure du pH avec des optodes ainsi qu'un seuil minimum de teneur en eau en dessous duquel la mesure n'est pas fiable. Ainsi, à 49% de la capacité de rétention d'eau, le temps de stabilisation du signal était supérieur à 12h et en dessous de 12% la mesure n'était plus possible lié à l'absence de signal de fluorescence (Daudin, 2018).

D'un point de vue technique, cette méthode nécessite l'utilisation d'une **vitre d'observation** pour fixer l'optode et réaliser la mesure en surface de l'échantillon. Les phénomènes mesurés sont donc limités aux processus en surface ou à très faible distance de la surface. Aussi, la présence d'une barrière physique (vitre de la rhizobox) modifie la géométrie des processus de diffusion et peut amener à un élargissement de la zone de distribution de l'analyte (Frederiksen et Glud, 2006; Wenzhöfer et Glud, 2004).

Aussi, les optodes présentées dans cet article sont **opaques**. L'évolution physique des structures d'intérêt comme les racines n'est donc pas visible au cours de la mesure si celle-ci est réalisée sur des temps longs (plusieurs heures ou jours). Cette contrainte peut amener à des erreurs d'interprétation lors de suivis temporels avec par exemple l'observation de hotspots d'acidification faussement attribués à une racine alors que le signal est lié à une cavité (macropore) à la surface du sol (Blossfeld et al., 2013). Une solution est la prise de photo de la zone couverte par l'optode avant et après la mesure. Une autre solution est la fabrication d'optodes semi-transparentes qui

comportent cependant d'autres contraintes comme la diffusion de la lumière par les échantillons ou l'auto-fluorescence racinaire (Moßhammer *et al.*, 2016, Daudin, 2018).

Pour appliquer cette méthode dans le sol, il convient d'être vigilant à certaines conditions de mise en œuvre. Le sol est un milieu complexe et hétérogène, sur le plan de ses propriétés biogéochimiques et de sa structure. Les approches expérimentales utilisées pour ce type d'outils sont des rhizobox ou des boîtes de Pétri. Afin d'assurer un **bon contact entre le sol et l'optode**, au-delà des conditions d'humidité discutées précédemment, il est recommandé de remplir ces dispositifs d'études de manière homogène avec du sol tamisé. La présence de cavités correspondant à des macropores du sol sous l'optode peut amener à des hotspots d'acidification non pas liés à une activité racinaire mais à la présence d'un film liquide ou d'une modification des échanges gazeux dans cette zone, susceptible d'affecter le pH.

De plus, il est nécessaire de s'assurer de **la compatibilité de l'optode avec l'échantillon**. En effet, des composés organiques ou minéraux peuvent tacher ou dégrader l'optode de manière irréversible. Ceci peut mener à des interprétations erronées des signaux enregistrés. Par exemple, des optodes pH ont été appliquées dans la rhizosphère d'eucalyptus (*Eucalyptus grandis*) en sol tropical acide pendant une heure (Pradier, 2016). Une acidification a été observée autour des racines mais lorsque l'optode était placée après l'expérimentation dans des solutions tampon de pH connu, le signal racinaire était toujours visible sur les images, quel que soit le pH de la solution tampon. L'optode était donc altérée de façon irréversible. De plus, ce signal était présent sur les deux canaux Rouge et Vert, donc non spécifique du pH. Le signal détecté autour des racines lors de l'application sur les racines d'eucalyptus ne pouvait donc pas être attribué spécifiquement à une acidification de la rhizosphère. L'optode présentait d'ailleurs des taches jaunes, même après rinçage. Cette observation a été interprétée comme le signe d'une interaction irréversible entre l'optode et des composés organiques excrétés par les racines, masquant *in fine* le signal de fluorescence de la sonde pH et dégradant l'optode. Il convient de noter que ces observations n'ont pas été faites en rhizobox mais au champ, dans un puits d'accès à un profil de sol profond en plantation forestière au Brésil (Pradier, 2016) et que, dans les mêmes conditions, de tels effets n'ont pas été observés avec des racines d'autres espèces végétales forestières comme le pin ou l'acacia.

Enfin, **la durée de vie** des optodes dans le sol varie de quelques minutes à plusieurs semaines selon ses propriétés et ce point important n'est pas documenté à ce jour. Il est indispensable de s'assurer de leur état en fin d'expérimentation afin de tenir compte du vieillissement de l'optode dans l'analyse. Pour cela, il est conseillé de réaliser un contrôle des optodes après expérimentation dans des solutions tampons de pH connu permettant de vérifier l'absence de zones dégradées et le maintien des performances de l'optode après expérimentation.

Ces différentes contraintes et limites liées à la méthode appliquée dans le milieu complexe sol-plante, expliquent son utilisation encore limitée dans ce domaine d'application.

Avantages

Malgré les limites et difficultés présentées, cette technique présente des avantages majeurs justifiant l'intérêt croissant pour cette approche.

Basée sur le principe **réversible** de fluorescence, cette méthode permet la réalisation de suivis temporels sans modification ni perturbation de l'échantillon, contrairement aux mesures par électrode ou par extraction.

De plus, l'optode étant placée sur une vitre posée en surface de l'échantillon et le matériel optique découplé du capteur, la méthode est **non invasive** et permet donc d'accéder à une mesure du pH au plus près des conditions réelles de culture.

La mesure consistant en la prise d'image du capteur, on obtient une matrice de **données spatialisées** contrairement aux mesures ponctuelles réalisées avec des électrodes.

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (?)

La combinaison de ces 3 critères fait de cette approche *in situ* une technique qui **associe données spatiales et temporelles et cela de manière non invasive**.

D'un point de vue du matériel, le capteur peut être découpé à **la taille voulue**, la taille de la zone couverte étant principalement limitée par le champ de vision de la caméra. Dans l'exemple présenté, le champ de vision était inférieur au cm^2 . Les systèmes optiques proposés par PreSens permettent aujourd'hui de couvrir une zone théorique maximum de 30 x 25 cm. La zone d'étude est donc large et permet d'envisager des suivis de plusieurs racines ou de plusieurs zones racinaires en une seule image.

De plus, **la résolution spatiale** minimum théorique est de 10 μm , soit une valeur largement suffisante pour suivre des phénomènes dynamiques à une échelle millimétrique ou infra-millimétrique. On obtient une donnée quantitative au plus près de la racine et il est ainsi possible d'évaluer sa zone d'influence, i.e. les gradients rhizosphériques à fine échelle.

Le système de mesure est portable et peut s'adapter à différents types d'objets et conditions d'expérimentations à partir du moment où la surface de l'échantillon est plane et permet l'apposition de l'optode. L'équipement nécessaire est relativement réduit puisqu'il s'agit d'une caméra et d'un ordinateur. Le système présenté dans cet article associe en un seul appareil la source de lumière d'excitation et la caméra CMOS.

Enfin, il est tout à fait possible de **concevoir son propre système** optique à faible coût (<1000 €) à partir d'un appareil photo CMOS et de placer à côté une source de lumière sous forme de LEDs (Larsen et al., 2011; Wang et al., 2010). A titre de comparaison, le système optique PreSens (VisiSens TD, camera avec un champ de vision équivalent à celui d'un appareil photo) sans les optodes présente un coût supérieur à 5000€.

Les optodes peuvent aussi être fabriquées par soi-même afin de les adapter à ses propres besoins (Daudin, 2018) même si cela nécessite, du moins pour les optodes pH, des compétences spécifiques en conception de sondes fluorescentes et en chimie des matériaux. En revanche, des optodes O_2 peuvent être fabriquées assez facilement par soi-même à partir de sondes fluorescentes du commerce (Larsen et al., 2011).

Conclusion et perspectives

Les optodes planaires, capteurs chimiques et optiques fondés sur une mesure de fluorescence, sont une technique encore peu répandue mais prometteuse pour l'étude *in situ* et non invasive des interactions sol-racine-microorganisme et, plus généralement, des hotspots d'activité biologique dans le sol.

Cette technique combine l'avantage d'être peu invasive et réversible. Elle permet d'accéder à une **information spatiale et temporelle** d'une même zone d'étude, avec une résolution infra-millimétrique, et donc à la **dynamique des processus**, comme par exemple, la croissance d'une racine. Ainsi, il est possible d'étudier le fonctionnement racinaire sur plusieurs jours sans perturbation. Cette approche est transposable à tout suivi de processus dynamique induit par un apport externe ou par l'hétérogénéité de l'échantillon comme l'apport localisé d'engrais ou d'amendement organique, l'apport d'élément toxique, etc..., ou pour cartographier et suivre l'évolution temporelle d'hétérogénéités induites par la faune du sol.

Malgré l'apparence d'une technique facilement adaptable, il est important de garder à l'esprit les limites et les conditions adéquates d'utilisation dans le sol : bon contact sol-optode, humidité suffisante, absence de dégradation des optodes après utilisation, influence de la force ionique. L'application d'optode dans des systèmes sol-plante pour étudier les phénomènes rhizosphériques présente des difficultés réelles, d'autant plus importantes dans des sols non saturés en eau, expliquant le faible nombre de publications.

Elle présente cependant un potentiel important et encore peu exploité. N'impliquant pas de dispositif de mesure complexe, elle ouvre la possibilité d'un déploiement sur le terrain. Notre perspective principale en terme d'application et jamais documentée jusqu'à ce jour est donc l'utilisation des optodes directement au champ, au plus

près des conditions réelles de cultures. Cette application nécessite cependant la construction de fosses d'observation des racines. Notre essai infructueux au Brésil sur une plantation d'eucalyptus a montré les difficultés d'adaptation en condition de terrain. Une réflexion doit être conduite pour contourner ces difficultés et utiliser cet outil au plus près des conditions réelles.

Les applications aujourd'hui documentées dans la littérature scientifique ne concernent que des espèces végétales annuelles comme le maïs, le blé, le lupin ou le pois chiche. Après l'essai infructueux sur l'Eucalyptus, nous envisageons d'explorer par cette méthode le fonctionnement racinaire d'autres espèces végétales pérennes. Des essais préliminaires sur des plants de robinier en rhizobox et sur des racines d'acacia ou de pin sur le terrain n'ont pas montré d'incompatibilité avec les optodes pH.

Enfin, les perspectives d'application s'élargissent avec l'émergence d'autres techniques de mesure *in situ* pour suivre des paramètres complémentaires et influencés par le pH. De récentes publications ont montré l'application conjointe des optodes pH avec des optodes O₂, ainsi qu'avec d'autres techniques d'imagerie comme la radiographie neutronique pour cartographier l'eau (Rudolph-Mohr *et al.*, 2017) ou la DGT (Diffusive gradients in thin film) couplée à l'analyse par LA-ICP-MS (Laser Ablation Coupled Plasma Mass Spectrometry) pour cartographier les éléments minéraux (Hoefler *et al.*, 2015). Cette technique peut aussi se coupler à une autre méthode chimique *in situ* très utilisée depuis quelques années pour cartographier l'activité enzymatique dans les sols, la zymographie (Ma *et al.*, 2019) et donc accéder simultanément à plusieurs paramètres du fonctionnement rhizosphérique .

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'Inra », la date de sa publication et son URL).

Bibliographie

Alva AK, Sumner ME, Miller, WP, (1991). Relationship between ionic strength and electrical conductivity for soil solutions. *Soil Sci.* 152, 239.

Betencourt E, Duputel M, Colomb B, Desclaux D, Hinsinger P (2012) Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. *Soil Biol. Biochem.* **46** : 181–190.

Black AS, Campbell AS, (1982) Ionic strength of soil solution and its effect on charge properties of some New Zealand soils. *J. Soil Sci.* **33** : 249–262.

Blossfeld S, Gansert, D (2007) A novel non-invasive optical method for quantitative visualization of pH dynamics in the rhizosphere of plants. *Plant Cell Environ.* **30** : 176–186.

Blossfeld S, Schreiber CM, Liebsch G, Kuhn AJ, Hinsinger P (2013) Quantitative imaging of rhizosphere pH and CO₂ dynamics with planar optodes. *Ann. Bot.* **112** : 267–276.

Bolan NS, Hedley MJ, White RE (1991) Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pastures. *Plant Soil.* **134** : 53-63.

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (?)

- Daudin G (2018) In situ measurement of pH and O₂ by planar optodes: improvements and adaptation for soil and rhizosphere applications. Mémoire Ingénieur CNAM Paris, 141p.
- Frederiksen MS, Glud RN (2006) Oxygen dynamics in the rhizosphere of *Zostera marina*: A two-dimensional planar optode study. *Limnol. Oceanogr.* **51** : 1072–1083.
- Han C, Yao L, Xu D, Xie X, Zhang C (2016) High-resolution Imaging of pH in Alkaline Sediments and Water Based on a New Rapid Response Fluorescent Planar Optode. *Sci. Rep.* **6** : 26417.
- Häussling M, Leisen E, Marschner H, Römheld V (1985) An Improved Method for Non-destructive Measurements of the pH at the Root-Soil Interface (Rhizosphere). *J. Plant Physiol.* **117** : 371–375.
- Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil.* **321** : 117–152.
- Hinsinger P, Gobran GR, Gregory PJ, Wenzel WW (2005) Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* **168** : 293–303.
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil.* **248** : 43–59.
- Hoefler C, Santner J, Borisov SM, Wenzel WW, Puschenreiter M (2017) Integrating chemical imaging of cationic trace metal solutes and pH into a single hydrogel layer. *Anal. Chim. Acta.* **950** : 88–97.
- Hoefler C, Santner J, Puschenreiter M, Wenzel WW (2015) Localized Metal Solubilization in the Rhizosphere of *Salix smithiana* upon Sulfur Application. *Environ. Sci. Technol.* **49** : 4522–4529.
- Jaillard B, Ruiz L, Arvieu JC, (1996) pH mapping in transparent gel using color indicator videodensitometry. *Plant Soil.* **183** : 85–95.
- Lakowicz JR (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed. Springer US, 954p.
- Larsen M, Borisov SM, Grunwald B, Klimant I, Glud RN (2011) A simple and inexpensive high resolution color ratiometric planar optode imaging approach: application to oxygen and pH sensing. *Limnol. Oceanogr. Meth.* **9** : 348–360.
- Larsen M, Santner J, Oburger E, Wenzel WW, Glud RN (2015) O₂ dynamics in the rhizosphere of young rice plants (*Oryza sativa* L.) as studied by planar optodes. *Plant Soil.* **390** : 279–292.
- Ma X, Mason-Jones K, Liu Y, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y, Guber A, Dippold MA, Razavi BS (2019) Coupling zymography with pH mapping reveals a shift in lupine phosphorus acquisition strategy driven by cluster roots. *Soil Biol. Biochem.* **135** : 420–428.
- Moßhammer M, Strobl M, Köhl M, Klimant I, Borisov SM, Koren K (2016) Design and Application of an Optical Sensor for Simultaneous Imaging of pH and Dissolved O₂ with Low Cross-Talk. *ACS Sens.* **1** : 681–687.
- Pedersen LL, Smets BF, Dechesne A (2015) Measuring biogeochemical heterogeneity at the micro scale in soils and sediments. *Soil Biol. Biochem.* **90** : 122–138.

- Pradier C. (2016) Rôles fonctionnels des racines fines profondes en plantation d'eucalyptus au Brésil sur sols pauvres en nutriments et en situation hydrique limitante. Réponse à une situation hydrique limitante. Thèse de Doctorat : Montpellier SupAgro.225 p.
- Glud RN, Ramsing NB, Gundersen JK, Klimant I (1996) Planar optodes: a new tool for fine scale measurements of two-dimensional O₂ distribution in benthic communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **140** : 217–226.
- Rudolph N, Voss S, Moradi AB, Nagl S, Oswald SE (2013) Spatio-temporal mapping of local soil pH changes induced by roots of lupin and soft-rush. *Plant Soil.* **369** : 669-680
- Rudolph-Mohr N, Tötze C, Kardjilov N, Oswald SE (2017) Mapping water, oxygen, and pH dynamics in the rhizosphere of young maize roots. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **180** : 336–346.
- Schreiber CM, Zeng B, Blossfeld S, Rascher U, Kazda M, Schurr U, Hoeltkemeier A, Kuhn AJ (2012) Monitoring rhizospheric pH, oxygen, and organic acid dynamics in two short-time flooded plant species. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **175** : 761–768.
- Sun X, Li Z, Wu L, Christie P, Luo Y, Fornara DA (2019) Root-induced soil acidification and cadmium mobilization in the rhizosphere of *Sedum plumbizincicola*: evidence from a high-resolution imaging study. *Plant Soil.* **436** : 267–282.
- Wang X, Meier RJ, Link M, Wolfbeis OS (2010) Photographing Oxygen Distribution. *Angew. Chem.* **122** : 5027–5029.
- Weidgans BM, Krause C, Klimant I, Wolfbeis OS (2004) Fluorescent pH sensors with negligible sensitivity to ionic strength. *The Analyst.* **129** : 645-650.
- Wenzhöfer F, Glud RN (2004) Small-scale spatial and temporal variability in coastal benthic O₂ dynamics: Effects of fauna activity. *Limnol. Oceanogr.* **49**: 1471–1481.
- Williams PN, Santner J, Larsen M, Lehto NJ, Oburger E, Wenzel W, Glud RN, Davison W, Zhang H (2014) Localized Flux Maxima of Arsenic, Lead, and Iron around Root Apices in Flooded Lowland Rice. *Environ. Sci. Technol.* **48** : 8498–8506.
- York LM, Carminati A, Mooney SJ, Ritz K, Bennett MJ (2016) The holistic rhizosphere: integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. *J. Exp. Bot.* **67** : 3629–3643.
- Young IM, Crawford JW (2004) Interactions and Self-Organization in the Soil-Microbe Complex. *Science.* **304** : 1634–1637.
- Zhu QZ, Aller RC, Fan YZ (2005) High-performance planar pH fluorosensor for two-dimensional pH measurements in marine sediment and water. *Environ. Sci. Technol.* **39** : 8906–8911.