

N° d'ordre : 42536

Année 2017

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITE DE LILLE – SCIENCES ET TECHNOLOGIES

École Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR

Spécialité : Optique, Lasers, Physico-Chimie, Atmosphère

Par

Cécilia FALANTIN

Influence du soufre sur la complexation de cations métalliques par la matière organique dissoute : du milieu naturel au modèle.

Soutenue le 06 décembre 2017, devant le jury composé de :

Dr Patricia MERDY	Université de Toulon	Rapporteuse
Pr Cédric CARTERET	Université de Nancy	Rapporteur
Dr Yann BATONNEAU	Université de Poitiers	Examineur
Pr Baghdad OUDDANE	Université de Lille	Examineur
Pr Jean-Paul CORNARD	Université de Lille	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR UMR 8516 CNRS) au sein de l'équipe « Physicochimie de l'environnement ». Je souhaite tout d'abord remercier M. Hervé Vezin, directeur du LASIR, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire durant ces trois années.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail. J'exprime ma profonde gratitude à Mme Patricia Merdy et M. Cédric Carteret de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce manuscrit ainsi qu'à M. Yann Batonneau qui a accepté d'en être l'examineur. Enfin mes sincères remerciements à M. Baghdad Ouddane, qui a accepté de faire partie de ce jury et qui depuis ma deuxième année de master m'a apporté son soutien.

J'exprime une reconnaissance toute particulière à M. Jean-Paul Cornard, mon directeur de thèse, pour avoir accepté de m'encadrer. Merci de m'avoir laissée, durant ces trois années, une grande liberté d'action et d'avoir toujours répondu avec patience et humour à mes questions « quantiquement existentielles ». Je remercie également ma co-encadrante Mme Annaïg Le Person.

Je souhaite remercier tout particulièrement M. Jean-Phillipe Croué de m'avoir accueillie pendant six mois au CWQRC. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée, pour l'expérience et l'ensemble des connaissances pluridisciplinaires que j'ai pu acquérir au cours de ces six mois.

Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à M. Gabriel Billon, pour ses idées, les campagnes de prélèvements (« tu vas voir c'est génial ça sent le soufre !»), nos discussions pertinentes de mes résultats et ses encouragements.

Ces trois années de thèse ont été ponctuées de nombreuses rencontres et de très nombreuses péripéties et je tenais à remercier les personnes qui y ont contribué de manière directe ou indirecte.

En Australie, j'aimerais remercier Sébastien Allard, maître de stage de master 2, qui m'a aidée à revenir profiter de l'été australien. Merci à Ina pour ces innombrables sorties à la découverte de l'Australie, de la Croatie et de nouveaux cocktails. Merci à Noor pour ces aventures à Bali et notre escalade du Mont Batur au milieu de la nuit et à Valentin pour ce roadtrip improvisé, je me souviendrais longtemps du canard confit au bord de l'océan. Merci à Julie pour tes conseils et aussi les fous rires qui m'ont permis de retrouver le moral. Merci à Ionut pour ces discussions qui m'ont permises d'améliorer un peu mon anglais. Merci à Deb pour son aide précieuse au labo et à Xi-Zhi pour son interprétation des résultats de FT-ICR-MS. Un grand merci également à Rhys, Elliot, Maolida, Zuo Tong « The Taxi driver », Jaime, Rachel, Suoana, Claire et les frenchies Jean-Baptiste, Béatrice, Huu Huynh et Ludwig pour avoir rendu ce séjour inoubliable.

Je remercie également l'ensemble du personnel du LASIR et plus particulièrement :

Matthieu Hureau pour son support scientifique, technique et moral. Je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ces trois années et pour tous ces gâteaux sans gluten.

Jean-Pierre et ses qualités de technicien auto ainsi que « l'amiral groin-groin » Pascal, pour tous ces repas (entre autres) partagés à l'atelier. Vincent dit « Tchoupi » pour la magnifique rhinoplastie qu'il m'a faite au détour d'un couloir du LASER Game. Catherine dite « Maman » et Myriam dite « Tata » pour leur écoute, leur disponibilité et leurs conseils. Jérémy dit « Chouchou » pour son aide précieuse pour mes dernières manips. Aurélien pour ses calculs de chimie quantique, macros Excel, et relecture à la dernière minute. Merci également à Cyrille, Emilie, Isabelle, Julien, Luc, Marie-Jo, Viviane, Yeny, et Zora pour sa distribution quotidienne du journal. Enfin, j'ai une pensée pour nos chats de labo Chat-pito, Chat-kira et Chat-pardeur.

L'ensemble du « deuxième étage » où j'ai fait mes premiers pas dans le monde de la recherche. Merci à Justine Criquet de m'avoir donnée l'opportunité et de m'avoir encadrée lors de mes deux stages de master et d'avoir continué à m'encourager durant cette thèse. Merci à Pierre-Jean Superville pour son aide lors de mes débuts en fluorescence et lors des prélèvements ainsi que pour ses macros Excel et ses lignes de code Matlab. Merci à Ludovic Lesven pour sa bonne humeur et son esprit de partage. Merci à Sopheak Net de m'avoir accompagnée dans mes débuts dans l'enseignement.

Je salue également bien bas tous les actuels et anciens thésards du LASIR, les bretons Thomas et Silvère, le belge Siewert, Anastasia, Camille, Henry, Josselin, Junias, Manu, Marion, Mattéo, Pratima et Yevheniia.

Un grand Merci à Diksha dite « Chaton » et Lucie dite « Py'teck » pour ces fous rires et ces nombreux moments de détente durant cette période de rédaction. Je vous souhaite bon courage pour la suite de vos thèses. Restez comme vous êtes et surtout n'oubliez pas Jean-Guy et ses groseilles.

Un immense bravo à Samantha dite « p'tit bouchon », ma coloc de bureau qui durant ces trois années a supporté patiemment tous mes états d'âme. Merci d'avoir été présente et de toujours avoir répondu à « t'écris ça comment ? ». Je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Merci également à Marie, Marine, Guillaume et Elodie pour m'avoir écoutée et encouragée.

Et je ne pourrais oublier de remercier très sincèrement mes parents, mes sœurs, Charlotte et Aurore, Alex et mes grands-mères qui m'ont permis d'en arriver là et qui m'ont toujours soutenue dans les choix que j'ai effectués.

Bonne lecture.

Glossaire

3-OHF : 3-hydroxyflavone

3-OHFT : 3-hydroxyflavothione

AF : Acide Fulvique

AH : Acide Humique

BDO : Benzènediol

BDT : Benzènedithiol

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières

COD : Carbone Organique Dissous

DCE : Directive Cadre Européenne sur l'Eau

EFA : Evolving Factor Analysis

Em : Emission

Ex : Excitation

FA : Fulvic Acid

FT-ICR-MS : Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance

HPO : Fraction Hydrophobe

IF : Indice de Fluorescence

IHSS : International Humic Substances Society

JWW : Jeddah Wastewater

L : Ligand

M : Métal

MEEF : Matrice Excitation Emission de Fluorescence

MO : Matière Organique

MOA : Matière Organique Atrophique

MOD : Matière Organique Dissoute

MON : Matière Organique Naturelle

NPOC : Non Purgeable Organic Carbon

PARAFAC : Parallel Factor Analysis

PL : Pony Lake

PL_FA : Pony lake Fulvic Acid

qBBR : monobromo(triméthylammonio)bimane

SR : Suwannee River

SR_HPOA : Suwannee River Hydrophobic Acid

STEU : Station d'Épuration Urbaine

SUVA : Specific Ultra-Violet Absorbance

TPH : Fraction transphilique

XANES : X-ray Absorption Near Edge Structure

Tables des matières

Remerciements	1
Glossaire	3
Introduction générale	5
Chapitre I : Synthèse bibliographique	11
I. La matière organique	10
1. Origine	10
2. Nature et composition	11
3. Caractérisation chimique de la MOD	13
II. Interactions MOD – métaux	15
1. Les métaux dans les systèmes naturels	15
2. Le rôle de la matière organique dans la spéciation des métaux	22
3. Site de complexation ou groupements fonctionnels de la matière organique	23
III. Interactions molécules modèles – métaux	25
1. Propriétés et structures des polyphénols	25
2. Choix des molécules modèles	26
Références bibliographiques	28
Chapitre II : Techniques et conditions expérimentales	34
I. Description des échantillons de matière organique	34
1. Les sites d'étude	34
2. Les extraits de matière organique	38
II. Techniques analytiques	40
1. Spectroscopie UV-visible	40
2. Spectroscopie de fluorescence	41
3. Dispositif et suivi expérimental	44
III. Caractérisation de la matière organique dissoute	45
1. Stratégie d'échantillonnage	45
2. Carbone organique dissous	45
3. Le paramètre SUVA	46
4. Détermination des groupements thiols	47
5. Indice de Fluorescence	48
6. MEEF	48
7. PARAFAC	49
8. Spectromètre de masse à transformée de Fourier (FT-ICR-MS)	55

IV. Caractérisation des complexes métalliques	56
1. Cas de la MOD et des extraits de MOD.	56
2. Cas des molécules modèles	58
Références bibliographiques :	63
Chapitre III : Caractérisation de la MOD d'eau naturelle et complexation métallique	68
I. Evaluation de la composition de la Matière organique dissoute	68
1. La Marque et le lac du Héron	68
2. Germignies	77
3. Comparaison des sites	81
II) Etude de la complexation de cations métalliques	82
1. Détermination la concentration des groupements thiols	82
2. Suivi de complexation	83
3. Modélisation PARAFAC	85
4. Modèle de Ryan et Weber	90
Conclusion	98
Références bibliographique :	101
Chapitre IV : Caractérisation d'extrait de MO et complexation métallique	103
I. Caractérisation des fractions de matière organique	104
1. Analyse élémentaire	104
2. Spectroscopie UV-Visible et de fluorescence	105
3. Spectrométrie de masse à résonance cyclonique ionique (FT-ICR-MS)	111
4. Détermination des groupements thiols	116
II. Suivi de la complexation métallique	117
1. Fractions Suwannee River et Pony Lake	118
2. Fractions de Jeddah	120
III. Discussion	129
1. Comparaison extraits eaux de surface / eaux usées	129
2. Comparaison eaux de surface non extraites / extraites	131
Conclusion	132
Références bibliographiques :	134

Chapitre V : Complexation de cations métalliques par des molécules modèles oxygénées et soufrées de la famille des polyphénols : Etude de la 3-hydroxyflavone et de la 3-hydroxyflavothione _____ 137

I. Structure et propriétés des flavonoïdes _____ 137

1. Structure et propriétés générales _____ 137
2. Propriétés spectroscopiques _____ 138

II. Complexation des cations métallique Zn(II), Pb(II), Cd(II), Ni(II) et Co(II) par la 3-OHF et 3-OHFT _____ 143

1. Complexation de Zn(II) _____ 144
2. Complexation de Pb(II), Ni(II), Co(II), et Cd(II) _____ 148
3. Comparaison des propriétés complexantes _____ 151

III. Complexation du Cu(II) par la 3-OHF et la 3-OHFT _____ 159

1. Suivi de complexation par spectroscopie UV-Visible _____ 160
2. Spectroscopie de fluorescence _____ 167

Conclusion _____ 170

Références bibliographiques : _____ 173

Chapitre VI : Complexation de cations métalliques par des molécules modèles oxygénées et soufrées de la famille des polyphénols : Etude du benzènediol et du benzènedithiol _ 176

I. Structure et propriétés _____ 175

1. Structure et états de protonation _____ 175
2. Propriétés spectroscopiques _____ 177

II. Suivi de la complexation des cations métalliques _____ 179

1. Etude du benzènediol _____ 179
2. Etude du Benzènedithiol _____ 180
3. Discussion _____ 187

Conclusion _____ 189

Références bibliographiques : _____ 191

Conclusions générales et perspectives _____ 193

Annexe _____ 196

Introduction générale

La présence de substances métalliques dans les écosystèmes aquatiques est devenue une considération majeure au cours des dernières décennies. En effet, de nombreux métaux sont répertoriés dans la liste des substances surveillées par la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE). Certains de ces éléments métalliques sont essentiels à l'organisme à de faibles doses et toxiques en plus grande quantité (Zn, Co, Cu, Ni, etc.), et d'autres n'ayant aucune fonction pour les organismes aquatiques (Pb, Cd, etc.) sont considérés comme toxiques à toute concentration. Il paraît donc important de déterminer les paramètres qui conditionnent la spéciation chimique de ces métaux. Parmi les différents paramètres physicochimiques susceptibles d'influencer la biodisponibilité des métaux, la concentration, le pH et la nature de la matière organique dissoute (MOD) sont sans aucun doute parmi les paramètres les plus importants. En effet, la MOD a généralement une grande capacité d'interaction avec les micropolluants métalliques et organiques (Suffet et al. 1994, Buffle et al. 1998), ce qui peut modifier leur biodisponibilité (Campbel 1995, Haitzer et al. 1999). La matière organique dissoute est donc un des facteurs clé pour la définition de la fraction biodisponible des contaminants.

La MOD dans les systèmes aquatiques est constituée d'un mélange extrêmement complexe de molécules dont la majorité n'est pas structurellement identifiée à l'heure actuelle (Filella 2008). L'origine, la structure, la composition et les propriétés physiques et chimiques de la MOD sont très hétérogènes et évoluent souvent dans le temps. La MOD regroupe donc aussi bien des molécules de structures et de réactivités simples, présentant peu de groupements fonctionnels que des macromolécules de grande taille possédant une densité forte en sites aux propriétés très variées. La caractérisation de la matière organique naturelle n'est donc a priori pas aisée. Pour autant elle est indispensable afin de correctement quantifier son pouvoir complexant des métaux traces. La caractérisation de la MOD dans les eaux naturelles nécessite le recours à des techniques d'analyses diverses qui se heurtent depuis des décennies à la complexité de ces substances naturelles. Parmi toutes les méthodes développées, la spectroscopie de fluorescence s'avère particulièrement adaptée à l'étude de la MOD dans les eaux naturelles (Mopper et al. 1993, Coble 1996, de Souza Sierra et al. 1997). Cette technique, qui présente le très grand avantage d'être très sensible, de ne nécessiter aucun traitement préalable et de n'entraîner aucune modification intrinsèque de l'échantillon, reste cependant une méthode globale et ne permet pas une caractérisation moléculaire précise des différents constituants de la MOD. Elle permet néanmoins, de suivre très facilement l'évolution du matériel organique dissous, tant sur le plan qualitatif que semi-quantitatif.

Durant les cinq dernières décennies, l'influence de la MOD vis-à-vis de la complexation et la spéciation des ions métalliques dans les eaux de surface a été très étudiée comme en témoignent de

nombreuses synthèses bibliographiques (Ure et al. , Florence et al. 1980, Buffle 1988, Batley 1989, Tessier et al. 1995, Town et al. 2000). Parmi tous ces facteurs, les groupements complexants (ou sites) présents sur la MOD ont un rôle prépondérant puisqu'ils peuvent complexer fortement les métaux et donc modifier leurs formes chimiques dominantes et leur réactivité vis-à-vis de l'écosystème. Il est intéressant de noter que la quasi-totalité de ces études est consacrée aux propriétés de complexations des sites les plus abondants qui sont les groupements carboxyliques et phénoliques. Les interactions avec les groupements fonctionnels moins abondants comme les thiols ou les amines sont quant à elles beaucoup moins étudiées. Or il a été démontré que ces groupements moins nombreux forment des complexes MO-métal plus forts qu'avec les groupements les plus abondants (Tipping 1998, Smith et al. 2002, Karlsson et al. 2007).

Il s'avère donc absolument primordial d'étudier plus précisément la nature et les potentiels sites de fixation de la MOD afin d'appréhender de façon plus juste la mobilité, la dispersion et le devenir des contaminants dans les systèmes aquatiques. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail, qui a pour but une meilleure compréhension de la complexation des ions métalliques dans les milieux aquatiques par différents sites chélatants oxygénés et soufrés de la MOD. Pour atteindre ces objectifs, des méthodes de chimométrie et de chimie quantique combinées à la spectroscopie électronique ont été utilisées. Les travaux présentés dans ce mémoire sont axés autour de trois types de MO : la MOD issue directement du milieu naturel, de la MOD fractionnée et des composés modèles de la MO. Dans chacune des trois classes de MO, des échantillons soufrés seront comparés à des échantillons oxygénés pour permettre d'évaluer l'influence de la présence de sites soufrés sur les propriétés complexantes des cations métalliques par la MOD.

Ainsi, nous avons travaillé non seulement sur des substances naturelles mais aussi sur des modèles qui sont représentatifs de par leurs groupements fonctionnels de la MOD. Nous avons notamment choisi deux groupements particuliers, connus pour avoir des propriétés complexantes des cations métalliques : l'hydroxy-cétone et le catéchol (Boudet et al. 2000, Dangleterre et al. 2005, Lapouge et al. 2010). Ces deux sites sont récurrents dans les substances organiques naturelles. L'influence de la substitution de l'oxygène par le soufre sur les propriétés de fixation des cations métalliques a été longuement étudiée au moyen de la spectroscopie moléculaire couplée aux méthodes de chimie quantique (étude réalisée au sein de l'équipe).

Ce manuscrit est constitué de six chapitres. Le premier chapitre consiste en une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur la composition de la MOD et de ces interactions avec les cations métalliques ainsi qu'une brève présentation des métaux et des molécules modèles étudiés.

Le second chapitre décrit l'ensemble des techniques spectroscopiques et modes opératoires mis en œuvre pour la caractérisation des complexes formés ainsi que l'origine des différentes MO, et leurs méthodes de caractérisation.

Le troisième chapitre est consacré à la caractérisation de la MOD issue de deux sites d'études de la région aux caractéristiques environnementales différentes et à la détermination des interactions entre cette MOD et trois cations métalliques d'intérêt environnemental.

Le quatrième chapitre détaille, de la même façon que le chapitre 3, les caractéristiques de quatre fractions de MO aux spécificités diverses ainsi que leurs propriétés de complexation avec des ions métalliques. Deux extraits proviennent de l'IHSS (International Humic Substances Society) et sont considérés comme des références et deux autres extraits proviennent directement des effluents traités de la station d'épuration de la ville de Jeddah (Arabie Saoudite).

Enfin les chapitres 5 et 6 sont dédiés à l'étude de la complexation de deux catégories de molécules modèles issues de la famille des polyphénols : les flavonoïdes 3-hydroxyflavone et 3-hydroxyflavothione et les polyphénols simples benzènediol et benzènedithiol. Les objectifs de ces chapitres sont de comparer d'une part l'impact de la substitution de l'atome d'oxygène par un atome de soufre sur les propriétés structurales et spectroscopiques. Et d'autre part d'obtenir les stœchiométries et les constantes apparentes de formation des complexes formés afin d'établir des classements d'affinités des différentes fonctions et cations métalliques étudiés. Dans la mesure où la quantité de ligands n'était pas limitée, un plus grand nombre de cations métalliques a pu être étudié.

La conclusion inclura une synthèse mettant en valeur les résultats les plus marquants et proposera quelques perspectives à ce travail.

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein de l'équipe « Physicochimie de l'Environnement » du Laboratoire de Spectrométrie Infrarouge et Raman (LASIR UMR CNRS 8516), de l'Université de Lille – Sciences et Technologies. Il a été élaboré en collaboration avec le Curtin Water Quality Research Center de Perth (Australie), où j'ai passé un séjour de 6 mois pour suivre la complexation des cations par les extraits de MOD (chapitre 4).

Références bibliographiques :

- Batley, G. E. (1989). Trace Element Speciation Analytical Methods and Problems, CRC Press.
- Boudet, A. C., J. P. Cornard and J. C. Merlin (2000). "Conformational and spectroscopic investigation of 3-hydroxyflavone-aluminum chelates." Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **56**(4): 829-839.
- Buffle, J. (1988). "Complexation reactions in aquatic systems. An analytical approach."
- Buffle, J., K. J. Wilkinson, S. Stoll, M. Filella and J. Zhang (1998). "A generalized description of aquatic colloidal interactions: The three- colloidal component approach." Environmental Science and Technology **32**(19): 2887-2899.
- Campbel, P. (1995). "Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model." Metal speciation and bioavailability in aquatic systems.
- Coble, P. G. (1996). "Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy." Marine Chemistry **51**(4): 325-346.
- Dangleterre, L. and J.-P. Cornard (2005). "Interaction of lead (II) chloride with hydroxyflavones in methanol: a spectroscopic study." Polyhedron **24**(12): 1593-1598.
- de Souza Sierra, M. M., O. F. Donard and M. Lamotte (1997). "Spectral identification and behaviour of dissolved organic fluorescent material during estuarine mixing processes." Marine Chemistry **58**(1-2): 51-58.
- Filella, M. (2008). "NOM site binding heterogeneity in natural waters: Discrete approaches." Journal of Molecular Liquids **143**(1): 42-51.
- Florence, T., G. Batley and P. Benes (1980). "Chemical speciation in natural waters."
- Haitzer, M., S. Höss, W. Traunspurger and C. Steinberg (1999). "Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo [a] pyrene." Aquatic toxicology **45**(2): 147-158.
- Karlsson, T., K. Elgh-Dalgren, E. Björn and U. Skyllberg (2007). "Complexation of cadmium to sulfur and oxygen functional groups in an organic soil." Geochimica et Cosmochimica Acta **71**(3): 604-614.
- Lapouge, C. and J.-P. Cornard (2010). "Theoretical study of the Pb (II)-catechol system in dilute aqueous solution: Complex structure and metal coordination sphere determination." Journal of Molecular Structure **969**(1): 88-96.
- Mopper, K. and C. A. Schultz (1993). "Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components." Marine Chemistry **41**(1-3): 229-238.
- Smith, D. S., R. A. Bell and J. R. Kramer (2002). "Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **133**(1-2): 65-74.

Suffet, I., C. T. Jafvert, J. Kukkonen, M. R. Servos, A. Spacie, L. L. Williams and J. A. Noblet (1994). "Synopsis of discussion session: influences of particulate and dissolved material on the bioavailability of organic compounds." Bioavailability: physical, chemical, and biological interactions: 93-108.

Tessier, A. and D. R. Turner (1995). Metal speciation and bioavailability in aquatic systems, Wiley Chichester.

Tipping, E. (1998). "Humic ion-binding model VI: An improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances." Aquatic Geochemistry **4**(1): 3-48.

Town, R. M. and M. Filella (2000). "A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters." Aquatic Sciences **62**(3): 252-295.

Ure, A. and C. Davidson "Chemical Speciation in the Environment, Blackie, Glasgow, 1995." Search PubMed: 201-271.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. La matière organique	10
1. Origine	10
2. Nature et composition	11
3. Caractérisation chimique de la MOD	13
II. Interactions MOD – métaux	15
1. Les métaux dans les systèmes naturels	15
a) Origine des métaux	15
b) Toxicité des métaux	16
c) Spéciation des métaux	16
d) Cas des métaux étudiés	17
2. Le rôle de la matière organique dans la spéciation des métaux	22
3. Site de complexation ou groupements fonctionnels de la matière organique	23
III. Interactions molécules modèles – métaux	25
1. Propriétés et structures des polyphénols	25
2. Choix des molécules modèles	26
Références bibliographiques	28

Le travail réalisé au cours de cette thèse s'inscrit dans un cadre beaucoup plus large dont l'objectif est d'obtenir une meilleure compréhension des interactions entre des cations métalliques polluants avec la matière organique (MO) dans l'environnement. Dans cette étude, la matière organique se présentant sous trois formes différentes a été abordée : la MO prélevée directement dans le milieu naturel, des extraits de MO et enfin des molécules modèles qui constituent des fragments précurseurs de la MO.

Ce premier chapitre a pour vocation de faire un rapide bilan des études déjà menées sur les interactions MO-cations métalliques. Dans un premier temps, l'origine, la nature, la composition ainsi que la caractérisation de la MO naturelle seront présentées de manière succincte. Dans un deuxième temps, les métaux étudiés seront présentés et un point sur les connaissances concernant la spéciation des métaux dans les milieux naturels est abordé. Les différents sites potentiels de fixation des ions métalliques seront passés en revue et enfin le choix des molécules modèles qui seront étudiées lors de ce travail sera explicité.

I. La matière organique

La matière organique (MO) est issue de la dégradation et de la condensation de molécules provenant des êtres vivants (Frimmel et al. 1988). Son origine, sa composition et ses propriétés sont très variées. Avant d'essayer de comprendre pourquoi la matière organique dissoute (MOD) est si importante pour le devenir des contaminants, il est essentiel d'essayer de comprendre ce qu'est la matière organique.

1. Origine

Les origines de la MOD sont très hétérogènes d'un système aquatique à un autre. En effet, la MOD peut avoir deux origines : naturelle ou anthropique (Figure 1). Ces deux types de MOD ont à leur tour des sources différentes. La matière organique naturelle (MON) peut être allochtone ou pédogénique, c'est-à-dire provenant des plantes supérieures et des microorganismes contribuant à leur dégradation. La MOD peut être aussi autochtone ou aquagénique, c'est-à-dire qu'elle résulte principalement de la dégradation et des excréctions microbiennes et phyto-planctoniques. La MOD d'origine anthropique observée dans les systèmes aquatiques provient principalement des eaux de ruissellement et des rejets urbains (domestiques, industriels et agricoles), traités ou non traités (Meybeck 1998).

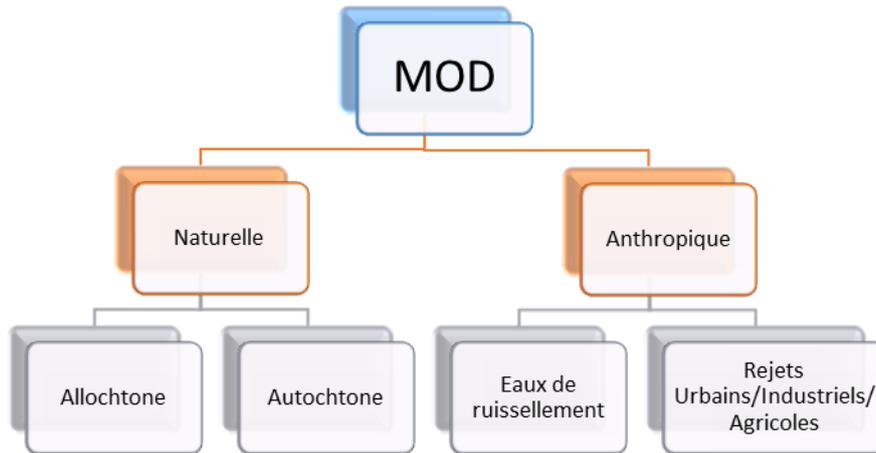


Figure 1 : Origine de la matière organique dissoute aquatique.

2. Nature et composition

La MOD est composée de deux grandes classes de composés (Figure 2). La première classe est constituée des composés facilement dégradables et identifiables : ce sont les biopolymères ou substances non humiques qui regroupent les acides aminés, les protéines, les lipides, les sucres, les acides nucléiques, les nucléotides et les acides phénoliques. Ils sont caractérisables au niveau moléculaire (Leenheer et al. 2003) et peuvent intervenir directement dans les processus métaboliques des organismes vivants. Ils proviennent de la dégradation d'organismes vivants par des mécanismes physiques (changement de température, pression, séchage), chimiques (hydrolyse, photolyse) ou biologiques (exsudation, consommation par les bactéries ou par la faune). Une fraction de ces biopolymères va d'ailleurs se transformer en géopolymères tandis que la fraction restante sera minéralisée.

La seconde classe comporte les composés réfractaires et difficilement identifiables : ce sont les géopolymères ou substances humiques qui regroupent les acides humiques (AH), les acides fulviques (AF) et les humines. Ce second groupe de géopolymères provient donc de la dégradation des biopolymères mais aussi de leur recombinaison ou de leur condensation. Leur réactivité est plus faible que celle des biopolymères et ils ont une durée de vie plus longue (entre quelques dizaines et quelques milliers d'années) (Williams et al. 1987). Les substances humiques peuvent être divisées en trois catégories en fonction de leur pH de solubilité (Seitz 1981, Aiken et al. 1986):

- les acides fulviques solubles pour tout pH
- les acides humiques solubles à pH > 2
- les humines insolubles

Les acides humiques et fulviques se différencient par leurs propriétés optiques et chimiques, leurs poids moléculaires et leurs degrés d'aromaticité (Harvey et al. 1983). Dans ces deux types de molécules, on peut retrouver des structures comme des aromatiques simples, des quinolinones, des coumarines et des flavones. Parmi ces trois types de macromolécules, les AF possèdent les plus faibles poids moléculaires. Ils peuvent se transformer en AH par polymérisation. Les AF sont également plus réactifs que les AH d'un point de vue thermodynamique (Hedges et al. 1988). Ces derniers sont donc des macromolécules plus grosses et ils sont caractérisés par une moins grande proportion d'oxygène par rapport aux AF. Les humines sont quant à elles des macromolécules de poids moléculaire plus élevé que les acides humiques et fulviques et elles sont formées à la fois par la polymérisation et par la dégradation des ces derniers (Hansell et al. 2002).

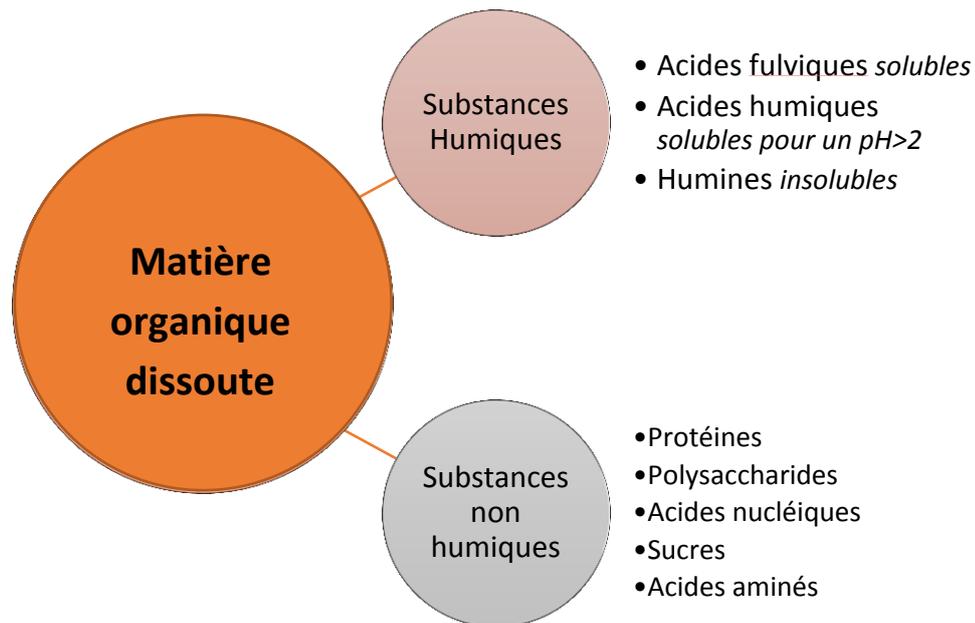


Figure 2 : Composition des deux grandes classes de la MON.

3. Caractérisation chimique de la MOD

Plusieurs méthodes analytiques spécifiques ont été développées afin de déterminer un maximum de caractéristiques chimiques et structurales de la MOD. Parmi elles, nous pouvons citer les analyses élémentaires, moléculaires ou encore fonctionnelles (Hayes et al. 1989, Croue et al. 2003). L'analyse élémentaire de la MOD permet d'obtenir sa composition relative en C, H, O, N et S (Rice et al. 1991). Le

Tableau 1 regroupe la composition moyenne pour les acides humiques et fulviques ainsi que pour les humines.

	C	H	N	S	O	O/C	H/C
Acides humiques	55,1	5,0	3,5	1,8	35,6	0,5	1,1
Acides fulviques	46,2	4,9	2,5	1,2	45,6	0,76	1,28
Humines	56,1	5,5	3,7	0,4	34,7	0,46	1,17

Tableau 1 : Composition élémentaire (en % massique) et rapport atomique moyen de substances humiques.

De manière générale, les teneurs en carbone des AH sont supérieures aux AF et inversement les teneurs en oxygène des AH sont inférieures aux AF. Les teneurs plus élevées en oxygène pour les AF sont associées au fait que ceux-ci contiennent plus de groupements carboxyliques ou d'hydrates de carbone. Les AH peuvent être différenciés des AF à l'aide du rapport O/C qui est de respectivement 0,5 et de 0,7 (Steelink 1985). Le rapport H/C est inversement proportionnel à l'aromaticité ou au degré de condensation.

L'utilisation des analyses moléculaires telle que la chromatographie liquide haute performance ou la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse permet d'identifier plusieurs composés ou groupe de composés comme les protéines, les lipides et les polysaccharides présents dans la MOD (Hatcher et al. 2001). Plus récemment, la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR-MS) a été développée pour une meilleure compréhension moléculaire grâce au dénombrement précis des fragments de masse CHO, CHON, CHOS et CHONS (Stubbins et al. 2014, Gonsior et al. 2016). Enfin, les analyses fonctionnelles (comme les spectroscopies UV-visible, de fluorescence et infrarouge) permettent d'identifier des types de structures et de fonctions chimiques (Leenheer and Croué 2003).

L'utilisation de cet éventail de techniques analytiques permet donc d'avancer progressivement dans l'identification de groupements fonctionnels et de fragments de structure qui composent la MOD. Mais, à ce jour, seulement 20% de la MOD est représentée par des composés

simples dont les structures sont facilement identifiables : sucres, acides aminés, tannins, pigments et hydrocarbures. En outre, un certain nombre de fonctions ont aussi pu être mises en évidence comme des fonctions acides carboxyliques, phénols, amines et thiols (Thurman 1985).

De plus, nous venons de voir que la MOD des systèmes aquatiques possède une structure chimique hautement hétérogène, qui comprend un nombre très important de groupements fonctionnels aux propriétés diverses. Il est donc possible de suivre deux voies pour étudier les propriétés de la MOD : l'analyse globale et l'analyse après fractionnement.

La première approche consiste en une étude globale de la MOD non fractionnée, la MOD est simplement isolée du milieu d'origine par une simple filtration. Ce type d'étude à l'avantage de ne pas modifier la MOD. Cependant, elle nécessite des techniques analytiques d'une part précises pour s'affranchir des perturbations provoquées par le milieu et d'autre part sensibles pour travailler aux concentrations observées dans le milieu naturel (de l'ordre de quelques milligrammes de carbone dissous par litre).

La deuxième approche repose sur l'extraction puis un ou plusieurs fractionnements préalables de la MOD en groupes de composés chimiques de propriétés voisines, suivant des protocoles d'extraction physiques et/ou chimiques. Les groupes ainsi séparés possèdent au moins une propriété commune par exemple la taille ou la charge. Les analyses sont de plus facilitées par le fractionnement de la MOD isolée. En effet ces séparations d'une part limitent a priori les interactions générées par les autres espèces chimiques présentes et d'autre part permettent de travailler à des concentrations plus élevées en matières organiques lorsqu'il est nécessaire. Du fait de la haute complexité de la MOD, tout type de fractionnement (et d'analyses par la suite) ne pourra fournir qu'une description approximative de l'intégralité de la MOD. En effet le fractionnement, qui ne sépare la MOD que par des critères relatifs à la méthode employée, peut engendrer une disparition et/ou des transformations partielles de la MOD et ainsi produire divers artefacts (Shuman 1990, Zsolnay 2003). La complexité de cette fraction du carbone organique a entraîné lors de ces dernières décennies le développement de nombreuses techniques de fractionnement de la MOD reposant sur différents critères physico-chimiques afin de mieux la caractériser :

- La solubilité : Extraction par solvant (Calderoni et al. 1984).
- La taille : Fractionnement par ultrafiltration ou par chromatographie d'exclusion stérique (Gjessing et al. 1967, Buffle et al. 1978, Newcombe et al. 1997).
- L'hydrophobicité : Séparation par des techniques chromatographiques de sorption sur des résines non ioniques comme les résine XAD (Thurman et al. 1981, Imai et al. 2002) et/ou ioniques (anioniques ou cationiques) (Leenheer 1981, Zhou et al. 1990).

II. Interactions MOD – métaux

1. Les métaux dans les systèmes naturels

L'ensemble des métaux présents dans les écosystèmes aquatiques est d'origine naturelle, mais avec le développement croissant des activités anthropiques ainsi que des nombreuses pollutions qu'elles génèrent, les concentrations des métaux ont fortement augmenté au cours des XIX et XX^{ème} siècles. La sensibilisation de la société à la préservation et à la reconquête des milieux a permis, dans les pays industrialisés, d'instaurer des textes de lois pour limiter ces pollutions. Ainsi, depuis des décennies, il est possible de noter une décroissance progressive des concentrations en métaux dans de nombreux cours d'eau et sédiments. S'ajoute aussi à ces restrictions la fermeture de la majorité des fonderies, mines et entreprises métallurgiques dans ces pays au profit des pays en voie de développement, qui en conséquence subissent actuellement à leur tour une pollution importante de leur environnement.

a) *Origine des métaux*

Un métal est issu le plus souvent d'un minerai et est souvent associé à d'autres métaux ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité similaires. La concentration naturelle d'un métal est liée à la roche mère dont il est extrait. La plupart des minerais métallifères sont :

- ✓ les oxydes (bauxite : mélange de minéraux d'aluminium gibbsite $\text{Al}(\text{OH})_3$, boehmite et diaspre AlOOH) ;
- ✓ les sulfures (galène PbS , sphalérite ZnS) ;
- ✓ les carbonates (malachite $\text{Cu}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_2$, sidérite FeCO_3) ;
- ✓ les silicates (garniérite $(\text{Ni,Mg})_4\text{Si}_6\text{O}_{15}(\text{OH})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Quel que soit le minerai, il contient des éléments traces (co)précipités. On trouve par exemple des gisements de minerais de galène (PbS) accompagné de traces de Ag, Zn, Cu, Cd ou de sphalérite (ZnS) contenant des éléments tels que Cd, Pb, As, Se, Ag, Au.

L'une des principales raisons de l'enrichissement de la teneur en métaux dans l'environnement est due aux activités humaines. On rencontre deux types de pollution : diffuse et localisée.

Dans le cas d'une pollution diffuse, une large surface est concernée, elle peut avoir été causée :

- ✓ par la pollution atmosphérique des industries pyrométallurgiques (production de Zn, As, Cd, ou Pb) ou encore celle due à la combustion du charbon. La dispersion peut alors aller très loin du lieu originel de production ;
- ✓ par l'agriculture (engrais phosphatés sources de Cd et/ou de Zn) ;
- ✓ par une source domestique (transport, boue de stations d'épuration).

Dans les cas d'une pollution plus localisée, comme au niveau de zones de dépôts dans des industries métallurgiques ou chimiques, les concentrations de métaux sont beaucoup plus élevées et provoquent des effets graves sur l'écosystème local.

b) Toxicité des métaux

La plupart des métaux dans les systèmes naturels sont à l'état de traces. Un élément trace, par définition, est un élément présent en concentration inférieure à 0,1%, ce qui est le cas de 68 éléments sur 80 qui composent la croûte terrestre. Parmi les éléments traces, certains sont indispensables à la vie (oligo-éléments) ou à l'activité biologique. C'est le cas de Cu, Zn, Co, Fe, Mn, Ni, Cr, V, Mn, Se, Sn, mais jusqu'à un certain seuil au-delà duquel ils deviennent toxiques et peuvent se fixer et s'accumuler dans des organes. D'autres métaux comme le plomb, le mercure ou le cadmium n'ont pas d'activités bénéfiques connues et peuvent causer de nombreux troubles. La littérature abonde d'études sur les risques et effets des métaux sur la santé (Afridi et al. 2006, Masoud et al. 2007, Vernay et al. 2007).

c) Spéciation des métaux

La spéciation chimique d'un élément est la distinction entre les différentes formes de liaisons et les espèces possibles de cet élément dans un environnement donné. Au sein du milieu aquatique, les métaux peuvent se trouver sous diverses formes : ions hydratés, complexes solubles avec des ligands organiques ou minéraux de taille variable, ou encore complexes colloïdaux comme le montre la Figure 3. Ces différentes formes chimiques sont en évolution continue au sein des écosystèmes avec des cinétiques de transformation très différentes. Un certain nombre de ligands, inorganiques ou organiques, vont conditionner la spéciation de cet élément par la formation de complexes plus ou moins stables. C'est cette spéciation qui va déterminer la toxicité d'un métal. Il a été démontré que le cation métallique libre (tel que Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , etc.) est une des formes les plus réactives, avec les espèces neutres, puisque elles sont plus facilement assimilables par les organismes vivants (Vasconcelos et al. 2001).

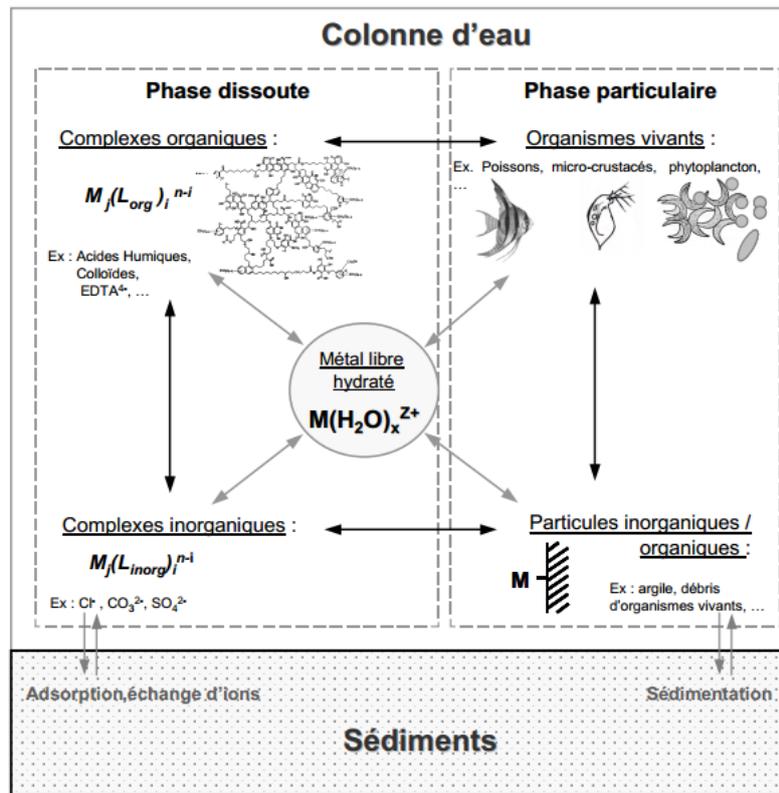


Figure 3 : Principales interactions d'un métal M avec les constituants du milieu aquatique (D'après Buffle 1988).

d) Cas des métaux étudiés

De nos jours, la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE) complétée par des directives filles permet l'évaluation des cours d'eaux européens. L'état d'une masse d'eau est défini par les états écologique et chimique. L'état chimique d'une masse est donné par les normes de qualité environnementale (NQE) établies pour 45 substances métalliques et organiques. L'état d'une masse d'eau est soit bon soit mauvais. Il est déclaré mauvais dès lors que la Moyenne Annuelle d'une Norme de Qualité Environnementale (NQE-MA) d'au moins une substance est dépassée. L'ensemble des métaux choisis pour cette étude (à l'exception du cobalt) fait partie des substances surveillées. Le

Tableau 2 répertorie les concentrations moyennes des métaux choisis pour une rivière de manière générale ainsi qu'un exemple de rivière : la Marque. De plus les limites NQE-MA y sont regroupées.

	Eau de rivière moyenne	La Marque	NQE-MA
Cd	0,05 (0,44)	0,13 (1)	0,2
Cu	1,5 (24)	0,92 (14)	1
Ni	0,5 (9)	4,3 (73)	20
Pb	0,1 (0,48)	0,67 (3)	7,2
Zn	ND	14 (214)	7,8

Tableau 2 : Moyenne mondiale des concentrations dissoutes en $\mu\text{g.L}^{-1}$ (nmol.L^{-1}) en éléments traces métalliques d'une rivière et de la rivière la Marque ainsi que les concentrations des NQE-MA. (Données issues de la thèse d'A.Ivanovsky et de l'INERIS).

De manière générale le cuivre est présent à trop forte concentration entraînant ainsi le possible classement en mauvais d'un cours d'eau. Pour l'exemple de la rivière la Marque cette fois-ci c'est le zinc qui est présent en quantité trop importante. La spéciation de ces métaux joue donc un rôle primordial pour la détermination de la classe de qualité des cours d'eaux.

- Le cuivre

Le cuivre (Cu) peut exister sous 4 degrés d'oxydation : 0, +I, +II et +III. A l'état naturel, il se trouve majoritairement à l'état natif et sous le degré d'oxydation +II dans les roches, les sols et les eaux, ainsi que sous forme de minerais tels que la chalcocite (Cu_2S), la chalcopyrite (CuFeS_2) et la malachite ($\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$) (Cotton et al. 1991). En solution, l'ion cuivreux Cu^+ se dismute très rapidement pour former l'ion cuivrique Cu^{2+} et $\text{Cu}(0)$. En effet, il est généralement présent dans l'eau sous le degré d'oxydation +II et est entouré de six molécules d'eau, il présente alors un environnement octaédrique déformé (quatre molécules d'eau dans un même plan que Cu et deux autres plus faiblement liées dans un plan perpendiculaire au premier). Dans le milieu naturel, le cuivre se trouve rarement sous forme libre ; il est le plus souvent sous forme complexée ou adsorbée. Ses très bonnes propriétés thermique et électrique, sa malléabilité et sa résistance à la corrosion expliquent son importante exploitation actuelle. A l'état pur ou sous forme de sels (sulfate, acétate), l'utilisation du cuivre est multiple. Il rentre dans la composition des pigments, des peintures, des engrais, des insecticides et des fongicides (bouillie bordelaise) pour les vignes, des conservateurs du bois et du cuir, et plus généralement dans l'industrie du pétrole et des caoutchoucs (McQuarrie et al. 2000). Ses alliages tels que le laiton (cuivre et zinc) et le bronze (cuivre et étain) sont aussi très sollicités en industrie. Le cuivre est un élément essentiel au fonctionnement de l'organisme humain, mais à forte concentration, il peut avoir des effets néfastes sur la santé. En cas d'exposition à long-terme sous forme de poussière, il peut causer une irritation des voies respiratoires et des yeux, des maux de tête, des vertiges.

L'ingestion de quantités de cuivre au-delà des doses normales peut aussi causer des dommages au foie et aux reins, et peut même conduire à la maladie de Wilson (Stern 2010). La toxicité la plus forte est observée pour l'ion Cu^{2+} (LaGrega et al. 1994).

- Le plomb

Il existe 2 degrés d'oxydation du plomb : +II et +IV bien que le premier soit majoritaire. Le plomb sous forme Pb(II) peut présenter un nombre de coordination très variable lorsqu'il est lié à des ligands organiques et il est possible de distinguer deux types de coordination : holodirigé ou hémidirigé (les ligands ne sont pas distribués dans la sphère complète de coordination du cation). La distribution hémidirigée est due à la présence d'une paire libre (6s) qui présente de fortes répulsions vis-à-vis des ligands. Lorsque le nombre de ligands est important (supérieur à 4) la distribution évolue vers une distribution holodirigée, c'est-à-dire une distribution beaucoup plus régulière autour du cation (Davidovich et al. 2009). L'utilisation du plomb est directement liée à la métallurgie qui a connu son apogée sous l'empire romain. La révolution industrielle a entraîné de nouvelles utilisations massives et une augmentation exponentielle des quantités de plomb produites depuis un siècle tout en se transformant radicalement. Pendant la première moitié du XX^{ème} siècle, le plomb a été utilisé dans l'industrie, l'imprimerie et les peintures. Dans la seconde moitié du siècle, l'utilisation dominante était liée aux carburants automobiles, le plomb étant ajouté à l'essence comme antidétonant. Cette utilisation est aujourd'hui prohibée. Désormais, les batteries électriques sont une des utilisations majeures du métal (65 à 70% de la production de Pb). Concernant la biodisponibilité du plomb (II) dans les végétaux, il est absorbé passivement par les racines et est rapidement immobilisé ; son transport et son accumulation en profondeur sont assez limités (Alloway 1995). Le plomb présente une grande affinité pour la MON, mais aussi pour les argiles (Adriano 1986). La quantité de matière organique et le pH ont une influence sur l'absorption du plomb par les plantes, la décomposition éventuelle des composés organiques peut entraîner le relargage du métal et l'accumulation dans les racines. Chez l'homme, le plomb (II) pénètre dans l'organisme par voies digestive et pulmonaire. Les sels de plomb se fixent alors dans les tissus et en particulier au niveau des os à hauteur de 80 à 90% du plomb total (Wedeen 1988). Il a été montré que l'exposition au plomb entraîne le saturnisme ainsi qu'un risque accru de cancers respiratoires, gastriques et vésicaux (Fu et al. 1995).

- Le zinc

Le zinc est présent dans l'écorce terrestre principalement sous forme de sulfure de zinc (blende, sulfure le plus répandu dans la lithosphère) et en plus faible quantité sous forme de ZnCO_3 (smithsonite), $\text{Zn}_4[(\text{OH})_2\text{Si}_2\text{O}_7]\text{H}_2\text{O}$ (hémimorphite) ou encore d'hydrozincite $\text{Zn}_5(\text{OH})_6(\text{CO}_3)_2$.

Son utilisation principale se trouve dans les revêtements de protection des métaux contre la corrosion (galvanoplastie, métallisation) et dans des activités plus éparses (alliages, constructions). Les apports de cet élément par l'homme dans l'environnement résultent de trois activités principales : les industries / les mines, les épandages agricoles (lisiers) et les activités urbaines comme le trafic automobile. La spéciation du zinc est très complexe et dépend de nombreux facteurs comme le pH, la quantité de MON ou le potentiel rédox. Le zinc (II) s'accumule à la surface des sols, il ne migre que rarement en profondeur. La MON retient le zinc (II) sous des formes stables, un pH élevé permet une meilleure adsorption du métal. Une augmentation de la salinité du milieu entraîne la désorption du zinc (II) dans les sédiments; la matière argileuse est aussi capable de retenir Zn(II). Le déplacement du zinc (II) vers les eaux souterraines est très lent car même s'il a été apporté au sol sous forme soluble, il est converti rapidement en espèces moins réactives (complexes organiques et minéraux)(Alloway 2013). L'immobilisation du zinc (II) a un impact important sur les déficiences dans les plantes. La fraction de métal lié à la matière organique pourrait expliquer sa forte mobilité dans les végétaux. Le zinc (II) est un élément essentiel et nécessaire. Chez l'homme, c'est l'un des oligo-éléments les plus abondants. Il intervient au niveau de beaucoup de mécanismes comme la croissance, le développement osseux et les fonctions immunitaires. Bien que nécessaire, à trop forte concentration cet élément peut dérégler les fonctions dans lesquelles il intervient. La toxicité du zinc à long terme est mal connue, le zinc jouant un rôle dans le développement et le maintien du système immunitaire, des doses trop élevées de métal altèrent les réponses immunes et inflammatoires (Chandra 1984).

- Le nickel

Le nickel est présent à de fortes concentrations dans les roches-mères ferromagnésiennes où il se substitue partiellement au fer ou au magnésium. Il est particulièrement abondant dans les minéraux des roches magmatiques basiques et ultrabasiques et dans les minéraux de type serpentine (Baize, 1997). Le nickel peut se présenter sous les formes suivantes : Ni^{2+} , NiOH^+ , $\text{Ni(OH)}_2(\text{aq})$, Ni(OH)^3- , Ni(OH)_4^{2-} , $\text{Ni(OH)}_2(\text{s})$, $\text{NiCO}_3(\text{aq})$, NiHCO_3^+ . Il peut être adsorbé par la matière organique et minérale. La présence de Ni dans le milieu naturel résulte de l'érosion de minéraux, mais aussi pour une grande part, de l'industrie. Le nickel est utilisé dans la production d'aciers inoxydables et d'aciers spéciaux. Il est associé à de nombreux métaux pour la fabrication du monel, d'aciers inoxydables, d'alumel, ou encore du maillechort. Il est également employé dans la production d'alliages non ferreux (pièces de monnaie, outils, ustensiles de cuisine...). Il est utilisé dans les batteries nickel-cadmium et comme catalyseur en chimie organique. Il entre dans la fabrication de pigments minéraux pour métaux et céramiques. Il est employé en solution pour le nickelage électrolytique.

Il est utilisé comme mordant pour les textiles. Le nickel joue un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques. Il intervient notamment comme cofacteur de l'uréase. Mais à trop forte dose, il devient toxique provoquant arrêt cardiaque ou cancer des poumons et du nez (Pichard 2005).

- Le cadmium

Le cadmium n'existe pas à l'état natif. Son minerai, la greenockite, est un sulfure (CdS) présent en faibles proportions dans presque tous les minerais de zinc, de cuivre et de plomb et dans certains phosphates naturels. Le cadmium est un métal blanc argenté, ductile et malléable qui résiste particulièrement à la corrosion. Après dépôt par électrolyse, il constitue de ce fait un revêtement protecteur de qualité pour l'acier (cadmiage). Il sert également de pigments pour colorer divers matériaux. Il est également ajouté comme stabilisant (anti-UV) dans les plastiques et le PVC. Mais son utilisation essentielle, à plus de 70%, concerne la fabrication des accumulateurs, les piles rechargeables Ni-Cd. Les activités humaines entraînent des rejets de cadmium, dans l'air, le sol et l'eau. Ce métal est majoritairement présent dans les milieux aquatiques sous la forme du cation bivalent Cd^{2+} , notamment à cause de son utilisation dans les engrais phosphatés. Le cadmium est un élément trace métallique toxique et écotoxique, parmi les plus problématique sur le plan de la santé environnementale. Chez l'homme, une forte exposition conduit à l'apparition de troubles musculo-squelettiques (Dahl et al. 2014).

- Le cobalt

Le cobalt existe principalement sous deux degrés d'oxydation + II et +III et forme un certain nombre de sels organiques et inorganiques. Cet élément est naturellement présent en quantités infimes dans le sol, les plantes et les aliments. En solution aqueuse, le cobalt est sous la forme Co^{2+} avec une configuration octaédrique, il donne une couleur rose à la solution. Lors de la complexation avec de nombreux ligands, la solution subit un changement de coloration (du rose au bleu) qui est dû à un changement de coordination (passage d'une configuration octaédrique à tétraédrique et/ou à une modification de la nature des ligands). Le cobalt a, tout comme les métaux précédemment cités, de nombreuses applications industrielles : il entre dans la composition des super alliages pour ses propriétés de haute résistance à la chaleur, il est également employé dans les peintures, les colorants et dans l'émail vitrifiant. Chez l'homme, le cobalt est un élément trace indispensable à la vie humaine puisqu'il aide à l'assimilation de la vitamine B12. Le cobalt devient nocif voire cancérigène pour l'homme notamment lorsqu'il est lié au carbure de tungstène (Simonsen et al. 2012).

2. Le rôle de la matière organique dans la spéciation des métaux

Le risque majeur à long terme concernant la pollution des écosystèmes est l'accumulation progressive de substances toxiques dans les sédiments et les sols. Ce danger potentiel est mal identifié car trop peu d'informations sont disponibles. C'est ce que l'on appelle dans de nombreuses publications le « chemical time bomb » (Wei-Chun et al. 1993). C'est pour cela qu'il est important de connaître et déterminer les risques encourus. Cela implique l'identification des substances rémanentes, les mécanismes de stockage et les facteurs influençant leur spéciation et leur remobilisation. Nous venons de voir que l'un des paramètres importants mis en jeu dans la spéciation des métaux est celui des ligands organiques qui peuvent être très complexants.

De nombreuses études, ainsi que de nombreuses synthèses bibliographiques (Town et al. 2000, Batley et al. 2004) réalisées ces dernières années démontrent le pouvoir complexant de la MOD vis-à-vis des métaux. De ces études ressortent des capacités complexantes et des constantes de formation qui sont très hétérogènes. Town et Filella (2000) rapportent que les constantes de formation entre la MOD et les métaux varient de 3 à 12 ordres de grandeurs (échelle logarithme) en fonction de l'origine des MOD et suivant le cation métallique utilisé comme le cuivre, le plomb, le zinc et le cadmium. Cette diversité peut s'expliquer par les différences de nature et d'origine du matériel organique et des conditions physicochimiques (pH, force ionique, etc...) du milieu étudié. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte dans les interactions MO – métal. Les phénomènes de complexation sont régis d'une part par les conditions du milieu et d'autre part par la nature des sites complexants de la MOD. Le pH et la force ionique sont deux facteurs primordiaux qui vont influencer la forme chimique sous laquelle se trouve le métal, ainsi que l'état de protonation et donc l'ionisation des composés organiques (Rieuwerts et al. 1998). D'une manière générale, un cation métallique est par exemple plus mobile en milieu acide et a plutôt tendance à précipiter ou à s'adsorber sur des surfaces minérales à pH plus élevé (Dzombak et al. 1987). De plus, les sites de la MOD possèdent des propriétés de complexation différentes vis-à-vis des métaux et ont généralement aussi des affinités pour le proton, les autres cations, notamment le calcium ou le magnésium, et les colloïdes organiques. Ces éléments vont donc rentrer en compétition avec le métal considéré.

3. Site de complexation ou groupements fonctionnels de la matière organique

La structure moléculaire des substances humiques ou des autres ligands organiques de la MO est composée d'une variété de groupements fonctionnels, comme des groupements benzéniques contenant des fonctions carboxyles, méthoxyles ou encore phénoliques (du type catéchol), des groupements carboxyliques, di-carboxyliques, alcooliques, carbohydrates ou encore des structures de type hydroxycoumarine ainsi que des structures fluorescentes comme les dérivés de base de Schiff, des chromones, xanthones, quinoléinse ainsi que d'autres groupements fonctionnels contenant des atomes d'oxygène, d'azote de phosphore et de soufre greffés sur des carbones aromatiques (17-30%) ou des chaînes aliphatiques (47-63%). (Senesi 1990, Leenheer et al. 1998, Steelink 2002, Leenheer and Croué 2003, Stenson et al. 2003, Fimmen et al. 2007). La Figure 4 illustre une structure supramoléculaire totalement hypothétique dans laquelle sont associés de manière aléatoire des fragments ou composés organiques omniprésents dans la MO.

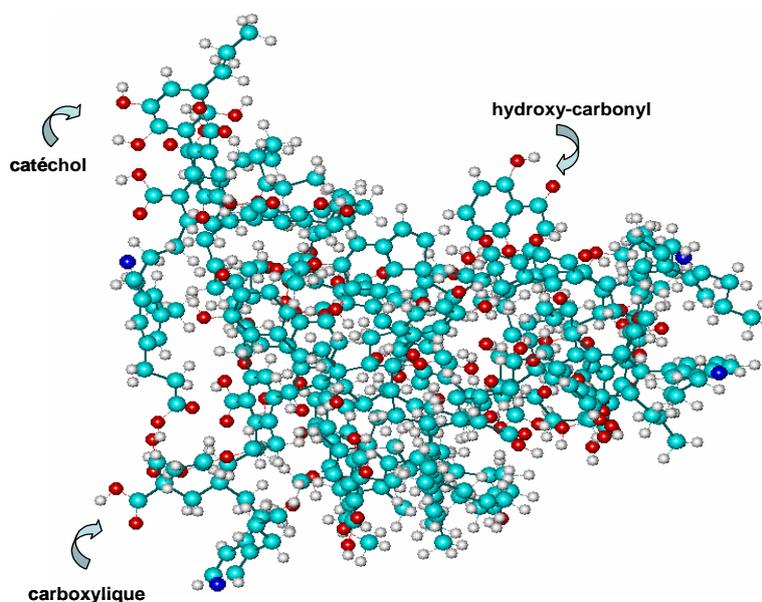


Figure 4 : Macromolécule "hypothétique" de substance humique obtenue par assemblage aléatoire de différentes fractions observées dans la MO. (Dangleterre, 2007)

Cette structure présente une géométrie très flexible qui permet aux métaux d'atteindre les différents sites de complexation potentiels. Entre 60 à 90% des groupements complexant des substances humiques sont composés d'acide carboxyliques et le reste est phénolique (Morel et al. 1993). Les sites de complexation de la MO peuvent être classés en deux catégories, les sites mineurs forts (environ 1 à 10%) et les sites majeurs faibles (environ 90 à 99 %).

a) Les sites majeurs

Les sites majeurs et faibles ont des structures peu diversifiées, mais en nombre, ils représentent la majorité des sites de complexation. Ces sites sont essentiellement composés d'atomes d'oxygène et de carbone. La quasi-totalité des études menées sur les interactions entre la MO et les cations métallique porte sur le rôle des sites carboxyliques et phénoliques dans le processus de complexation (Schnitzer et al. 1965, Reuter et al. 1977, Calace et al. 2004, Guan et al. 2006, Shi et al. 2016).

b) Les sites mineurs

Les sites mineurs comprennent tous ceux qui présentent un large éventail d'énergies de liaisons, comme les sites contenant de l'azote et du soufre (Filella 2008). Les mesures XANES (X-Ray Absorption Near Edge Structure ou Spectroscopie de structure près du front d'absorption de Rayon X) ont montré que le soufre est présent dans les substances humiques dans de nombreux états d'oxydation différents tels que les thiols, thiophènes ou disulfures, sulfoxydes, sulfones, sulfonates et sulfates (Morra et al. 1997, Xia et al. 1998, Fimmen et al. 2007, Manceau 2012). Un acide humique typique contient en moyenne 0,2% en masse de soufre réduit soit environ $63 \mu\text{mol g}^{-1}$ de sites thiols (Bloom et al. 2001). De plus ces sites mineurs, présentant un pouvoir complexant plus important, sont d'abord occupés entièrement avant que les sites faibles ne soient mis à contribution dans la fixation des métaux (Buffle et al. 1995, Mandal et al. 1999, Wu et al. 2001, Chakraborty et al. 2007). Ces sites mineurs par leur nombre, seraient donc caractérisés par des interactions plus fortes entre la MO et le métal. Néanmoins, ces interactions sont encore peu étudiées et mal décrites dans la littérature. Quelques études concernant le mercure et l'arsenic (Smith et al. 2002, Graham et al. 2012, Langner et al. 2014, Catrouillet et al. 2015, Graham et al. 2017) mettent en évidence le rôle primordial des groupements thiols dans la spéciation de ces métaux. Karlsson et al. 2007, compare quant à lui le pouvoir complexant, vis-à-vis du cadmium, de groupements fonctionnels soufrés et oxygénés. Il a ainsi mis en évidence que ce sont les groupements thiols de la MO qui contrôle la spéciation du cadmium dans les sols et probablement dans les eaux de surface pour des concentrations totale en cadmium inférieure à 5 mg de Cd par gramme de carbone organique.

III. Interactions molécules modèles – métaux

Comme nous venons de le voir, l'étude des interactions métaux – MO prise dans sa globalité est très délicate à cause de la poly-fonctionnalité de ce système chimique. Cependant, une meilleure compréhension des mécanismes de complexation mis en jeu peut être obtenue en étudiant des systèmes modèles (Neil C. et al 2006 ; Schulten H.R. et al 1996), molécules précurseurs ou fragments de la MOD (Van Hees et al. 2003, Van Hees et al. 2005) qui présentent des groupements fonctionnels identiques à ceux observés dans les substances humiques (Bartoli, F. 1990 ; Bradl, H. 2004 ; Brunelot G. 1989 ; Chen J. 2002 ; Kaiser M. 2005 ; Karlson T. 2007 ; Sebastia J. 2007).

Comme nous l'avons vu, les fonctions carboxyliques et polyphénoliques sont des groupements très présents au sein des substances humiques et jouent un rôle non négligeable dans la rétention des métaux. Les modèles de la MOD comportant ses deux types de fonctions ont fait l'objet de nombreuses publications au sein de l'équipe (Dangleterre et al. 2005, Lapouge et al. 2005, Cornard et al. 2006, Lapouge et al. 2010), notamment en ce qui concerne la famille des polyphénols. Un des objectifs majeurs de ces travaux consistait à déterminer le site préférentiel de fixation de cation métallique sur des ligands multi-sites. Il a été montré que pour un métal donné, les conditions physicochimiques influencent grandement le site impliqué dans la fixation. De même, pour des conditions physicochimiques données, la nature du métal joue également sur la nature du site mis en jeu dans la complexation.

1. Propriétés et structures des polyphénols

Les polyphénols représentent une partie considérable de la matière organique dissoute (Goodwin 1988, Haslam 1989). Ces molécules sont présentes aussi bien dans les acides humiques que fulviques suivant leur structure respective. Ils constituent aussi un groupe de molécules omniprésentes dans le règne végétal. On les rencontre dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols naturels sont des métabolites secondaires ; ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction. Ces polyphénols se retrouvent donc dans le milieu naturel suite à leur rejet par les plantes ou suite à la décomposition de ces plantes dans le milieu naturel.

Les polyphénols sont composés d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Parmi les polyphénols les plus abondants dans le milieu naturel, il existe 4 classes de molécules représentées sur la Figure 5 :

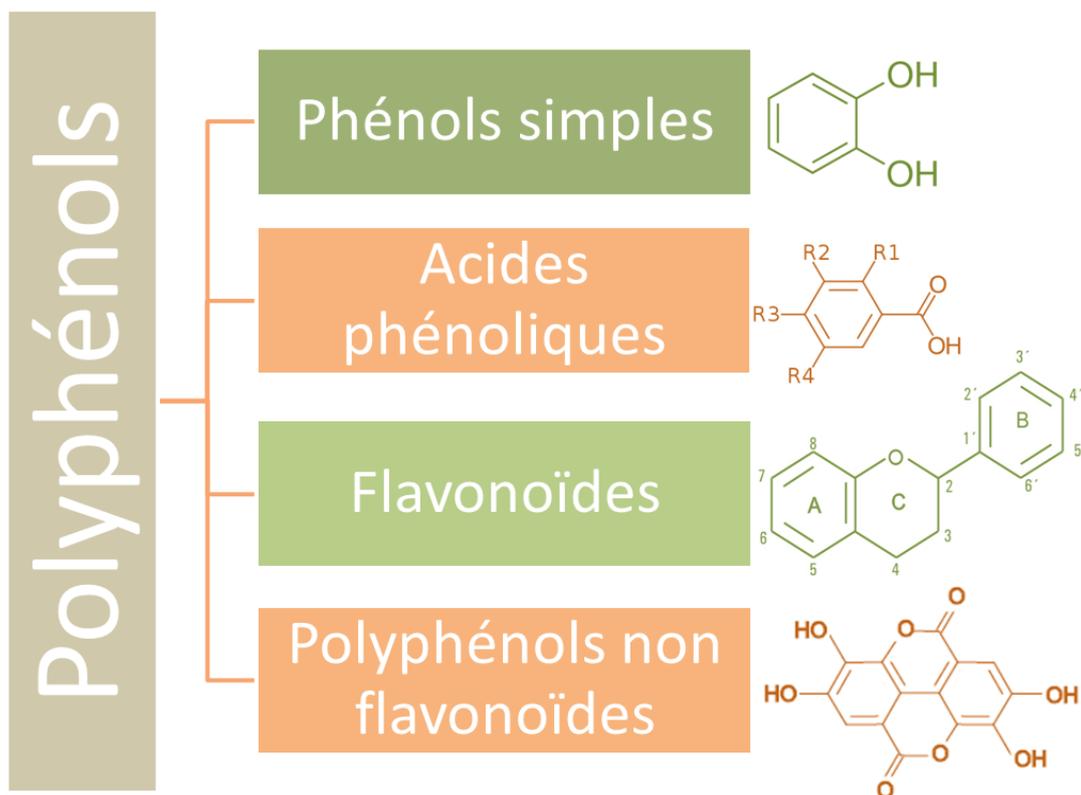


Figure 5 : Les différents grands groupes de polyphénols naturels.

2. Choix des molécules modèles

Nous avons vu que les fonctions oxygénées sont les sites de complexations préférentiels dues à leur grande densité au sein de la MO. D'autres fonctions comme les sites soufrés ont une capacité complexante nettement supérieure à leurs homologues oxygénés, malgré leur faible densité au sein de la MOD. Il nous a semblé alors intéressant d'analyser des molécules contenant un site de complexation oxygéné puis des molécules analogues où un ou plusieurs oxygènes sont substitués par des atomes de soufre pour évaluer les effets du soufre sur les propriétés complexantes des sites vis à vis des métaux.

Le choix des molécules est délicat car il est nécessaire de trouver des molécules analogues, si possible commerciales, dont le composé soufré soit stable (hormis sous atmosphère oxygénée). Parmi les différentes possibilités qui nous étaient offertes, nous avons choisi le site catéchol et son homologue dithiol ainsi que le site α -hydroxy-carbonyl et son homologue α -hydroxy-thiocétone. Ces deux sites sont fréquemment observés dans la MOD en compétition avec les acides carboxyliques.

Ces sites sont communs à de nombreux polyphénols et notre choix s'est porté sur les molécules de pyrocatechol et de 3-hydroxyflavone (Figure 6), car ce sont des molécules longuement étudiées qui présentent une littérature abondante et qui ont également fait partie de travaux réalisés au sein de l'équipe (Dangleterre and Cornard 2005, Lapouge and Cornard 2005, Cornard, Dangleterre et al. 2006, Lapouge and Cornard 2010). Par contre les molécules soufrées correspondantes (Figure 7) n'ont fait l'objet que d'études extrêmement limitées. C'est pourquoi il sera nécessaire de caractériser précisément d'un point de vue spectroscopique ces molécules dans leurs différents états de protonation avant de faire une étude approfondie de leurs propriétés complexantes.

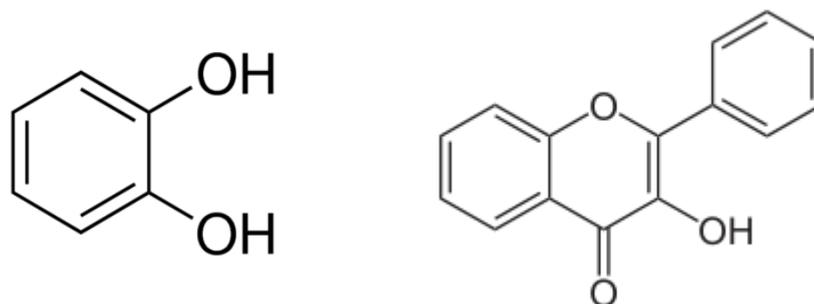


Figure 6 : Structures des molécules modèles oxygénées étudiées (a) pyrocatechol (b) 3-hydroxyflavone.

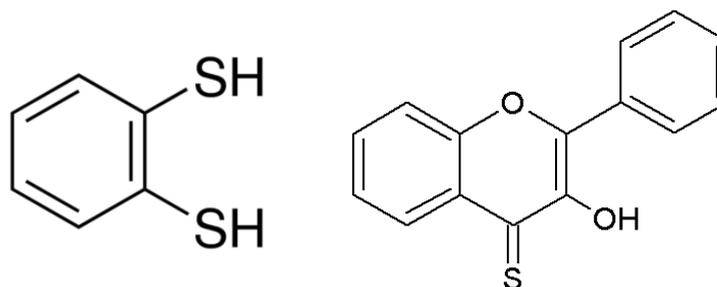


Figure 7 : Structures des molécules modèles soufrées étudiées (a) benzenedithiol (b) 3-hydroxyflavothione.

Références bibliographiques

Adriano, D. C. (1986). Trace Elements in the Terrestrial Environment : Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals.

Afridi, H. I., T. G. Kazi, M. K. Jamali, G. H. Kazi, M. B. Arain, N. Jalbani, G. Q. Shar and R. A. Sarfaraz (2006). "Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry." Toxicology and Industrial Health **22**(9): 381-393.

Aiken, G. R., D. M. McKnight, R. L. Wershaw and P. MacCarthy (1986). "Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization." Geological Journal **21**(2): 213-214.

Alloway, B. J. (1995). Heavy Metals in Soils.

Alloway, B. J. (2013). Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils. Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. B. J. Alloway. Dordrecht, Springer Netherlands: 11-50.

Batley, G. E., S. C. Apte and J. L. Stauber (2004). "Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982." Australian Journal of Chemistry **57**(10): 903-919.

Bloom, P. and F. William (2001). X-Ray Spectroscopy Applications for the Study of Humic Substances. Humic Substances and Chemical Contaminants. Jardine: 317-350.

Buffle, J., P. Deladoey and W. Haerdi (1978). "The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters." Analytica Chimica Acta **101**(2): 339-357.

Buffle, J. and M. Filella (1995). "Physico-chemical heterogeneity of natural complexants: Clarification." Analytica Chimica Acta **313**(1-2): 144-150.

Calderoni, G. and M. Schnitzer (1984). "Nitrogen distribution as a function of radiocarbon age in Paleosol humic acids." Organic Geochemistry **5**(4): 203-209.

Calace, N. and B. M. Petronio (2004). "The role of organic matter on metal toxicity and bio-availability." Annali di Chimica **94**(7-8): 487-493.

Catrouillet, C., M. Davranche, A. Dia, M. Bouhnik-Le Coz, M. Pedrot, R. Marsac and G. Gruau (2015). "Thiol groups controls on arsenite binding by organic matter: new experimental and modeling evidence." J Colloid Interface Sci **460**: 310-320.

Chakraborty, P., I. I. Fasfous, J. Murimboh and C. L. Chakrabarti (2007). "Simultaneous determination of speciation parameters of Cu, Pb, Cd and Zn in model solutions of Suwannee River fulvic acid by pseudopolarography." Analytical and Bioanalytical Chemistry **388**(2): 463-474.

Chandra, R. K. (1984). "Excessive Intake of Zinc Impairs Immune Responses." JAMA: The Journal of the American Medical Association **252**(11): 1443-1446.

Cornard, J. P., L. Dangleterre and C. Lapouge (2006). "DFT and TD-DFT investigation and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Zn(II)-3-hydroxyflavone complex." Chemical Physics Letters **419**(1-3): 304-308.

Cotton, F. A. and C. A. Wilkinson (1991). *Advanced inorganic chemistry*. N. J. W. a. S. ed.

Croue, J. P., M. F. Benedetti, D. Violleau and J. A. Leenheer (2003). "Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site." Environmental Science and Technology **37**(2): 328-336.

Dahl, C., A. J. Sjøgaard, G. S. Tell, T. P. Flaten, D. Hongve, T. K. Omsland, K. Holvik, H. E. Meyer and G. Aamodt (2014). "Do cadmium, lead, and aluminum in drinking water increase the risk of hip fractures? A NOREPOS study." Biological Trace Element Research **157**(1): 14-23.

Dangleterre, L. (2007). *Apport des spectroscopies moléculaires à l'étude des mécanismes de fixation des ions métalliques polluants par les substances humiques. Complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) par des systèmes modèles*. Université de Lille 1.

Dangleterre, L. and J. P. Cornard (2005). "Interaction of lead (II) chloride with hydroxyflavones in methanol: A spectroscopic study." Polyhedron **24**(12): 1593-1598.

Davidovich, R. L., V. Stavila, D. V. Marinin, E. I. Voit and K. H. Whitmire (2009). "Stereochemistry of lead(II) complexes with oxygen donor ligands." Coordination Chemistry Reviews **253**(9): 1316-1352.

Dzombak, D. A. and F. M. M. Morel (1987). "Development of a data base for modelling adsorption of inorganics on iron and aluminum oxides." Environmental Progress **6**(2): 133-137.

Filella, M. (2008). "NOM site binding heterogeneity in natural waters: Discrete approaches." Journal of Molecular Liquids **143**(1): 42-51.

Fimmen, R. L., R. M. Cory, Y. P. Chin, T. D. Trouts and D. M. McKnight (2007). "Probing the oxidation-reduction properties of terrestrially and microbially derived dissolved organic matter." Geochimica et Cosmochimica Acta **71**(12): 3003-3015.

Frimmel, F. H. and M. Weis (1988). "Characterization of polar organic substances with high molecular weight from seepage water of dumping areas." VOM WASSER **71**: 255-267.

Fu, H. and P. Boffetta (1995). "Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: A meta-analysis of published data." Occupational and Environmental Medicine **52**(2): 73-81.

Gjessing, E. T. and G. F. Lee (1967). "Fractionation of organic matter in natural waters on Sephadex columns." Environmental Science & Technology **1**(8): 631-638.

Gonsior, M., J. Valle, P. Schmitt-Kopplin, N. Hertkorn, D. Bastviken, J. Luek, M. Harir, W. Bastos and A. Enrich-Prast (2016). "Chemodiversity of dissolved organic matter in the Amazon Basin." Biogeosciences **13**(14): 4279-4290.

Goodwin, T. W. (1988). Plant Pigments.

Graham, A. M., G. R. Aiken and C. C. Gilmour (2012). "Dissolved organic matter enhances microbial mercury methylation under sulfidic conditions." Environ Sci Technol **46**(5): 2715-2723.

Graham, A. M., K. T. Cameron-Burr, H. A. Hajic, C. Lee, D. Msekela and C. C. Gilmour (2017). "Sulfurization of Dissolved Organic Matter Increases Hg-Sulfide-Dissolved Organic Matter Bioavailability to a Hg-Methylating Bacterium." Environmental Science and Technology **51**(16): 9080-9088.

Guan, X. H., D. L. Li, C. Shang and G. H. Chen (2006). "Role of carboxylic and phenolic groups in NOM adsorption on minerals: A review". Water Science and Technology: Water Supply. **6**: 155-164.

Hansell, D. A., C. A. Carlson and Y. Suzuki (2002). "Dissolved organic carbon export with North Pacific Intermediate Water formation." Global Biogeochemical Cycles **16**(1): 7-1-7-8.

Harvey, G. R., D. A. Boran, L. A. Chesal and J. M. Tokar (1983). "The structure of marine fulvic and humic acids." Marine Chemistry **12**(2-3): 119-132.

Haslam, E. (1989). Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited.

Hatcher, P. G., K. J. Dria, S. Kim and S. W. Frazier (2001). "Modern analytical studies of humic substances." Soil Science **166**(11): 770-794.

Hayes, M. H. B., P. MacCarthy, R. L. Malcolm and R. S. Swift (1989). Humic Substances II. In search of structure. J. W. a. Son.: 764.

Hedges, J. I., W. A. Clark and G. L. Come (1988). "Organic matter sources to the water column and surficial sediments of a marine bay." Limnology and Oceanography **33**(5): 1116-1136.

Imai, A., T. Fukushima, K. Matsushige, Y.-H. Kim and K. Choi (2002). "Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants." Water Research **36**(4): 859-870.

Ivanovsky, A. (2016). "Ouvrages d'assainissement des eaux et qualité du milieu récepteur en zone urbaine. Cas de rejets dans La Marque à Villeneuve d'Ascq."

Karlsson, T., K. Elgh-Dalgren, E. Björn and U. Skyllberg (2007). "Complexation of cadmium to sulfur and oxygen functional groups in an organic soil." Geochimica et Cosmochimica Acta **71**(3): 604-614.

LaGrega, M. D., P. L. Buckingham and J. C. Evans (1994). Hazardous waste management.

Langner, P., C. Mikutta and R. Kretzschmar (2014). "Oxidation of organosulfur-coordinated arsenic and realgar in peat: Implications for the fate of arsenic." Environmental Science and Technology **48**(4): 2281-2289.

Lapouge, C. and J. P. Cornard (2005). "Time dependent density functional theory study of electronic absorption properties of lead(II) complexes with a series of hydroxyflavones." Journal of Physical Chemistry A **109**(30): 6752-6761.

Lapouge, C. and J. P. Cornard (2010). "Theoretical study of the Pb(II)-catechol system in dilute aqueous solution: Complex structure and metal coordination sphere determination." Journal of Molecular Structure **969**(1-3): 88-96.

Leenheer, J. A. (1981). "Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters." Environmental Science & Technology **15**(5): 578-587.

Leenheer, J. A., G. K. Brown, P. Maccarthy and S. E. Cabaniss (1998). "Models of metal binding structures in fulvic acid from the Suwannee River, Georgia." Environmental Science and Technology **32**(16): 2410-2416.

Leenheer, J. A. and J. P. Croué (2003). "Characterizing aquatic dissolved organic matter." Environmental Science and Technology **37**(1): 18A-26A.

Mandal, R., A. L. R. Sekaly, J. Murimboh, N. M. Hassan, C. L. Chakrabarti, M. H. Back, D. C. Grégoire and W. H. Schroeder (1999). "Effect of the competition of copper and cobalt on the lability of Ni(II)-organic ligand complexes. Part I. In model solutions containing Ni(II) and a well-characterized fulvic acid." Analytica Chimica Acta **395**(3): 309-322.

Masoud, M. S., M. I. El-Samra and M. M. El-Sadawy (2007). "Heavy-metal distribution and risk assessment of sediment and fish from El-Mex Bay, Alexandria, Egypt." Chemistry and Ecology **23**(3): 201-216.

McQuarrie, C., D. A. McQuarrie and P. A. Rock (2000). Chimie générale, De Beock ed.

Meybeck, M. (1998). "Man and river interface: Multiple impacts on water and particulates chemistry illustrated in the Seine river basin." Hydrobiologia **373-374**: 1-20.

Morel, F. and J. G. Hering (1993). Principles and applications of aquatic chemistry.

Newcombe, G., M. Drikas, S. Assemi and R. Beckett (1997). "Influence of characterised natural organic material on activated carbon adsorption: I. Characterisation of concentrated reservoir water." Water Research **31**(5): 965-972.

Pichard, A. (2005). Nickel et ses dérivées, INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: 64.

Reuter, J. H. and E. M. Perdue (1977). "Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural waters." Geochimica et Cosmochimica Acta **41**(2): 325-334.

Rice, J. A. and P. MacCarthy (1991). "Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances." Organic Geochemistry **17**(5): 635-648.

Rieuwerts, J. S., I. Thornton, M. E. Farago and M. R. Ashmore (1998). "Factors influencing metal bioavailability in soils: Preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals." Chemical Speciation and Bioavailability **10**(2): 61-75.

Schnitzer, M. and S. I. M. Skinner (1965). "Organo-metallic interactions in soils: 4. carboxyl and hydroxyl groups in organic matter and metal retention." Soil Science **99**(4): 278-284.

Seitz, W. R. (1981). "Fluorescence methods for studying speciation of pollutants in water." TrAC - Trends in Analytical Chemistry **1**(4): 79-83.

Senesi, N. (1990). "Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach." Analytica Chimica Acta **232**(C): 77-106.

Shi, Z., P. Wang, L. Peng, Z. Lin and Z. Dang (2016). "Kinetics of Heavy Metal Dissociation from Natural Organic Matter: Roles of the Carboxylic and Phenolic Sites." Environmental Science and Technology **50**(19): 10476-10484.

Shuman, M. (1990). Carboxyl acidity of aquatic organic matter: possible systematic errors introduced by XAD extraction. Organic Acids in Aquatic Ecosystems, Chichester:Wiley: 97-109.

Simonsen, L. O., H. Harbak and P. Bennekou (2012). "Cobalt metabolism and toxicology-A brief update." Science of the Total Environment **432**: 210-215.

Smith, D. S., R. A. Bell and J. R. Kramer (2002). "Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **133**(1-2): 65-74.

Steelink, C. (1985). "Implications of elemental characteristics of humic substances." Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. Geochemistry, Isolation and Characterization.(Wiley-Interscience): 457-476.

Steelink, C. (2002). "Investigating humic acids in soils." Analytical Chemistry **74**(11): 327A-333A.

Stenson, A. C., A. G. Marshall and W. T. Cooper (2003). "Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra." Analytical Chemistry **75**(6): 1275-1284.

Stern, B. R. (2010). "Essentiality and Toxicity in Copper Health Risk Assessment: Overview, Update and Regulatory Considerations." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A **73**(2-3): 114-127.

Stubbins, A., J. F. Lapierre, M. Berggren, Y. T. Prairie, T. Dittmar and P. A. Del Giorgio (2014). "What's in an EEM? Molecular signatures associated with dissolved organic fluorescence in boreal Canada." Environmental Science and Technology **48**(18): 10598-10606.

Thurman, E. M. (1985). Organic Geochemistry of Natural Waters.

Thurman, E. M. and R. L. Malcolm (1981). "Preparative isolation of aquatic humic substances." Environmental Science & Technology **15**(4): 463-466.

Town, R. M. and M. Filella (2000). "A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters." Aquatic Sciences **62**(3): 252-295.

Van Hees, P. A. W., D. L. Jones, G. Jentschke and D. L. Godbold (2005). "Organic acid concentrations in soil solution: Effects of young coniferous trees and ectomycorrhizal fungi." Soil Biology and Biochemistry **37**(4): 771-776.

Van Hees, P. A. W., S. I. Vinogradoff, A. C. Edwards, D. L. Godbold and D. L. Jones (2003). "Low molecular weight organic acid adsorption in forest soils: Effects on soil solution concentrations and biodegradation rates." Soil Biology and Biochemistry **35**(8): 1015-1026.

Vasconcelos, M. T. D. and M. F. Leal (2001). "Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae." Marine Chemistry **74**(1): 65-85.

Vernay, P., C. Gauthier-Moussard and A. Hitmi (2007). "Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L." Chemosphere **68**(8): 1563-1575.

Wedeen, R. P. (1988). "Bone lead, hypertension, and lead nephropathy." Environmental Health Perspectives **78**: 57-60.

Wei-Chun, M. and H. Van Der Voet (1993). "A risk-assessment model for toxic exposure of small mammalian carnivores to cadmium in contaminated natural environments." Science of the Total Environment(Suppl.): 2.

Williams, B. L., M. V. Cheshire and G. P. Sparling (1987). "Distribution of ¹⁴C between particle size fractions and carbohydrates separated from a peat incubated with ¹⁴C-glycine." Journal of Soil Science **38**(4): 659-666.

Wu, F. and E. Tanoue (2001). "Geochemical characterization of organic ligands for copper(II) in different molecular size fractions in Lake Biwa, Japan." Organic Geochemistry **32**(11): 1311-1318.

Zhou, J. L. and C. J. Banks (1990). "Fractionation of humic acid components by ion exchange chromatography." Environmental Technology **11**(12): 1147-1152.

Zsolnay, Á. (2003). "Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions." Geoderma **113**(3-4): 187-209.

Chapitre II : Techniques et conditions expérimentales

Chapitre II : Techniques et conditions expérimentales

I. Description des échantillons de matière organique	34
1. Les sites d'étude	34
a) La Marque et le lac du Héron dans la métropole Lilloise	34
b) Germignies	36
2. Les extraits de matière organique	38
a) Suwannee River	39
b) Pony Lake	39
c) Jeddah	40
II. Techniques analytiques	40
1. Spectroscopie UV-visible	40
a) Principe	40
b) Appareillage	41
2. Spectroscopie de fluorescence	41
a) Théorie	42
b) Phénomènes parasites	43
c) Appareillage	43
3. Dispositif et suivi expérimental	44
III. Caractérisation de la matière organique naturelle	45
1. Stratégie d'échantillonnage	45
2. Carbone organique dissous	45
3. Le paramètre SUVA	46
4. Détermination des groupements thiols	47
5. Indice de Fluorescence	48
6. MEEF	48
7. PARAFAC	49
a) Principe	50
b) Mise en place du modèle	51
8. FT-ICR-MS	55
IV. Caractérisation des complexes métalliques	56
1. Cas de la MOD et des extraits de MOND.	56
2. Cas des molécules modèles	58
a) Détermination de la stœchiométrie des complexes	58
b) Détermination des constantes de formation des complexes	60
c) Calcul de chimie quantique	61
Références bibliographies :	63

Dans une première partie de ce chapitre, nous décrivons les différents sites d'études d'où proviennent les différents échantillons de MOD ainsi que l'origine des différents extraits de MOD étudiés. La seconde partie sera consacrée aux différentes techniques spectroscopiques ainsi qu'au montage expérimental mis en œuvre. La troisième partie sera quant à elle dédiée aux méthodes de caractérisation de la MOD. Enfin, dans une dernière partie sera décrite la méthodologie employée pour la caractérisation des complexes formés avec la MOD et les molécules modèles, et nous présenterons particulièrement les méthodes de détermination des constantes de formation des complexes.

I. Description des échantillons de matière organique

La matière organique qui a été étudiée dans ce travail provient de différentes origines ; on peut cependant distinguer deux grands types. Le premier type de matière organique correspond à de la matière organique naturelle dissoute directement prélevée sur des sites d'étude. Le second type d'échantillons regroupe des extraits de matière organique qui sont soit standardisés (provenant de l'International Humic Substances Society (IHSS)), soit fractionnés de manière indépendante.

1. Les sites d'étude

Dans le cadre de cette thèse, trois sites d'étude ont été sélectionnés dans la région des Hauts-de-France afin de prélever de la matière organique naturelle aux caractéristiques possiblement contrastées. Le premier site est la rivière de la Marque, qui est fortement impactée par les activités humaines. Le second est le lac du Héron, un bassin de rétention des eaux pluviales, et le troisième site se situe dans des mares au pied d'un terril provenant de l'extraction du charbon au cours du XX^{ème} siècle. Ces trois sites ont été choisis car ils font l'objet d'étude au laboratoire dans le cadre de contrats régionaux et ils présentent de plus des caractéristiques différentes provenant de leur environnement respectif.

a) La Marque et le lac du Héron dans la métropole Lilloise

La Marque, située dans la métropole lilloise (59), s'étend sur 31,7 km et prend sa source au pied du Mont Pévèle. C'est une rivière principalement alimentée par les eaux de ruissellement, et dans une moindre mesure par les eaux de la nappe superficielle (BRGM 2001, Ivanovsky 2016). De par son faible débit (environ $1 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ à Forest sur Marque), une contribution des stations d'épuration urbaines (STEU) et notamment celle de Villeneuve d'Ascq est non négligeable (jusqu'à 40% du débit en période d'étiage).

La STEU de Villeneuve d'Ascq traite chaque jour les eaux usées de 150 000 équivalents habitants. Ces eaux usées proviennent de 17 communes, d'industries et d'hôpitaux. La station traite en priorité les matières en suspension, la pollution organique oxydable, l'azote et le phosphore. Il est important de préciser que la station respecte les normes de rejet. Le choix de cette rivière et des points de prélèvements est intimement lié au projet Chercheurs-Citoyens OPUR (2013-2016), financée par la Région Hauts-de-France, et porté par notre équipe au sein du LASIR. D'un point de vue scientifique, OPUR vise à comprendre la dynamique des contaminants dans la Marque et l'impact d'une STEU (située à Villeneuve d'Ascq) et d'un bassin de rétention (le lac du Héron) sur cette dynamique. A noter que ce tronçon se situe entre les villes de Tressin et de Hem, qui constitue une zone de transition entre la partie amont de la Marque (fortes activités agricoles et îlots urbains) et la partie aval (quasi totalement urbanisée). Les points de prélèvements (Figure 1) font partie de ceux d'OPUR et reprennent les mêmes noms : LM1 se situe en amont de la STEU de Villeneuve d'Ascq, LM4 correspond à l'eau traitée en sortie de la STEU et LM3 correspond à la station aval du tronçon (c'est-à-dire à l'eau de la rivière contenant en plus les eaux de la STEU et celles du lac du Héron) (Ivanovsky 2016).

Le lac du Héron est le dernier de la chaîne des lacs de la ville de Villeneuve d'Ascq (59). Ce sont tous des lacs artificiels creusés en 1976 pour drainer les eaux de ruissellement de la ville. La chaîne des lacs reçoit 2/3 de sa charge avec des eaux pluviales tandis que le tiers restant est issu des réseaux unitaires (mélange d'eaux pluviales et d'eaux usées). L'apport d'eaux usées est indéniable et a été mis en évidence par des mesures de concentrations en caféine et carbamazépine (Ivanovsky 2016). Peu profond (profondeur moyenne ~ 1,50 m), le temps de séjour de l'eau est estimé à 2-3 mois. L'apport important de nutriments (phosphore et azote) et de matière organique biodégradable classe le lac du Héron comme un plan d'eau hypereutrophe, avec le développement massif de macrophytes (l'élodée de Nuttall) ces dernières années qui ont remplacé les blooms phytoplanctoniques (et notamment ceux des cyanobactéries). Dans le cadre de ce travail, un seul point de prélèvement se situe dans le lac : il s'agit du point LH4 localisé au niveau des pompes de relevages qui permettent à l'eau de se jeter dans la Marque.

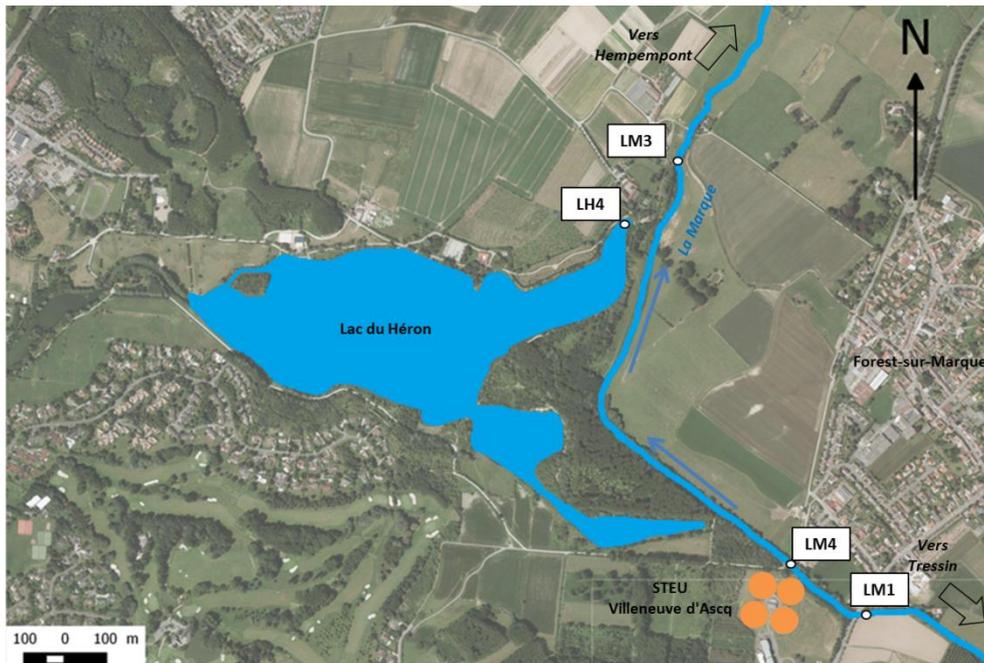


Figure 1 : Localisation des points de prélèvement.

b) Germignies

Un terril peut être défini comme une colline artificielle, résultat de l'entassement de résidu minier et composé de schistes et de grès : on parle aussi d'accumulation de déblais stériles (produit non-exploitable de la mine). Le terril de Germignies-Nord s'étend sur 97 hectares sur les communes de Flines-lez-Raches et Marchiennes (62) et a été édifié de la fin des années 1950 à 1984. C'est un terril de schistes noirs et de forme tabulaire. Il est classé au patrimoine mondial de l'UNESCO depuis 2012 et est propriété du département du Nord. Ce site a été choisi car s'intégrant dans le projet DIAMEN, porté par notre Equipe et financé par le Département du Nord. Il avait pour but de dresser un diagnostic de la qualité du milieu aquatique en pied de terril et d'évaluer l'impact du lessivage par les pluies, des terrils de Germignies-Nord et des Argales sur ces écosystèmes aquatiques très particuliers. En effet, une précédente étude réalisée par le cabinet Valétude avait mis en évidence la présence en très grande quantité de sulfates dans l'eau des mares (jusqu'à $2,44 \text{ g L}^{-1}$), probablement liée à la réoxydation de la pyrite présente dans les minéraux du terril. Par ailleurs, le milieu étant riche en matière organique, l'activité des bactéries sulfato-réductrices et à certains endroits des bactéries thiooxydantes, favorise la présence d'espèces soufrées réduites dans ces mares (Lamers et al. 2013). Ce lieu riche en espèces soufrées nous a donc semblé intéressant pour y caractériser la matière organique potentiellement enrichi en groupements soufrés et pour étudier la complexation métallique de celle-ci.

Les différents prélèvements d'eau ont été effectués dans les mares et marais en pied du terril de Germignies-Nord (Figure 2). Ces mares de faibles profondeurs (environ 30-50 cm) peuvent être visuellement très impactées par le dégagement d' H_2S et/ou par la présence d'une coloration blanchâtre à jaunâtre de l'eau en raison de la présence de soufre élémentaire. Ces phénomènes semblent s'amplifier depuis ces dernières années car la circulation de l'eau dans les marais a été fortement diminuée par endroit par des aménagements des riverains.



Figure 2 : Localisation des points de prélèvement autour du Terril de Germignies-Nord.

2. Les extraits de matière organique

Les différentes fractions de matière organique ont été obtenues à partir de trois sources différentes. Le choix de ses sources a été effectué selon des compositions détaillées dans cette partie. Il s'agit de la Suwannee River, de Pony Lake et de Jeddah.

Deux de ces trois fractions (Suwannee River et Jeddah) ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec le Curtin Water Quality Research Center (CWQRC) de l'Université de Curtin, Perth (Australie). Ces extraits ont été obtenus en appliquant la technique d'extraction sur résines non ioniques XAD, qui est basée sur les caractéristiques d'hydrophobicités des échantillons de MOD. Les fractionnements ont été réalisés antérieurement en suivant le protocole décrit par la Figure 3 (Croue et al. 2003, Zheng et al. 2014). La MOD a été passée sur une série de résines retenant de façon sélective certains composants organiques. La fraction la plus hydrophobe (HPO) a été retenue sur une résine XAD-8. La fraction transphile (TPH) dont le caractère hydrophobe est moins marqué a été retenue sur une résine XAD-4. La dernière partie de la MOD non retenue sur les résines est la partie hydrophile (HPI). Cette fraction est difficile à isoler et reste donc peut étudiée (Pernet-Coudrier 2008).

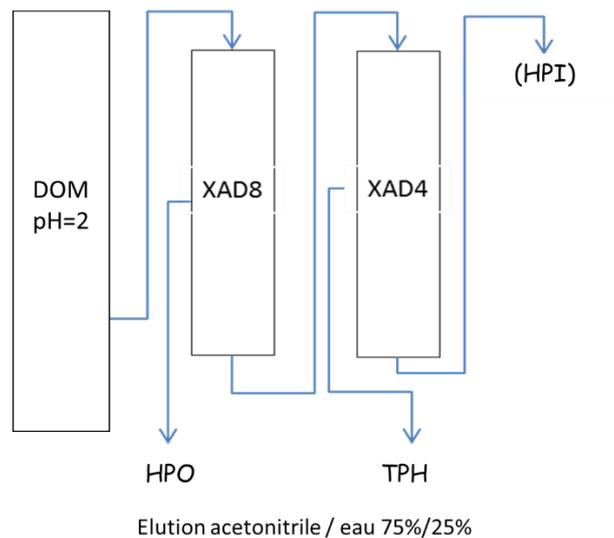


Figure 3 : Protocole d'extraction et de fractionnement de la MOD.

a) Suwannee River

La Suwannee River est un fleuve marécageux qui traverse les états de Géorgie et de Floride au Sud-Ouest des Etats-Unis. La source principale de matière organique est d'origine allochtone, qui provient de la dégradation de la tourbe et des eaux « noires ». C'est un mélange de tanins dégradés, de lignines, de glucides et de lipides (Leenheer et al. 2000).

La fraction HPO de la Suwannee River (SR_HPOA) a été sélectionnée comme référence car elle a été très largement étudiée, que ce soit en terme de composition ou de complexation avec les métaux (Leenheer et al. 1998, Elkins et al. 2001, Chakraborty et al. 2008, McIntyre et al. 2013, Kuhn et al. 2015).

b) Pony Lake

Pony Lake (PL) est un étang côtier salé et hypereutrope sur le Cap Royds de l'île Ross en Antarctique. Ce lac est complètement isolé des apports terrigènes et sans plantes supérieures existantes dans le bassin hydrographique. PL représente un excellent système d'étude des MOD autochtones et microbiennes. Le lac est peu profond (1-2 m) et perpétuellement glacé, mais des zones peuvent fondre pendant l'été austral. Il contient une concentration relativement élevée de MOD (1,3 à 2,4 mg C.L⁻¹) par rapport à d'autres milieux glaciaires et est composé d'organismes vivants tels que des bactéries, des particules semblables à des virus, des aldéoses et des protozoaires ciliés tout au long de l'année (D'Andrilli et al. 2013).

La fraction sélectionnée cette fois, est l'acide fulvique provenant de l'IHSS. La fraction d'acide fulvique de Pony lake (PL_FA) a été sélectionnée pour sa teneur assez élevée en soufre (~3%). En effet, cette fraction est la plus riche en soufre de toutes les substances standardisées proposées par l'IHSS. L'IHSS a été créée en 1981 pour promouvoir l'éducation sur l'analyse instrumentale de substances humiques provenant de matières premières spécifiquement sélectionnées. Les standards IHSS sont disponibles pour que les chercheurs aient des références communes de MOD pour comparer et contraster des ensembles de données spécifiques avec différents échantillons de MOD d'autres environnements uniques.

c) Jeddah

Deux fractions HPO et TPH de matière organique issue des effluents traités de la station d'épuration de la ville de Jeddah (district d'Al Ruwais, Arabie Saoudite), qui applique un procédé de boues activées pour réduire les charges organiques, ont été étudiées. Ces fractions issues d'eaux usées ont été sélectionnées pour leurs compositions particulières (Tableau 1). En effet, ces deux extraits ont un pourcentage d'oxygène plus faible ainsi qu'un pourcentage de soufre pour les deux fractions et d'azote pour la fraction TPH supérieure à la moyenne observée pour les substances humiques en général. Le fractionnement et la caractérisation ont été réalisés par Zheng (2014). La fraction HPO représente 39% de la MOD extraite quant à la fraction TPH celle-ci représente 22%. Ces fractions pourront, d'autre part, permettre d'évaluer l'impact du rejet d'eaux usées dans le milieu naturel sur la spéciation des métaux.

Analyse élémentaire (% massique)					
	C	H	O	N	S
HPO	56,6	6,3	26,5	2,9	2,2
TPH	50,2	6,0	30,1	6,0	2,5

Tableau 1 : Analyse élémentaire en pourcentage massique des deux fractions de Jeddah (Zheng et al. 2014).

II. Techniques analytiques

1. Spectroscopie UV-visible

a) Principe

La spectroscopie d'absorption UV-visible est communément utilisée dans le domaine de l'analyse de l'eau pour caractériser la matière organique. Cette technique a l'avantage de ne nécessiter qu'une très faible quantité de produit et d'être facilement mise en œuvre sans préparation d'échantillon préalable. Elle ne fournit cependant qu'un nombre limité d'informations structurales. Quand la MOD en solution dans l'eau est soumise à un rayonnement dans la gamme de longueurs d'onde 200 à 800 nm, les différents chromophores qu'elle comporte subissent des transitions électroniques. Le spectre alors obtenu présente un fond continu avec une augmentation marquée de l'absorbance dans le domaine des très courtes longueurs d'onde comme l'illustre la Figure 4.

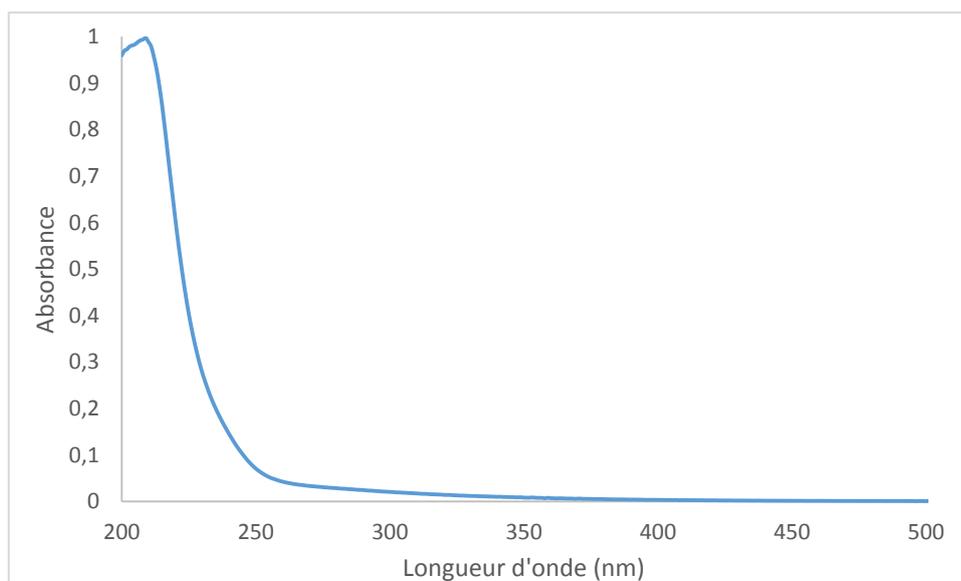


Figure 4 : Spectre d'absorption UV-visible d'un échantillon d'eau naturelle contenant de la matière organique.

La loi de Beer-Lambert permet de relier l'absorbance d'une solution à sa concentration :

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot l \cdot c \quad \text{Équation 1}$$

où $\epsilon(\lambda)$ est le coefficient d'absorption molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), c la concentration ($mol \cdot L^{-1}$) de la solution et l la longueur du trajet optique (cm). Cette relation n'est valable que dans un domaine limité de concentrations. Lors de nos manipulations, les concentrations des espèces étudiées ont été choisies de manière à être dans le domaine de linéarité.

b) Appareillage

Les spectres d'absorption électronique ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Cary UV 100 Bio (Varian) entre 200 et 800 nm à une vitesse de 150 nm/min pour tous les composés étudiés avec une résolution spectrale de 1 nm.

2. Spectroscopie de fluorescence

Les substances humiques, quelle que soit leur origine, présentent des propriétés de fluorescence qui sont étudiées depuis les années 1970 (Lévesque 1972).

a) Théorie

Un système chimique (atome, ion, molécule) se trouvant dans un état excité après absorption d'un rayonnement électromagnétique peut revenir vers l'état fondamental en émettant un rayonnement qui porte le nom d'émission de fluorescence (Figure 5)

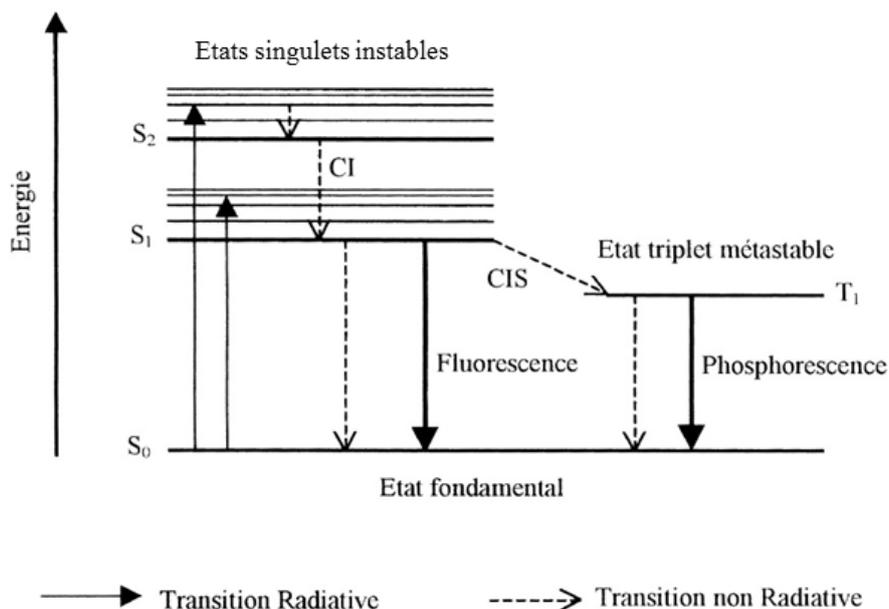


Figure 5 : Diagramme de Jablonski (CI : conversion interne, CIS : croisement inter-système).

Il y a deux types de fréquences caractéristiques en spectroscopie de fluorescence : celle de l'émission et celle de l'excitation. Le spectre d'émission correspond à la variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde du rayonnement d'émission, pour une longueur d'onde d'excitation fixée. Le spectre d'excitation correspond à la variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde du rayonnement d'excitation, pour une longueur d'onde d'émission fixe. Ces spectres sont appelés des spectres de fluorescence 2D. En parallèle de ces deux techniques, ont été développés depuis plusieurs années d'autres modes d'enregistrement spectral tels que l'enregistrement de spectres de fluorescence synchrone (Cabaniss 1992) ou encore des matrices d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF), qui permettent d'étudier des mélanges de fluorophores. L'enregistrement des spectres synchrones se fait en balayant simultanément en excitation et en émission et en gardant constante la différence entre la longueur d'onde excitatrice et la longueur d'onde d'émission.

Les MEEF s'obtiennent en enregistrant successivement un très grand nombre de spectres d'émission à différentes longueurs d'onde d'excitation. Elles contiennent ainsi simultanément les spectres d'excitation, d'émission et synchrones et permettent de visualiser le domaine spectral dans son ensemble et d'observer les maxima de fluorescence caractéristiques des fluorophores qui composent l'échantillon.

b) Phénomènes parasites

Plusieurs phénomènes peuvent entrer en compétition lors de l'enregistrement des différents spectres de fluorescence.

- Phénomènes de diffusion de la lumière : Les diffusions Rayleigh et Raman

La diffusion Rayleigh est une diffusion élastique de la lumière, ce qui signifie sans changement de l'énergie des photons donc sans changement de la longueur d'onde de la lumière diffusée par rapport à la lumière incidente. La diffusion Raman est définie comme étant la diffusion inélastique d'un photon par un milieu donné. Il y a échange d'énergie entre le photon incident et la molécule et la lumière diffusée subit un changement de longueur d'onde. Cette diffusion dépend du solvant employé. Pour corriger ces diffusions, une soustraction de la fluorescence du solvant peut être effectuée ou encore des outils mathématiques peuvent être employés pour les minimiser.

- Effets de filtre interne

Si la concentration de l'espèce fluorescente est trop importante, une partie de la lumière incidente est absorbée avant d'atteindre le centre de la cuve entraînant une diminution de l'intensité de fluorescence. Pour pallier ce phénomène, plusieurs précautions peuvent être prises : par exemple, la concentration en carbone organique dissous (COD) de l'échantillon doit être inférieure à 10 mg C.L⁻¹ (Ohno 2002, Baker et al. 2004, Hudson et al. 2007) ou bien l'absorbance de l'échantillon doit être inférieure à 0,1 (Valeur, 2001). Si ces valeurs sont dépassées, il faut procéder à une dilution de l'échantillon.

c) Appareillage

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence et les MEEF ont été enregistrés à l'aide de plusieurs appareils : un spectrofluorimètre Fluoromax-3 et un Fluorolog (Jobin Yvon) ainsi qu'un spectrofluorimètre Cary Varian Eclipse. Les spectres d'émission des composés étudiés ont été enregistrés avec une résolution spectrale de 1 nm et dans une gamme de longueurs d'onde couvrant

l'UV et le visible. Quant aux MEEF, elles ont été enregistrées sur une gamme spectrale allant de 300 à 600 nm pour l'émission et de 240 à 450 nm pour l'excitation, avec un pas de 5 nm.

3. Dispositif et suivi expérimental

Pour réaliser les suivis de complexation, un système à circulation (Figure 6) constitué d'un réacteur clos et sous atmosphère inerte a dû être mis en place pour éviter la carbonatation et l'oxydation des échantillons.

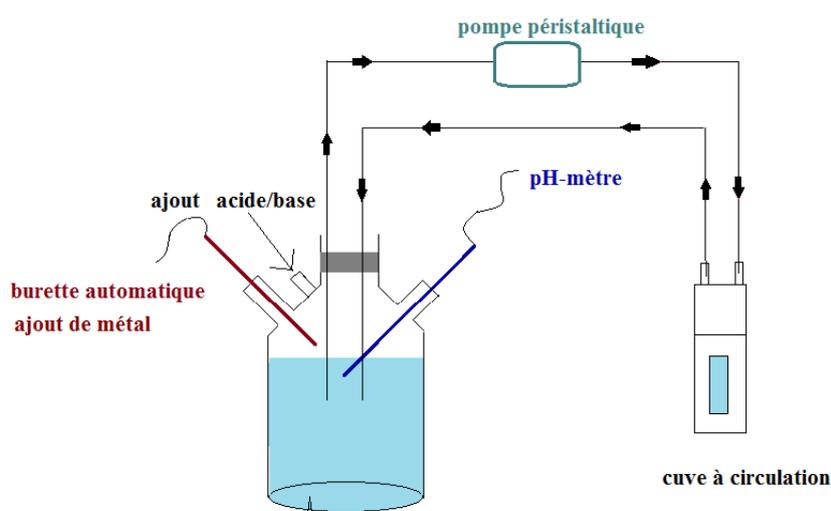


Figure 6 : Schéma du dispositif expérimental utilisé dans le cas du suivi de complexation par les techniques de spectroscopie électronique.

Ce montage expérimental est composé d'une pompe péristaltique permettant de faire circuler la solution entre le réacteur et la cellule de mesure en quartz (Suprazil, Hellma®), d'une burette automatique pour un ajout précis de la quantité de métal et d'un pH-mètre pour vérifier et ajuster en permanence le pH de la solution (le pH est conservé constant au cours du dosage). Ce dispositif est utilisé aussi bien en spectroscopie d'absorption qu'en spectroscopie d'émission, il présente le gros avantage d'éviter la manipulation de la cellule de mesure au cours du dosage. Il faut noter que l'enregistrement du spectre est déclenché après un certain laps de temps après l'ajout du sel métallique à la solution afin que l'équilibre de complexation soit atteint. Ce laps de temps est prédéterminé au moyen d'une étude cinétique préalable ; il est de l'ordre de grandeur de quinze à trente minutes.

III. Caractérisation de la matière organique dissoute

Afin d'étudier correctement la complexation des cations métalliques avec la MOD, il est primordial dans un premier temps de caractériser cette dernière. La caractérisation de la MOD passe par un échantillonnage et un conditionnement particulier des échantillons, une série d'analyses et de dosages ainsi qu'un traitement multivarié des résultats. Dans cette partie sera détaillée les procédures utilisées pour l'ensemble des analyses.

1. Stratégie d'échantillonnage

Dans l'objectif de caractériser et d'étudier la variation saisonnière de la matière organique dans les eaux naturelles, des prélèvements ont été effectués mensuellement de septembre 2014 à février 2015 aux points LM1, LM3, LM4 et LH4 pour le site d'étude de la Marque et du Lac du Héron. Concernant le site de Germignies, des prélèvements ont été réalisés plus ponctuellement entre la période de mars 2016 à février 2017 pour les points de GE01 à GE15.

Pour les deux sites d'études, les prélèvements ont été réalisés depuis la rive de la masse d'eau en suivant les techniques usuelles de prélèvements d'eau de surface. Une perche de prélèvement ainsi qu'une bouteille en Téflon® ont été utilisées pour prélever les échantillons d'eau à 20 cm sous la surface, après un triple rinçage avec l'eau à prélever. Les échantillons ont été directement filtrés sur place avec des seringues en verre et des filtres en fibre de verre (0,7 µm, GF/F). L'ensemble du matériel de prélèvement ainsi que les tubes réceptacles en verre ont été préalablement lavés à l'acide nitrique 10% (v/v, suprapur, 65 %) et rincés trois fois à l'eau MilliQ (18 MΩ cm, Elga). De plus, les tubes et seringues en verre ont été, au préalable, calcinés au four à 450°C pendant au moins 12h afin d'éliminer toute trace de matière organique.

2. Carbone organique dissous

Les teneurs en carbone organique dissous (COD) ont été mesurées à l'aide d'un appareil à combustion catalytique à 680°C (Shimadzu, TOC-VCSH). Le carbone organique dosé est le NPOC (Non Purgeable Organic Carbon). L'échantillon à analyser contient une part de carbone organique et une part de carbone inorganique dissous. Le principe de la mesure consiste en une oxydation catalytique à haute température du carbone organique contenu dans les échantillons filtrés. La méthode appliquée par le COT-mètre permet d'injecter de l'acide chlorhydrique (2M) afin d'éliminer par bullage le carbone inorganique (ainsi que les composés organiques volatils). La solution subit ensuite une combustion dans un four à 680°C avec un catalyseur à base de platine afin de transformer le

COD en CO₂. La concentration en CO₂ détectée dans une cellule infrarouge est proportionnelle à la surface intégrée du pic et permet d'estimer la concentration en COD contenue initialement dans l'échantillon après étalonnage. Pour chaque échantillon, le résultat donné est la moyenne d'au moins trois mesures satisfaisantes en termes d'écart type et de coefficient de variation et la limite de quantification est de 0,1 mg C.L⁻¹.

3. Le paramètre SUVA

Les chromophores comportant des atomes de carbone liés par des doubles liaisons conjuguées, comme ceux constitutifs de la matière organique, ont la propriété d'absorber les rayonnements ultra-violets, notamment pour les longueurs d'onde 254 et 280 nm (Peuravuori et al. 1997). Cette propriété est utilisée pour doser les matières organiques contenues dans l'eau, sachant que la proportion d'atomes de carbone hybridés sp² est proportionnelle à la quantité de matière organique contenue dans l'eau. Grâce à la valeur d'absorbance à 254 ou 280 nm et à la concentration en carbone organique dissous, l'absorbance spécifique (ou SUVA : Specific Ultra-Violet Absorbance) peut être calculée selon la formule :

$$\text{SUVA} = \frac{\text{absorbance à 254 ou 280 nm}}{\text{concentration en carbone organique} \times l} \times 100 \quad \text{Équation 2}$$

Où l est le trajet optique.

Le paramètre SUVA permet de déterminer le degré d'aromaticité des fractions de matière organique (Weishaar et al. 2003). Par exemple, des matières organiques issues du lessivage de sols forestiers auront tendance à être riches en atomes de carbones liés par des doubles liaisons conjuguées, car riches en acides humiques et auront donc une valeur de SUVA élevée, supérieure à 3 L.mgC⁻¹.m⁻¹. A l'inverse, des matières organiques issues de rejets urbains et/ou industriels seront plus pauvres en composés aromatiques, car constituées en majorité de composés organiques simples et auront une valeur de SUVA inférieure à 3 L.mgC⁻¹.m⁻¹. La spectrométrie UV-visible peut donc être appliquée, en première approximation, pour estimer l'origine et l'aromaticité de la MOD dans les eaux de surface. Elle peut également servir en tant qu'indicateur de changement de source de matière organique lors de suivis réguliers d'une masse d'eau.

4. Détermination des groupements thiols

La détermination de la présence et de la quantité de soufre dans un composé, telle que la matière organique est généralement obtenue au moyen d'une analyse élémentaire. Cependant cette technique ne donne que la quantité globale de soufre quelle que soit la fonction présente dans l'échantillon analysé (-SH ; -S=C, -SO₃...). Dans notre étude, nous souhaitons regarder la complexation des groupements thiols avec les métaux, pour cela la concentration des groupements thiols réactifs des différents échantillons de MOD a été déterminée par spectroscopie de fluorescence d'après la méthode décrite par Joe-Wong et al. (2012). Cette méthode utilise les propriétés complexantes et de fluorescence des bromobimanes solubles. En effet, la fluorescence de la monobromo (triméthylammonio)bimane (qBBR) augmente significativement quand elle se lie à un thiol. Cette méthode est spécifique pour la détection de thiols dans des mélanges hétérogènes puisque la présence d'autres espèces sulfurées n'entraîne pas d'interférence. La détermination de la concentration de groupements thiols dans les différents échantillons est réalisée par une méthode d'ajouts dosés. Une quantité croissante de qBBR est ajoutée à l'échantillon ; après chaque ajout, l'intensité d'émission de fluorescence est mesurée pour le couple $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/470$ nm (maximum d'absorption/maximum d'émission de qBBR). L'intensité de fluorescence est ensuite tracée en fonction de la concentration de qBBR. La différence de pente observée permet de déterminer la concentration en fonctions thiols, le point d'inflexion de cette courbe correspondant à la concentration en groupements thiols de la solution (Figure 7).

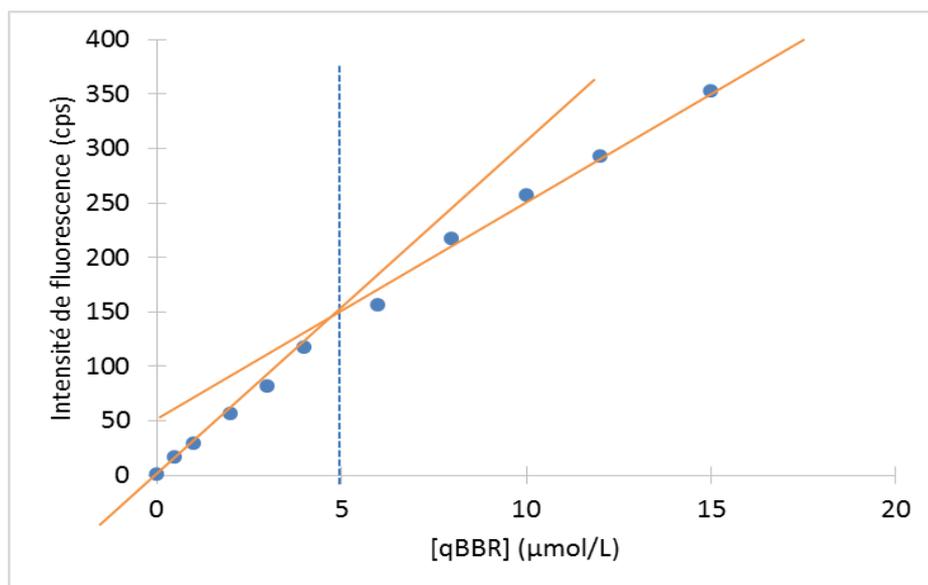


Figure 7 : Exemple de la détermination de la quantité de groupements thiols pour une solution de cystéine à $5\mu\text{mol.L}^{-1}$. Intensité de fluorescence du complexe formé entre la qBBR et les groupements R-SH de la solution de cystéine puis, après le point d'inflexion, intensité de fluorescence du qBBR en excès, en fonction de la concentration de qBBR ajouté. Le point d'inflexion correspond alors à la quantité de R-SH de la solution de cystéine.

En effet l'intensité de la fluorescence étant dans notre cas proportionnelle à la concentration, la première partie correspond au qBBr lié à une fonction thiol, la deuxième étant quant à elle caractéristique du qBBr libre.

5. Indice de Fluorescence

Différents indices peuvent être déterminés à partir d'un spectre d'émission pour évaluer les variations des propriétés de fluorescence de la MOD (Fellman et al. 2010). Il a été choisi d'utiliser uniquement l'indice de fluorescence (IF) puisque c'est le seul indice caractéristique de nos échantillons de MOD, les autres indices étant spécifiques de la MOD provenant de sol ou d'estuaire (Coble et al, 2014). L'IF est défini à l'aide de l'Equation 3 :

$$IF = \frac{\text{Intensité de fluorescence émise à 470 nm}}{\text{Intensité de fluorescence émise à 520 nm}} \text{ pour une longueur d'onde d'excitation de 370 nm} \quad \text{Équation 3}$$

Cet indice donne des informations sur la source de la matière organique, notamment si elle est d'origine terrestre (issue de la décomposition des végétaux comme les feuilles et dans ce cas, les valeurs de IF sont inférieures à 1,2) ou si elle provient d'une dégradation d'organismes autochtones comme les algues ou le phytoplancton (avec des valeurs de IF supérieures à 1,8). Une valeur comprise entre 1,2 et 1,8 indique une origine mixte (Cory et al. 2005).

6. MEEF

L'enregistrement et la compilation de spectres d'émissions et d'excitation de fluorescence permet de constituer des MEEF (Figure 8).

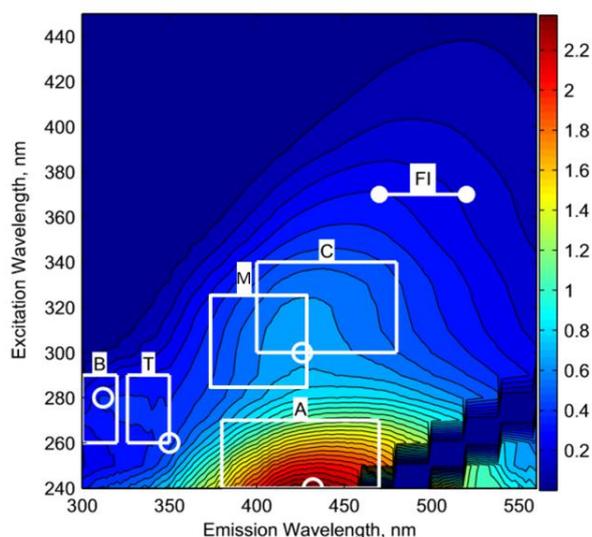


Figure 8 : MEEF d'un échantillon de MON. La signification des lettres A, C, T, B et M se trouve dans le Tableau 2. FI : zone indice de fluorescence.

Sur cette dernière Figure 8 apparaît des pics ou massifs de fluorescence correspondant à des fluorophores. Les principaux fluorophores observés constitutifs de la MOD se divisent en deux groupes : les protéines représentées par les fluorophores de type tyrosine (B), tryptophane (T) et les substances humiques représentées par les fluorophores de type acide fulvique (A) et acide humique (C). Ces fluorophores possèdent des pics (maximum de fluorescence) spécifiques caractérisés par des couples de longueurs d'onde d'excitation et d'émission répertoriés dans la littérature (Tableau 2) (Hudson, Baker et al. 2007, Henderson et al. 2009, Fellman, Hood et al. 2010).

Nature des fluorophores	Maximum d'excitation et d'émission (nm)	Nom du pic (Coble et al.1996, Parlanti et al. 2000)	Description
Tyrosine-like	Ex 270-274 Em 304-321	B(Υ)	Acide aminé, lié à une protéine ou non. Peut indiquer de la matière peptidique dégradée.
Tryptophane-like	Ex 270-280 Em 330-368	T(Υ)	Acide aminé, libre ou lié à une protéine. Peut indiquer la présence de protéines intactes ou moins dégradées.
Humique	Ex 290-325 Em 370-430	M (β)	Faible poids moléculaire. Commun en milieu marin, associé à l'activité biologique. Mais peut être trouvé dans les eaux usées, zones humides et milieux agricoles.
Humique	Ex <260 Em 448-480	A (α')	Humique moins aromatique très répandu et à haut poids moléculaire.
Humique	Ex 320-360 Em 420-460	C (α)	Humique très répandu à haut poids moléculaire et très aromatique.

Tableau 2 : Principaux fluorophores contenus dans les matières organiques aquatiques.

7. PARAFAC

Dans la littérature, il est rapidement apparu nécessaire d'utiliser des outils statistiques robustes pour le traitement qualitatif et quantitatif de l'ensemble des données multivariées obtenues grâce à l'enregistrement des MEEF. Stedmon (2003) ont été les premiers à appliquer l'analyse « PARAllel FACor » ou PARAFAC afin de suivre la fluorescence de la MOD dans différents environnements aquatiques. Cette approche mathématique a permis l'identification de fractions fluorescentes dans les eaux douces (Stedmon et al. 2003), les estuaires et l'eau de mer (Stedmon et al. 2005, Hall et al. 2007).

a) Principe

L'analyse PARAFAC est un traitement mathématique permettant de caractériser et de quantifier les fluorophores présents dans un jeu de données. C'est une méthode statistique multivariée basée sur un algorithme utilisant la méthode itérative des moindres carrés et qui est utilisée pour déconvoluer les signaux contenus dans des MEEF complexes dans lesquelles se trouvent des signaux de différents fluorophores ou composantes (Bro 1997). Les données de fluorescence spectrale sont multivariées (trois variables) car l'intensité de fluorescence d'un échantillon varie en fonction de la longueur d'onde de la lumière absorbée (excitation) et de la longueur d'onde à laquelle la fluorescence est observée (émission). La combinaison des données d'une série d'échantillons donne lieu à un cube de données où les longueurs d'onde d'excitation (Ex), les longueurs d'onde d'émission (Em) ainsi que le nombre de matrices représentent les 3 dimensions du cube (Figure 9).

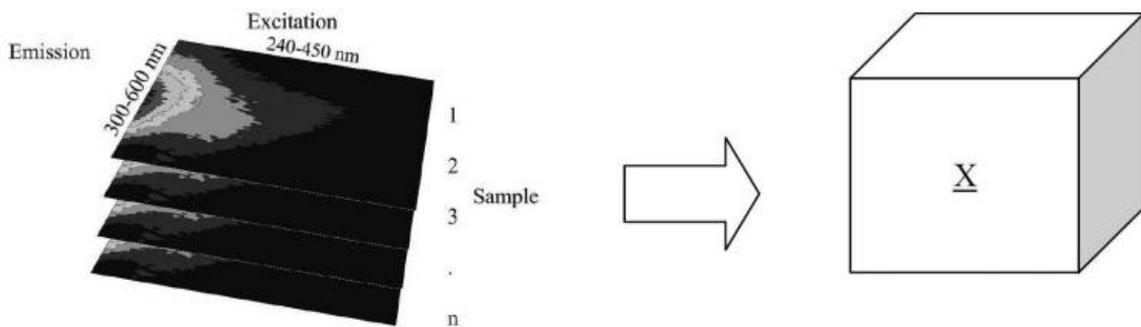


Figure 9 : Transformation d'un jeu de données de matrices MEEF en un cube X à trois dimensions (Stedmon et al. 2008).

Le modèle PARAFAC repose sur l'équation 4 :

$$X_{i,j,k} = \sum_{f=1}^F a_{i,f} b_{j,f} c_{k,f} + \epsilon_{i,j,k} \text{ avec } i=1,\dots,I \text{ et } j=1,\dots,J \text{ et } k=1,\dots,K \quad \text{Équation 4}$$

avec

$X_{i,j,k}$: l'intensité de fluorescence de l'échantillon i à la $j^{\text{ème}}$ longueur d'onde d'Em et à la $k^{\text{ème}}$ longueur d'onde d'Ex

F : le nombre de fluorophores présents dans chaque MEEF

$a_{i,f}$: le facteur proportionnel à la concentration du fluorophore f dans l'échantillon i

$b_{j,f}$: l'estimation de l'intensité d'émission (Em) du fluorophore f à la longueur d'onde j

$c_{k,f}$: l'estimation de l'intensité d'excitation (Ex) du fluorophore f à la longueur d'onde k

$\epsilon_{i,j,k}$: la somme des résidus des matrices (la variabilité non expliquée par le modèle)

Les résultats du modèle sont les paramètres a , b et c . Idéalement, ceux-ci représentent respectivement la concentration, les spectres d'émission et les spectres d'excitation des fluorophores sous-jacents. Pour résoudre l'équation précédente, la méthode itérative des moindres carrés est utilisée en définissant un nombre de fluorophores F et les itérations successives vont permettre d'estimer la structure de chaque fluorophore en minimisant l'erreur sur le résidu. La solution du modèle est trouvée quand l'algorithme atteint le minimum global. L'analyse PARAFAC va créer plusieurs modèles ayant différents nombres de fluorophores (Figure 10).

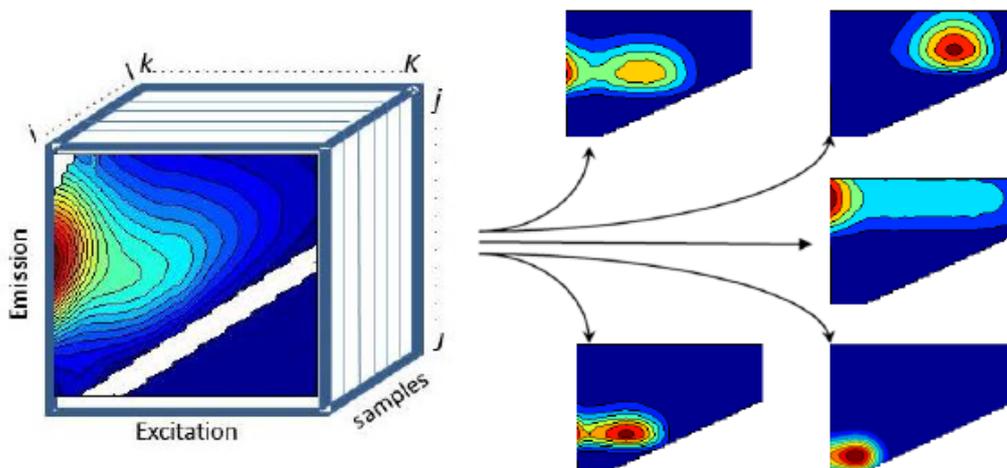


Figure 10 : Décomposition des MEEF en fluorophores indépendants par l'outil PARAFAC.

De plus le traitement PARAFAC, comme pour de nombreuses approches analytiques et statistiques, nécessite plusieurs hypothèses fondamentales pour être appliqué à l'étude de MOD fluorescente. L'une d'elle est que le changement de la concentration du fluorophore résulte uniquement d'un changement de son intensité de fluorescence et non de la forme des spectres d'excitation (c) et d'émission (b). A cela s'ajoute que les modifications de la fluorescence spectrale d'un fluorophore à la suite d'effets de filtre interne sont supposés minimales.

b) Mise en place du modèle

La mise en place d'un modèle PARAFAC passe par plusieurs étapes. La première est l'assemblage des données, c'est-à-dire le regroupement de l'ensemble des MEEF des échantillons en une seule et même matrice.

La seconde étape est le prétraitement de cette matrice. Cette étape a pour but (1) de corriger les biais systématiques dans l'ensemble de données, (2) de supprimer les signaux non liés à la fluorescence, et (3) de normaliser les ensembles de données ayant des différences d'intensité élevées entre les échantillons.

La troisième étape est une étape d'exploration qui a pour but d'obtenir le meilleur jeu de données possible pour la modélisation et ainsi obtenir une première idée sur le nombre de composantes PARAFAC qu'il peut contenir. L'un des principaux objectifs ici est d'identifier et de supprimer des données non représentatives ou de mauvaise qualité ainsi que des « outliers », échantillons ou variables (longueurs d'onde) qui pourraient empêcher l'obtention d'un modèle satisfaisant. Les valeurs aberrantes peuvent être le résultat d'erreurs d'échantillonnage ou d'analyse, mais elles pourraient également ne pas être représentatives du reste de l'ensemble de données pour des raisons parfaitement légitimes. Quoi qu'il en soit, les valeurs aberrantes doivent être examinées individuellement pour déterminer la raison probable de leur différence, et dans les cas extrêmes, il peut être nécessaire de les éliminer de la matrice de données. La détermination des « outliers » fait partie du savoir-faire de la modélisation PARAFAC et doit être effectuée plusieurs fois au cours du développement du modèle. Une façon d'identifier les valeurs aberrantes consiste à examiner la structure du résidu des erreurs (Figure 11). Idéalement, les échantillons et les longueurs d'onde d'un ensemble de données afficheront des appariements approximativement semblables.

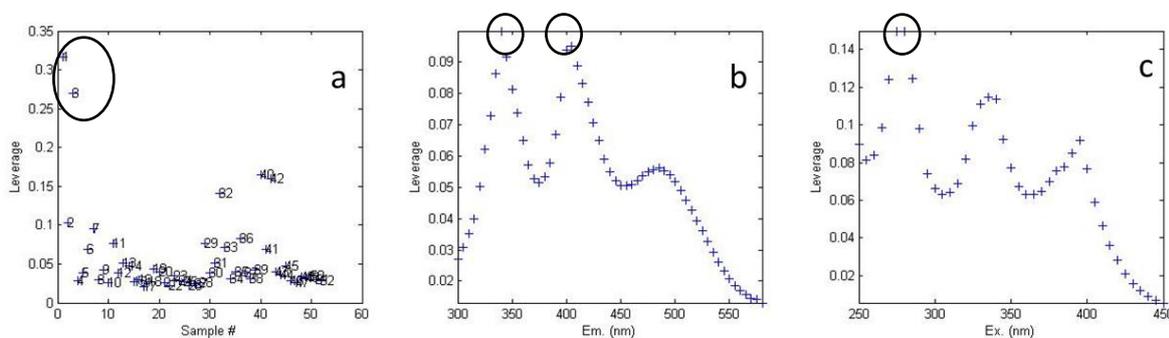


Figure 11 : Résidu des erreurs montrant des valeurs aberrantes (a) les échantillons 1 et 8 (b) les longueurs d'onde d'émission à 340 nm et 410 nm; (c) les longueurs d'onde d'excitation surtout à proximité 275 nm, à forte influence sur le modèle.

La quatrième et dernière étape consiste en la validation du modèle PARAFAC. Cela consiste dans le choix du nombre de composantes et à l'interprétation chimique du modèle PARAFAC. Il existe de nombreuses façons d'évaluer si un modèle PARAFAC a été spécifié avec le nombre correct de composantes. Aucune méthode unique n'existe mais la combinaison de plusieurs méthodes permet de vérifier la véracité d'un modèle autant que possible.

Une fois le nombre de composantes choisi, la première vérification à effectuer est l'inspection visuelle des spectres d'excitation/émission obtenus pour les différentes composantes. Cette vérification repose sur une interprétation chimique directe des spectres. Dans notre cas, nous étudions des fluorophores organiques indépendants qui n'interagissent pas dans l'eau et qui doivent donc présenter les caractéristiques suivantes :

- Recouvrement minimal entre les spectres d'excitation et d'émission (habituellement <50 nm).
- Les spectres d'excitation peuvent avoir plusieurs maxima, mais les spectres d'émission présentent un seul maximum distinct.
- Les spectres d'excitation et d'émission ne présentent pas de changements abrupts sur des gammes de longueur d'onde restreintes.

La Figure 12 montre un cas de spectres correct et trois cas de spectres atypiques concernant la matière organique invalidant le modèle PARAFAC.

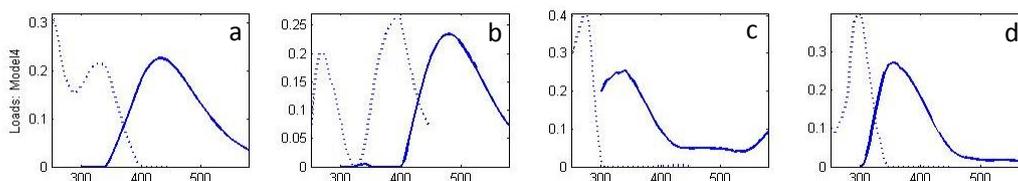


Figure 12 : Exemple de composante idéale (a) et de composantes aberrantes : (b) changements spectraux brusques sur de courtes plages de longueurs d'onde, (c) plusieurs pics d'émission distincts, (d) spectre d'excitation se dirigeant vers le spectre d'émission. Les courbes en pointillés noirs et en bleu représentent respectivement les spectres d'excitation et d'émission.

La seconde méthode consiste en l'analyse de l'erreur sur le résidu qui doit être minimale ainsi que le reflet d'un bruit de fond instrumental et non d'un fluorophore (Figure 13). Cette information permet de définir si la totalité des données des MEEF a été prise en compte ou pas.

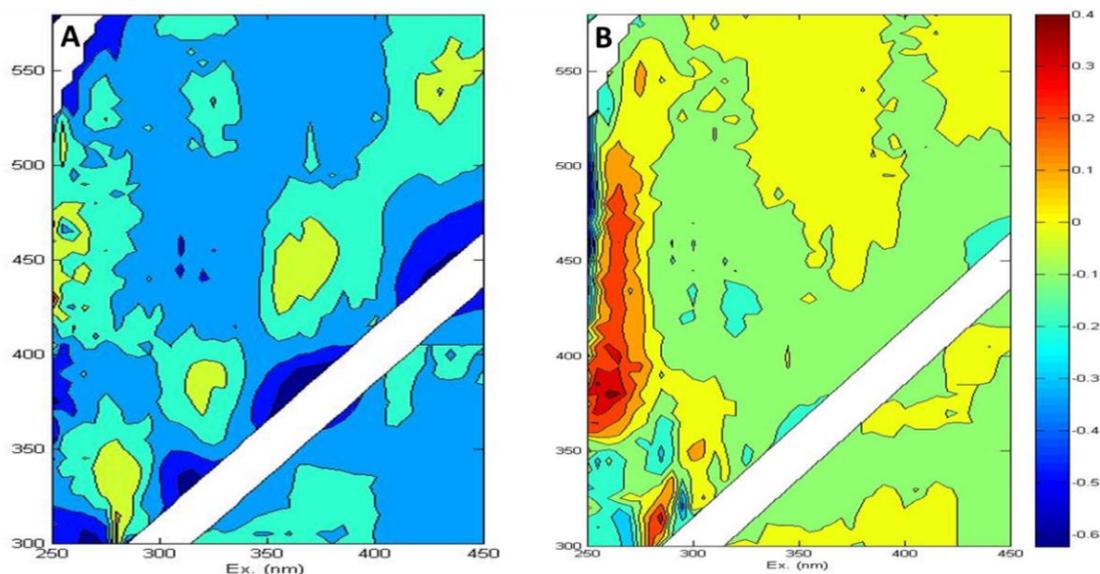


Figure 13 : (A) Résidus pour un échantillon modélisé adéquat avec des pics mineurs le long de la diagonale et (B) un échantillon mal modélisé.

Sur la Figure 13A, les petits pics qui apparaissent le long de la diagonale peuvent être ignorés, car ils ne sont pas trilineaires et ne devraient pas figurer dans le modèle (Il s'agit ici des diffusions Raman et Rayleigh). Cependant, les pics et creux adjacents visible sur la Figure 13B indiquent souvent un problème, les résidus montrent un massif de fluorescence qui n'a pas été pris en compte dans les différentes composantes, et donc invalide le modèle.

Une autre méthode qui donne une indication du nombre de composantes dans un modèle PARAFAC peut être obtenue à partir du diagnostic de « core-consistency » qui évalue la pertinence du modèle. Lorsqu'une séquence de modèles est exécutée avec un nombre croissant de composantes, le core-consistency tend à démarrer haut (près de 100%) puis s'abaisse brusquement lorsque trop de composantes sont sélectionnées. Le nombre de composantes est alors déterminé de manière à obtenir le core-consistency optimal (Bro et al. 2003). Cependant, en pratique pour les ensembles de données issus de la MOD, le core-consistency n'est pas toujours un diagnostic fiable du nombre de composantes PARAFAC nécessaires (Bosco et al. 2006, Murphy et al. 2008, Murphy et al. 2011). Dans l'ensemble, il semble que le core-consistency appliqué aux MEEF de la MOD peut fournir une protection excessive contre le sur-ajustement et une protection insuffisante contre le sous-ajustement du choix du nombre de composantes. L'application de cette méthode se fera donc au cas par cas en fonction des résultats des autres méthodes.

La dernière méthode employée pour la vérification du modèle PARAFAC est la réalisation de la « split-half analysis ». Le jeu de données est alors divisé en sous-groupes (usuellement 4).

Sur chacun des sous-groupes d'échantillons, des modèles ayant chacun un nombre différent de fluorophores sont créés indépendamment. La split-half analysis compare, sur chacun des groupes, les spectres d'excitation et d'émission générés pour un modèle contenant F fluorophores (Figure 14). Si les résultats obtenus sont similaires, alors le modèle est validé et est considéré comme robuste.

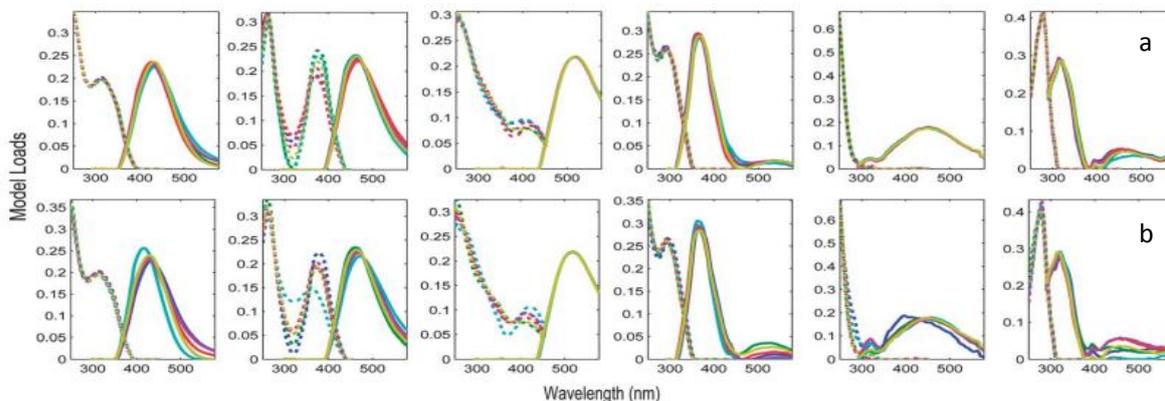


Figure 14 : Analyse « Split-half » avec a) modèle validé par une bonne superposition des spectres d'émission et d'excitation des différents groupes et b) modèle non validé, mauvaise superposition des spectres d'émission et d'excitation.

L'application des différents modèles PARAFAC et la validation de ceux-ci a été faite en suivant la démarche proposée par Murphy et al (2011) et à l'aide de la Toolbox drEEM sur MATLAB® 7.10.0 (R2014a).

8. Spectromètre de masse à transformée de Fourier (FT-ICR-MS)

Dans le but de caractériser plus finement les échantillons de MOD et obtenir des informations qualitatives complémentaires sur la composition élémentaire, moléculaire et structurale, des analyses par spectrométrie de masse par résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR-MS) ont été réalisées au Helmholtz center de Munich (Allemagne).

La FT-ICR-MS est un type de spectromètre de masse qui permet de déterminer le rapport masse sur charge (m/z) d'ions, grâce à la fréquence cyclotronique de ceux-ci dans un champ magnétique fixe. Dans une cellule ICR, les ions sont piégés par deux plaques perpendiculaires au champ magnétique auxquelles un potentiel est appliqué. Les ions adoptent alors un mouvement d'oscillation entre ces deux plaques. L'application d'un champ magnétique de même fréquence cyclonique d'un ion présent, conduit à l'absorption d'énergie par l'ion augmentant ainsi son énergie cinétique et de ce fait son rayon de mouvement d'oscillation. Il s'agit du phénomène de résonance de l'ion. De plus en utilisant l'isolement et la fragmentation d'ions (MS/MS), il est possible d'obtenir de nombreuses informations structurales.

La très grande précision de mesure de masse et la très haute résolution permettent l'identification de formule chimique brute des ions dans des échantillons complexes. Il est alors possible de résoudre des milliers de formules moléculaires individuelles dans des échantillons naturels de MOD.

Dans cette étude, la FT-ICR-MS (12T Bruker Solarix) à ionisation par électrospray (ESI) en mode négatif (Apollo II) a été utilisée permettant ainsi l'obtention des spectres de masse et des formules moléculaires pour la plupart des ions résolus des échantillons de MOD. La figure 15 représente schématiquement le fonctionnement de la FT-ICR-MS.

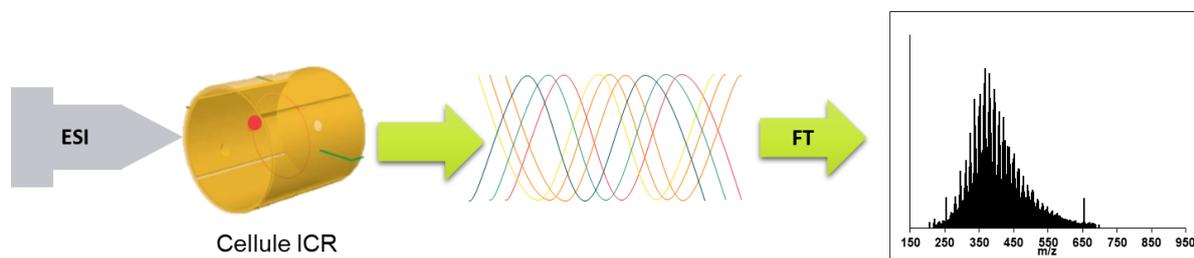


Figure 15 : Schéma de principe simplifié de la FT-ICR-MS.

IV. Caractérisation des complexes métalliques

La stratégie utilisée pour la caractérisation de la complexation de la MOD et des molécules modèles avec les métaux est explicitée dans cette partie.

1. Cas de la MOD et des extraits de MOD.

Dans le cas de MOD et des extraits de MOD, nous avons utilisé le modèle de Ryan et Weber (1982). Ce modèle repose sur le « quenching statique » ou extinction de fluorescence provoqué par la réaction entre un fluorophore et un désactivateur (ici, le cation métallique) qui va former un complexe. Les propriétés de fluorescence du complexe sont différentes de celles du fluorophore d'origine et de ce fait, l'intensité du signal du fluorophore cible va diminuer (Lakowicz 2006). L'étude des propriétés complexantes des MOD issues des eaux de surfaces et des extraits de MOD vis-à-vis des cations métalliques étudiés réside sur le phénomène d'extinction ou quenching de fluorescence, qui traduit la diminution de l'intensité du rayonnement de fluorescence.

Cette approche a été initialement développée par Ryan et Weber et améliorée par Plaza et al. (2006). Cette technique permet de déterminer la concentration en ligand non complexé et d'en déduire ainsi les paramètres de complexation. Son principal intérêt réside dans sa facilité de mise en œuvre, sa grande sensibilité et la possibilité de réaliser des mesures dans des conditions expérimentales similaires à celles trouvées dans l'environnement sans traitement préalable des échantillons.

Le traitement des données expérimentales résulte d'une relation entre l'intensité de fluorescence mesurée et la concentration en métal et des hypothèses suivantes (qui constituent également des limites du modèle) :

- Le métal libre ne doit pas entraîner d'extinction de fluorescence
- Les matières organiques se comportent dans leur ensemble comme un seul type de ligand dont les propriétés moyennes sont représentées par une constante de formation K.
- Les complexes formés sont de stœchiométrie 1:1
- La relation entre l'extinction de fluorescence et la concentration en métal ajouté est linéaire.

Pour un métal M et un Ligand L, le système obéit aux équations suivantes :



et avec les lois d'action de masse $C_m = [M] + [ML]$ et $C_l = [L] + [ML]$

L'extinction de fluorescence correspond, quant à elle, à la différence entre l'intensité I_0 mesurée en l'absence de métal et l'intensité I en fonction de la quantité de métal ajouté. I_{ml} étant l'intensité de fluorescence du complexe formé quand tous les sites sont occupés.

Si l'on émet l'hypothèse que seuls les sites non complexés donnent lieu à la fluorescence, on peut alors exprimer la fraction de sites complexés X_{ML} par :

$$X_{ml} = \frac{[ML]}{[C_l]} = \frac{I_0 - I}{I_0 - I_{ml}} \quad \text{Équation 6}$$

En remplaçant $[M]$ par $C_m - (X_{ML} * C_l)$, on obtient un polynôme du second degré en X_{ML} :

$$(K \cdot C_l) X_{ml}^2 - (1 - K \cdot C_m + K \cdot C_l) X_{ml} + K \cdot C_m = 0 \quad \text{Équation 7}$$

Cette équation admet une seule solution physiquement acceptable du type :

$$I = I_0 + (I_{ml} - I_0) * \frac{1}{(2 KC_l)} * (1 + KC_l + KC_m - \sqrt{(1 + KC_l + KC_m)^2 - 4K^2 C_l C_m}) \quad \text{Équation 8}$$

La résolution de cette équation 8 s'est faite à l'aide d'une méthode de régression non linéaire permettant ainsi de déterminer K , I_{ml} , C_l à partir de la courbe $I=f(C_m)$. Ce calcul a été réalisé avec le solveur du logiciel Excel.

2. Cas des molécules modèles

Dans le cadre des molécules modèles, nous connaissons parfaitement les concentrations en fonctions complexantes, ce qui permet d'utiliser des méthodes plus quantitatives et ainsi de déterminer la stœchiométrie et les constantes de formation des complexes.

a) Détermination de la stœchiométrie des complexes

La méthode des rapports molaires, introduite pour la première fois par Yoe et al. (1944), permet de déterminer la stœchiométrie des complexes en solution à partir des différentes données spectrométriques.

Pour déterminer la stœchiométrie du complexe formé entre un ligand (L) et un métal (M) selon la réaction suivante : $xL + yM \rightleftharpoons L_xM_y$, on réalise une gamme de solutions dans lesquelles la concentration de ligand total $[L]_t$ ne varie pas, tandis que celle du métal croît progressivement jusqu'à un rapport $R = \frac{[M]}{[L]_t}$ qui dépasse la stœchiométrie attendue du complexe.

Expérimentalement, on ajoute une quantité croissante de solution d'ions métalliques à une quantité fixe en ligand en gardant le pH constant.

Pour obtenir la composition du complexe à partir du faisceau de spectres obtenus, on trace l'évolution de l'absorbance aux longueurs d'onde des maxima de la molécule ou du complexe en fonction de R. La courbe ainsi tracée peut avoir différentes formes (Figure 16) :

✓ Dans le cas de la formation d'un complexe unique possédant une constante de formation élevée, la courbe $A(\lambda_{max})$ en fonction de R (Figure 15a) est composée de deux droites dont le point d'intersection donne directement le rapport $\frac{[M]}{[L]} = \frac{y}{x}$ du complexe (stœchiométrie).

✓ Pour un complexe unique ayant une constante de formation plus faible, on observe une variation graduelle de la pente (Figure 15b), jusqu'à l'obtention d'un plateau pour des rapports élevés, l'absorbance ne variant plus. Dans ce cas, la stœchiométrie du complexe correspond au rapport trouvé à l'intersection des tangentes à la courbe.

✓ Si plusieurs complexes se sont formés et que leurs constantes sont assez distinctes pour éviter le recouvrement des équilibres, la courbe est alors constituée de plusieurs segments de droite (Figure 15c). Les abscisses des changements de pente correspondent aux stœchiométries des différents complexes formés.

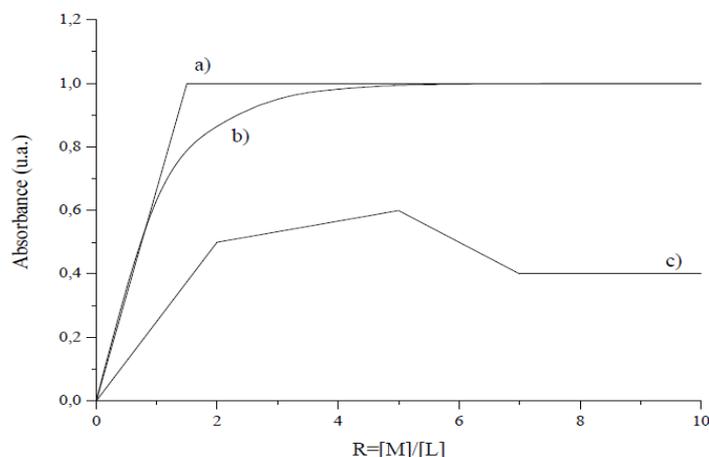


Figure 16 : Absorbance à λ_{\max} en fonction du rapport molaire $R = [M]/[L]$. a) formation d'un complexe unique de constante de formation élevée, b) formation d'un complexe unique de constante de formation plus faible et c) formation successive de trois complexes de constantes de formations distinctes.

Dans l'exemple de la complexation du plomb(II) par la 3-hydroxyflavothione (3-OHFT) dans le méthanol, le faisceau de spectres UV-visible (Figure 17) laisse apparaître des points isobestiques, ce qui est le signe que seules deux espèces sont en équilibre (la 3-OHFT et son complexe).

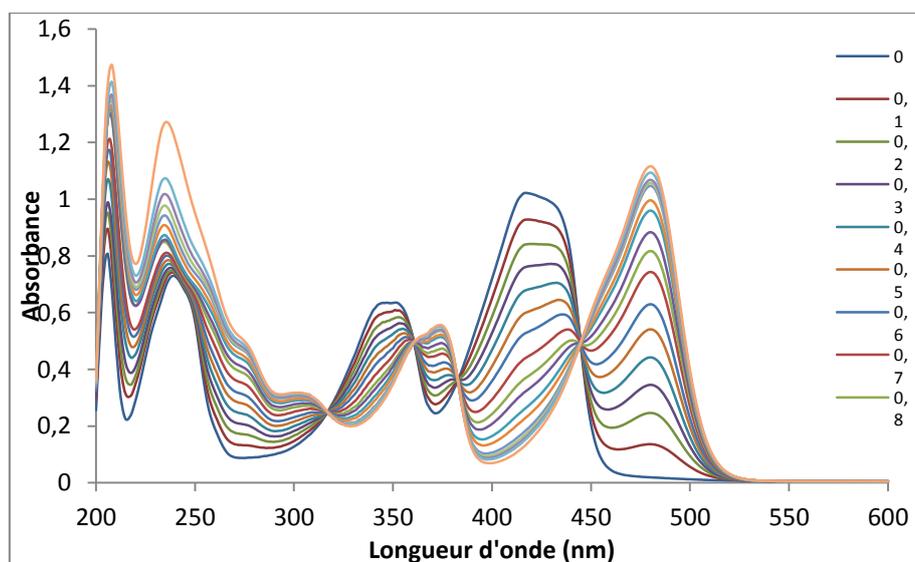


Figure 17 : Spectres d'absorption UV-visible de la 3-OHFT ($4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) dans le méthanol pour différents rapports $R = [\text{Pb(II)}]/[3\text{-OHFT}]$.

La méthode des rapports molaires appliquée à ce cas (Figure 18) confirme qu'il n'y a bien qu'un seul complexe en solution et qu'il présente une stœchiométrie 1:1 (métal:ligand).

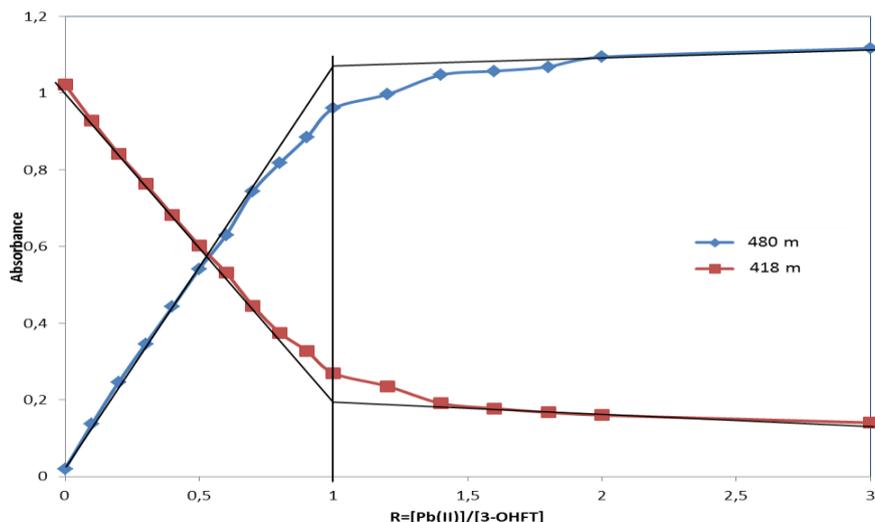


Figure 18 : Méthode des rapports molaires appliquée aux maxima d'absorption de la forme complexée avec Pb(II) à 480 nm (a) et de 3-OHFT libre à 418 nm (b).

Une autre méthode, la méthode des variations continues (ou méthode de Job) (Job 1928) qui consiste à faire varier la fraction molaire du ligand et du métal tout en conservant le volume et le nombre total de moles constants, permet également la détermination de la stœchiométrie des complexes. L'association des deux méthodes peut permettre de résoudre certains problèmes de détermination de stœchiométrie, notamment lorsque le système chimique est complexe et que de nombreuses espèces sont présentes simultanément en solution.

b) Détermination des constantes de formation des complexes

En complément de la méthode des rapports molaires qui est employée pour déterminer la stœchiométrie des complexes formés, le logiciel de traitement de données REACTLAB® a été utilisé. Ce logiciel permet de calculer les constantes de formation des espèces complexées formées. Pour cela, il est nécessaire de décomposer, dans un premier temps, les données expérimentales en spectres de composés purs par la méthode EFA : « Evolving Factor Analysis » (Gampp et al. 1985, Gampp et al. 1986, Gampp et al. 1988). Les spectres ainsi obtenus sont caractéristiques d'une espèce: du ligand libre sous ses différentes formes (protonnée, déprotonnée) ou des différents complexes. Dans un second temps, un modèle de complexation incluant les spectres des composés purs obtenus précédemment est proposé. Après attribution des spectres aux stœchiométries trouvées par la méthode des rapports molaires, une constante de formation de départ est affectée à chacun des complexes. Une fois le modèle proposé, les constantes de formation initialement

données sont affinées par la méthode des moindres carrés jusqu'à convergence des données. Pour minimiser le résidu des moindres carrés, le logiciel utilise la procédure de Levenberg-Marquardt. Enfin, pour vérifier la validité des résultats obtenus, il est possible de simuler la complexation à l'aide des paramètres calculés. La simulation obtenue doit être en accord avec l'expérience pour pouvoir valider le modèle proposé.

Le système de complexation suivant a été utilisé :



avec M l'ion métallique libre, L le ligand libre et H le proton. La constante de formation calculée est alors :

$$\beta_{mlh} = \frac{[M_m L_l H_h]}{[M]^m [L]^l [H]^h} \quad \text{Équation 9}$$

Dans le cas où le ligand perd des protons lors de la complexation, le facteur h est négatif. Dans notre cas, le pH étant constant lors de la complexation, on peut utiliser le modèle général suivant pour résoudre l'équilibre de complexation :



c) *Calcul de chimie quantique*

Afin de comprendre les phénomènes de complexation métallique au niveau microscopique et ainsi d'essayer d'expliquer la régio-sélectivité de la réaction, nous avons entrepris des calculs de chimie quantique. Ces calculs ont été effectués au sein de l'équipe. Les calculs ont été effectués uniquement sur des ligands représentatifs de la matière organique (molécules modèles) et qui possèdent des sites complexants identiques à ceux rencontrés dans le milieu naturel. Les composés soufrés ont été très peu ou pas du tout étudiés tant du point de vue de leur structure électronique que de leurs propriétés spectroscopiques. Il a donc semblé intéressant au niveau de l'équipe de mener, en parallèle des travaux réalisés au cours de cette thèse, une étude approfondie par chimie quantique. Une partie des résultats de cette étude sont reportés dans ce manuscrit afin d'interpréter certaines données expérimentales. De manière très synthétique, les différents calculs entrepris ont consisté à :

- Optimiser la géométrie des ligands et des complexes étudiés en vérifiant que la structure obtenue correspond bien à un minimum d'énergie. Il a été ainsi possible de voir les modifications structurales apportées d'une part par la substitution d'un atome d'oxygène par un atome de soufre et d'autre part par la fixation du métal sur le ligand.
- Calculer les spectres électroniques (absorption et fluorescence) de manière à donner une interprétation des signaux observés en termes de transitions électroniques. Les différentes orbitales moléculaires mises en jeu dans ces transitions ont été déterminées.
- Etudier de manière précise l'environnement direct du métal, c'est-à-dire la sphère de coordination (ou de solvation) mais aussi l'état de protonation du ligand dans le complexe. Dans la majorité des cas, la fixation du métal entraîne une déprotonation du ligand.

Tous les calculs DFT (Théorie de la Fonctionnelle de la Densité) ont été réalisés au moyen du logiciel Gaussian09 (Frisch et al. 2009). Différentes fonctionnelles et différentes bases ont été testées de manière à reproduire avec le plus de précision possible les données spectrales. Les tests ont été réalisés dans un premier temps sur les ligands libres avec l'objectif de décrire le plus précisément possible le spectre d'absorption électronique. Pour cela, après optimisation de la géométrie par DFT, le calcul des transitions électroniques a été réalisé en utilisant la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité Dépendante du Temps (TD-DFT). Puis, la longueur d'onde ainsi que la force d'oscillateur des transitions calculées ont été comparées aux bandes d'absorption du spectre UV-visible. Il s'est avéré que la fonctionnelle B3LYP (Vosko et al. 1980, Becke 1988, Lee et al. 1988, Becke 1993), souvent utilisée dans des travaux antérieurs de l'équipe, ainsi que la base 6-311+G(d,p) (Krishnan et al. 1980, McLean et al. 1980) ont donné des résultats satisfaisants et ont été retenues pour l'ensemble des calculs. L'effet de la solvation a été pris en compte à la fois pour le calcul des structures et des transitions électroniques, ces dernières étant très sensibles aux effets de solvant. Pour les complexes, un modèle mixte de solvation a été utilisé : d'une part des molécules explicites de solvant ont été ajoutées dans la sphère de coordination du métal et d'autre part le modèle PCM (polarizable continuum model) (Tomasi et al. 2005) reproduisant de manière implicite la sphère de solvation du système chimique a été utilisé.

Références bibliographiques :

Baker, A. and M. Curry (2004). "Fluorescence of leachates from three contrasting landfills." Water Res **38**(10): 2605-2613.

Becke, A. D. (1988). "Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior." Physical Review A **38**(6): 3098-3100.

Becke, A. D. (1993). "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange." The Journal of Chemical Physics **98**(7): 5648-5652.

Bosco, M. V., M. P. Callao and M. S. Larrechi (2006). "Simultaneous analysis of the photocatalytic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analysis." Analytica Chimica Acta **576**(2): 184-191.

BRGM (2001). "Bassin Artois-Picardie. Nappe de la craie. Carte piézométrique hautes eaux." **51149**

Bro, R. (1997). "PARAFAC. Tutorial and applications." Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems **38**(2): 149-171.

Bro, R. and H. A. L. Kiers (2003). "A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models." Journal of Chemometrics **17**(5): 274-286.

Cabaniss, S. E. (1992). "Synchronous fluorescence spectra of metal-fulvic acid complexes." Environmental Science and Technology **26**(6): 1133-1139.

Chakraborty, P. and C. L. Chakrabarti (2008). "Competition from Cu(II), Zn(II) and Cd(II) in Pb(II) binding to Suwannee River Fulvic Acid." Water, Air, and Soil Pollution **195**(1-4): 63-71.

Coble, P. G., J. Lead, A. Baker, D. M. Reynolds and R. G. M. Spencer (2014). Aquatic Organic Matter Fluorescence, Cambridge University Press.

Cory, R. M. and D. M. McKnight (2005). "Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter." Environmental Science and Technology **39**(21): 8142-8149.

Croue, J. P., M. F. Benedetti, D. Violleau and J. A. Leenheer (2003). "Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site." Environmental Science and Technology **37**(2): 328-336.

D'Andrilli, J., C. M. Foreman, A. G. Marshall and D. M. McKnight (2013). "Characterization of IHSS Pony Lake fulvic acid dissolved organic matter by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and fluorescence spectroscopy." Organic Geochemistry **65**: 19-28.

Elkins, K. M. and D. J. Nelson (2001). "Fluorescence and FT-IR spectroscopic studies of Suwannee river fulvic acid complexation with aluminum, terbium and calcium." Journal of Inorganic Biochemistry **87**(1-2): 81-96.

Fellman, J. B., E. Hood and R. G. M. Spencer (2010). "Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review." Limnology and Oceanography **55**(6): 2452-2462.

Frisch, M. J., G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. J. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox (2009). *Gaussian 09*, Revision D.01. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

Gampp, H., M. Maeder, C. J. Meyer and A. D. Zuberbühler (1985). "Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data-III. Model-free analysis of spectrophotometric and ESR titrations." *Talanta* **32**(12): 1133-1139.

Gampp, H., M. Maeder, C. J. Meyer and A. D. Zuberbühler (1986). "Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data-IV. Model-free least-squares refinement by use of evolving factor analysis." *Talanta* **33**(12): 943-951.

Gampp, H., M. Maeder and A. D. Zuberbühler (1988). "Computerized data acquisition and data reduction in spectrophotometric analysis Part 2: numerical analysis with and without an underlying chemical model." *Trends in Analytical Chemistry* **7**(4): 147-150.

Hall, G. J. and J. E. Kenny (2007). "Estuarine water classification using EEM spectroscopy and PARAFAC-SIMCA." *Analytica Chimica Acta* **581**(1): 118-124.

Henderson, R. K., A. Baker, K. R. Murphy, A. Hambly, R. M. Stuetz and S. J. Khan (2009). "Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: a review." *Water Res* **43**(4): 863-881.

Hudson, N., A. Baker and D. Reynolds (2007). "Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters—a review." *River Research and Applications* **23**(6): 631-649.

Ivanovsky, A. (2016). "Ouvrages d'assainissement des eaux et qualité du milieu récepteur en zone urbaine. Cas de rejets dans La Marque à Villeneuve d'Ascq." Université de Lille, Sciences et Technologie.

Job, P. (1928). "Formation and stability of inorganic complexes in solution." *Annali di Chimica Applicata* **9**: 113-203.

Joe-Wong, C., E. Shoenfelt, E. J. Hauser, N. Crompton and S. C. B. Myneni (2012). "Estimation of reactive thiol concentrations in dissolved organic matter and bacterial cell membranes in aquatic systems." *Environmental Science and Technology* **46**(18): 9854-9861.

Krishnan, R., J. S. Binkley, R. Seeger and J. A. Pople (1980). "Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions." *The Journal of Chemical Physics* **72**(1): 650-654.

Kuhn, K. M., E. Neubauer, T. Hofmann, F. Von Der Kammer, G. R. Aiken and P. A. Maurice (2015). "Concentrations and distributions of metals associated with dissolved organic matter from the Suwannee River (GA, USA)." *Environmental Engineering Science* **32**(1): 54-65.

Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic / Plenum Publishers.

Lamers, L. P. M., L. L. Govers, I. C. J. M. Janssen, J. J. M. Geurts, M. E. W. Van der Welle, M. M. Van Katwijk, T. Van der Heid, J. G. M. Roelofs and A. J. P. Smolders (2013). "Sulfide as a soil phytotoxin-a review." Frontiers in Plant Science **4**(JUL).

Lee, C., W. Yang and R. G. Parr (1988). "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density." Physical Review B **37**(2): 785-789.

Leenheer, J. A., G. K. Brown, P. Maccarthy and S. E. Cabaniss (1998). "Models of metal binding structures in fulvic acid from the Suwannee River, Georgia." Environmental Science and Technology **32**(16): 2410-2416.

Leenheer, J. A., J.-P. Croué, M. Benjamin, G. V. Korshin, C. J. Hwang, A. Bruchet and G. R. Aiken (2000). Comprehensive isolation of natural organic matter from water for spectral characterizations and reactivity testing, ACS Publications.

Lévesque, M. (1972). "Fluorescence and gel filtration of humic compounds." Soil Science **113**(5): 346-353.

McIntyre, A. M. and C. Gueguen (2013). "Binding interactions of algal-derived dissolved organic matter with metal ions." Chemosphere **90**(2): 620-626.

McLean, A. D. and G. S. Chandler (1980). "Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11–18." The Journal of Chemical Physics **72**(10): 5639-5648.

Murphy, K. R., A. Hambly, S. Singh, R. K. Henderson, A. Baker, R. Stuetz and S. J. Khan (2011). "Organic matter fluorescence in municipal water recycling schemes: Toward a unified PARAFAC model." Environmental Science and Technology **45**(7): 2909-2916.

Murphy, K. R., C. A. Stedmon, T. D. Waite and G. M. Ruiz (2008). "Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy." Marine Chemistry **108**(1-2): 40-58.

Ohno, T. (2002). "Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter." Environmental Science and Technology **36**(4): 742-746.

Pernet-Coudrier, B. (2008). Influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : Cas de la Seine, un milieu sous forte pression urbaine., Université de PARIS-EST.

Peuravuori, J. and K. Pihlaja (1997). "Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances." Analytica Chimica Acta **337**(2): 133-149.

Plaza, C., G. Brunetti, N. Senesi and A. Polo (2006). "Fluorescence characterization of metal ion-humic acid interactions in soils amended with composted municipal solid wastes." Analytical and Bioanalytical Chemistry **386**(7-8): 2133-2140.

Ryan, D. K. and J. H. Weber (1982). "Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid." Analytical Chemistry **54**(6): 986-990.

Stedmon, C. A. and R. Bro (2008). "Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: A tutorial." Limnology and Oceanography: Methods **6**(NOV.): 572-579.

Stedmon, C. A. and S. Markager (2005). "Resolving the variability in dissolved organic matter fluorescence in a temperate estuary and its catchment using PARAFAC analysis." Limnology and Oceanography **50**(2): 686-697.

Stedmon, C. A., S. Markager and R. Bro (2003). "Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy." Marine Chemistry **82**(3-4): 239-254.

Tomasi, J., B. Mennucci and R. Cammi (2005). "Quantum Mechanical Continuum Solvation Models." Chemical Reviews **105**(8): 2999-3094.

Valeur, B. (2001) "Molecular Fluorescence Principles And Applications " Wiley-VCH Verlag GmbH.

Vosko, S. H., L. Wilk and M. Nusair (1980). "Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis." Canadian Journal of Physics **58**(8): 1200-1211.

Weishaar, J. L., G. R. Aiken, B. A. Bergamaschi, M. S. Fram, R. Fujii and K. Mopper (2003). "Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon." Environmental Science and Technology **37**(20): 4702-4708.

Yoe, J. H. and A. L. Jones (1944). "Colorimetric determination of iron with disodium-1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate." Industrial and Engineering Chemistry **16**(2): 111-115.

Zheng, X., M. T. Khan and J. P. Croue (2014). "Contribution of effluent organic matter (EfOM) to ultrafiltration (UF) membrane fouling: isolation, characterization, and fouling effect of EfOM fractions." Water Res **65**: 414-424

Chapitre III : Caractérisation de la MOD d'eau naturelle et complexation métallique

Chapitre III : Caractérisation de la MOD d'eau naturelle et complexation métallique

I.	Evaluation de la composition de la Matière organique dissoute	68
1.	La Marque et le lac du Héron	68
a)	Résultats	68
b)	Modèle PARAFAC	71
c)	Evolution temporelle de la matière organique dissoute	74
a)	Apport des ouvrages d'assainissement à la composition de la matière organique :	75
2.	Germignies	77
a)	Evolution des paramètres caractéristiques de la MOD	77
b)	Modèle PARAFAC	78
3.	Comparaison des sites	81
II)	Etude de la complexation de cations métalliques	82
1.	Détermination la concentration des groupements thiols	82
2.	Suivi de complexation	83
3.	Modélisation PARAFAC	85
a)	Point LM3 de la Marque	85
b)	Point GE04 de Germignies	87
c)	Comparaison des modèles PARAFAC	89
4.	Modèle de Ryan et Weber	90
	Conclusion	98
	Références bibliographique :	101

Le travail présenté dans ce chapitre a deux principaux objectifs, le premier consiste en la caractérisation et le suivi spatio-temporel de la MOD de deux sites d'étude aux caractéristiques environnementales très différentes, grâce à des outils de spectroscopie électronique (spectroscopie UV-Visible et de fluorescence 3D). Le second est, toujours au moyen des mêmes outils spectroscopiques, de caractériser et quantifier les interactions entre la MOD et trois cations métalliques d'intérêt environnemental : Cu(II), Zn(II) et Pb(II).

Les deux sites de prélèvement lors de cette étude sont d'une part, une portion de la Marque au niveau de Villeneuve d'Ascq très soumise aux pressions anthropiques et d'autre part, les mares entourant le terroir de Germignies, impactées par le lessivage de celui-ci. La Marque reçoit les eaux de deux ouvrages d'assainissement, en continue ceux de la STEU de Villeneuve d'Ascq et plus ponctuellement ceux du lac du Héron. Le but est d'évaluer si la composition et l'origine de la MOD évoluent au cours du temps ainsi que d'évaluer l'impact des rejets des deux ouvrages sur la composition de la MOD la Marque. Pour le site de Germignies, l'objectif est d'évaluer la composition de la MOD et d'observer si la présence en très forte quantité de sulfates impacte les propriétés spectrales de la MOD. Dans un premier temps, la caractérisation de la MOD a été obtenue par le biais de calculs d'indices tel que la $SUVA_{254}$ ou l'indice de fluorescence. Cette caractérisation a également été réalisée en enregistrant les MEEF des différents échantillons de manière à obtenir une signature spectrale de la MOD des sites d'étude. La modélisation au moyen de PARAFAC a permis l'attribution des principaux fluorophores, ce qui a conduit à la détermination de l'origine de la MOD.

Dans une seconde partie, une station de prélèvements de chaque site a été choisie pour l'étude des interactions entre la MOD caractérisée précédemment et différents cations métalliques. La concentration en sulfates mesurée sur les deux sites étant très différente, la concentration des groupements thiols a été déterminée afin d'estimer la présence de fonctions soufrées au sein de la MOD. Puis le suivi de la complexation des différents cations métalliques par la MOD a été effectué par spectrométrie de fluorescence 3D. Enfin la modélisation à l'aide de l'outil PARAFAC a permis de calculer l'évolution des différentes composantes des échantillons de MOD. L'estimation pour chaque composante et chaque ion métallique de la constante apparente de formation K a ensuite été obtenue. Ces données permettront alors une première comparaison des propriétés complexantes des différentes composantes de chaque extrait de MOD puis une seconde comparaison sera faite entre les deux sites de prélèvement.

I. Evaluation de la composition de la Matière organique dissoute

1. La Marque et le lac du Héron

L'analyse de la MOD de la Marque s'est concentrée sur l'estimation directe ou indirecte de caractéristiques tels que la concentration en COD ou des indices spectroscopiques, dans le but d'observer l'évolution spatio-temporelle de celle-ci sur la période automne-hiver et d'estimer les apports de MO des deux ouvrages d'assainissements (la STEU et le lac du Héron). Dans ce but nous avons échantillonné une fois par mois entre septembre 2014 et février 2015, trois points dans la Marque : un point en amont des deux ouvrages (LM1), un point juste après le rejet de la STEU (LM4) et un point en aval après les deux rejets (LM3), ainsi qu'un point directement dans le lac avant les pompes de relevage (LH4). La Figure 1 schématise la localisation de ces différents points de prélèvements.

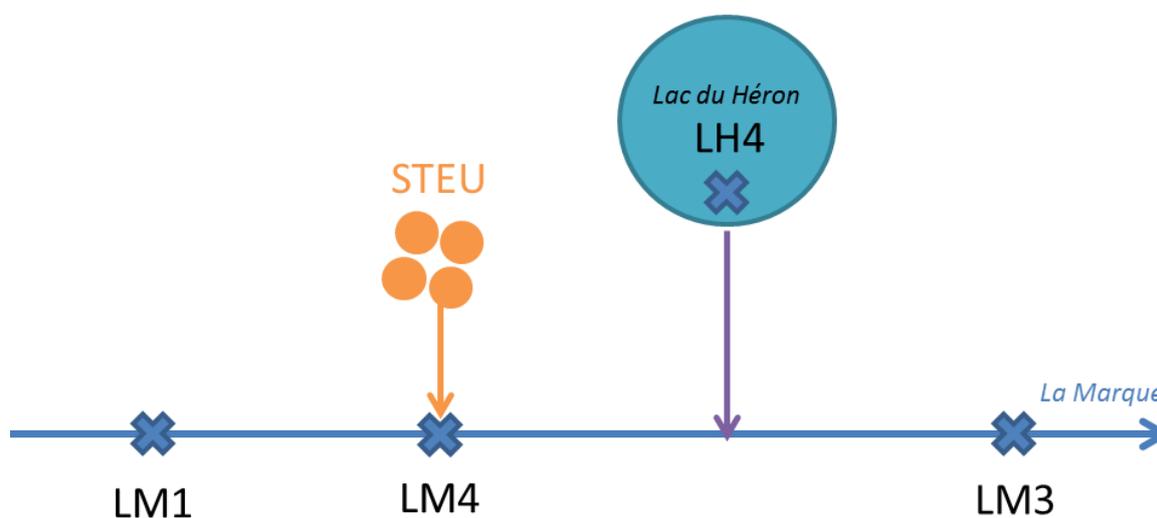


Figure 1: Schéma des points de prélèvements sur la rivière et le lac du Héron.

a) Résultats

La Figure 2 regroupe l'ensemble des résultats mensuels obtenus pour les paramètres hydrauliques, le COD, la $SUVA_{254}$ et l'indice de fluorescence pour l'ensemble des quatre points de prélèvements.

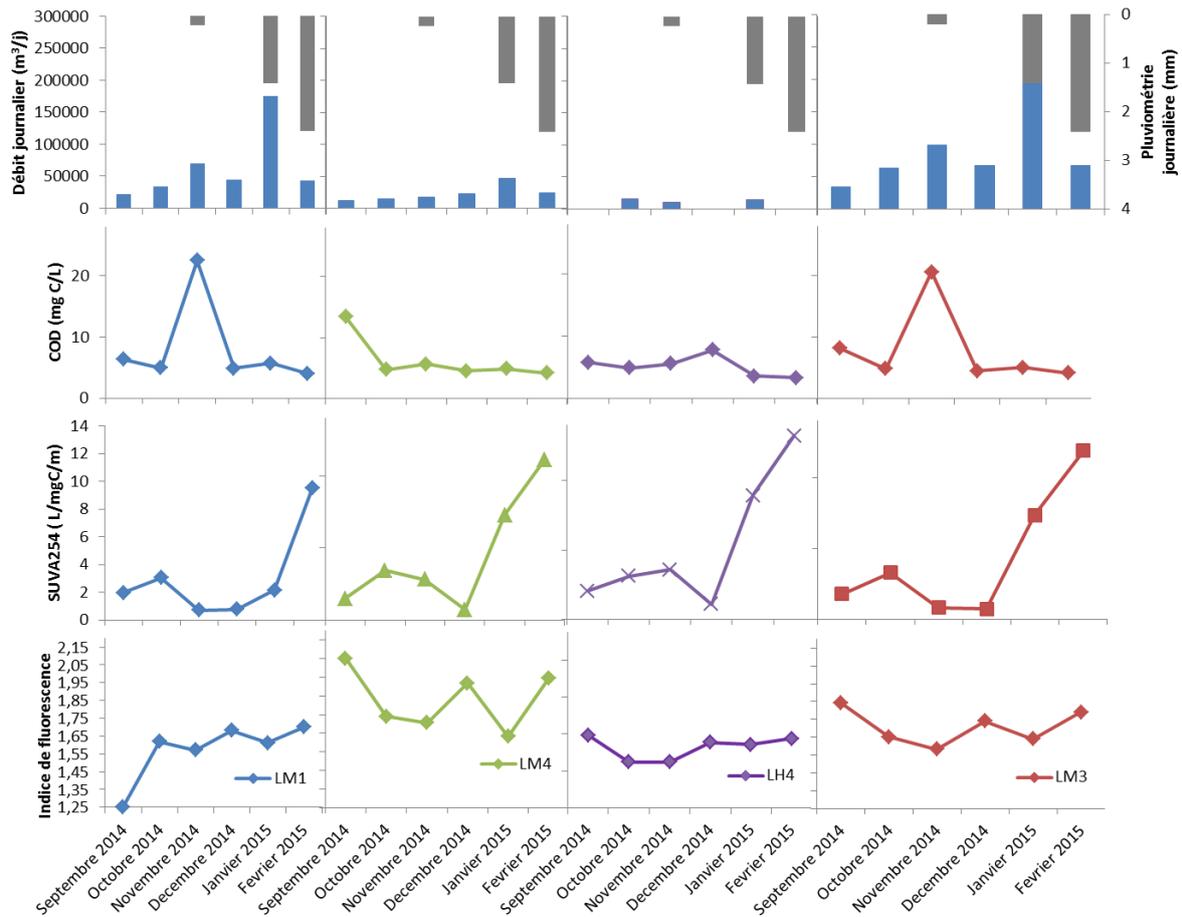


Figure 2 : Variations mensuelles du débit journalier, de la pluviométrie, du COD, de la SUVA₂₅₄ et de l'indice de fluorescence pour les 4 points de prélèvements.

- Suivi hydraulique

Les données présentées ici sont issues de la thèse d'Ivanovsky (2016). Au cours de la surveillance mensuelle dans le cadre du projet OPUR, le débit moyen de la rivière était de $0,80 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ avec un cumul annuel de 808 mm de précipitations. Concernant notre période d'étude le débit de la rivière était maximal ($1,2 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) de novembre 2014 à février 2015 et minimal ($0,3 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) en septembre. Trois des six campagnes de prélèvements ont été réalisées un jour de pluie. Comme on peut le voir sur la Figure 2, une faible pluviométrie a été enregistrée pour le prélèvement de novembre avec un cumul de 0,2 mm sur la journée. Pour les prélèvements du mois de janvier et février un plus fort épisode pluvieux a été enregistré avec respectivement 1,4 et 2,4 mm cumulés. Les données concernant la pluviométrie ont été obtenues en faisant la moyenne des relevés pluviométriques enregistrés à la STEU de Villeneuve d'Ascq et ceux de la station météorologique de la ville de Lesquin (proche de Villeneuve d'Ascq). Ces épisodes pluvieux ont une influence sur le débit de la Marque,

mais sans relation directe de proportionnalité. Ceci s'explique par le fait que le débit de la rivière est principalement influencé par les rejets ponctuels du Lac du Héron.

De plus, lors des prélèvements des mois d'octobre, novembre et janvier, une partie de l'eau du lac a été rejetée dans la Marque, impactant aussi le débit de la rivière.

- Carbone Organique dissout (COD)

Ce paramètre est relativement constant sur l'ensemble de la durée de l'étude avec une valeur de base de $5,59 \text{ mg C.L}^{-1}$ pour les points de prélèvements de la Marque. On peut noter quelques exceptions notamment en ce qui concerne les points LM1 et LM3 au mois de novembre où la valeur du COD dépasse 20 mg C.L^{-1} , ainsi que pour le point LM4 pour le mois de septembre avec une valeur $13,4 \text{ mg C.L}^{-1}$. D'une manière générale le point LM4 a une moyenne plus faible que le reste des points de la rivière avec $6,24 \text{ mg C.L}^{-1}$. Ceci peut s'expliquer par les apports de la STEU de Villeneuve d'Ascq, qui peuvent entraîner un léger effet de dilution ponctuel. Pour les prélèvements du lac du Héron la concentration en COD varie entre $3,31$ et $7,79 \text{ mg C.L}^{-1}$ et a une valeur moyenne de $5,15 \text{ mg C.L}^{-1}$, valeur proche de celle de la Marque.

- La $SUVA_{254}$

Ce paramètre suit sensiblement la même évolution pour l'ensemble des points de prélèvement de l'étude : une diminution entre le mois d'octobre et de décembre puis une forte augmentation pour les mois de janvier et février. Il varie entre $0,71$ et $13,19 \text{ L.mgC}^{-1}.\text{m}^{-1}$. Ces fluctuations montrent une évolution de la nature, de l'origine et donc de la composition de la MOD. Des études antérieures réalisées sur des eaux de surfaces (Barber et al. 2001, Mash et al. 2004) ont montré que les valeurs de la $SUVA_{254}$, étaient plus faibles ($< 3 \text{ L.mgC}^{-1}.\text{m}^{-1}$) pour une MOD autochtone, que pour des eaux où les apports de MOD ont plutôt tendance à être terrestres. On le vérifie de nouveau ici, où l'on observe une nette augmentation de la $SUVA_{254}$ lors des mois de Janvier et Février (passage de $0,71$ à $11,89$ entre décembre et février pour le point LM3), où les prélèvements ont été effectués un jour de pluie, ce qui laisse penser à un apport de MO terrestre dû au lessivage des sols.

- L'indice de fluorescence

L'indice de fluorescence est compris entre $1,25$ et $2,05$ avec une valeur moyenne de $1,67$ pour l'ensemble des points de l'étude. Cette valeur moyenne nous indique une MOD d'origine mixte, à la fois autochtone et allochtone. Il évolue de la même manière sur les six mois de l'étude, exception faite pour le mois de septembre où pour le point LM1 on enregistre sa plus faible valeur alors que pour les trois autres points on observe une des valeurs maximales. Au vu de l'évolution similaire des

4 courbes, on peut imaginer que ce premier point obtenu sur le site LM1 est un point aberrant. On peut également noter que des valeurs supérieures à 1,8 sont obtenues pour le point LM4, ce qui indique une MO d'origine allochtone. Cette MO allochtone présente uniquement au point LM4 provient certainement des rejets de la STEU. Finalement, l'indice de fluorescence a des valeurs plus faibles en sortie du lac du Héron par rapport à la Marque car ce bassin d'orage est un fort lieu de production primaire en raison des apports significatifs de sels nutritifs (Ivanovsky, 2016). Les apports allochtones proviennent majoritairement du lessivage des sols du bassin versant du lac souvent imperméabilisés, ainsi que d'effluents urbains mal ou pas traités qui se déversent dans le chenal d'entrée.

b) Modèle PARAFAC

Un total de 53 MEEF a été utilisé pour obtenir un modèle à partir de PARAFAC, 24 MEEF obtenus à partir des échantillons prélevés mensuellement (correspondant aux 4 points de prélèvement précédents sur une durée de 6 mois) et 29 MEEF supplémentaires provenant d'échantillons prélevés dans la Marque et le lac du Héron dans le cadre d'une étude sur la variation journalière de la MOD (données non présentées ici). Une analyse exploratoire utilisant des contraintes non négatives a été effectuée pour identifier les outliers. Trois échantillons identifiés comme outliers ont été retirés de l'ensemble des données dû à des erreurs de mesures ou des artefacts, ce qui se traduit par des différences spectrales notables avec les autres échantillons. Parmi ces outliers le point LM1 de la campagne du mois de septembre 2014 a dû être retiré et les composantes de cet échantillon n'ont pu être déterminées (ce qui confirme le point aberrant observé dans la mesure de l'indice de fluorescence). Un modèle à quatre composantes a été vérifié par la méthode de split half-validation. Les massifs de fluorescence ainsi que les spectres d'excitation et d'émission validés des quatre composantes sont présentés sur la Figure 3 et numérotés respectivement C₁, C₂, C₃ et C₄.

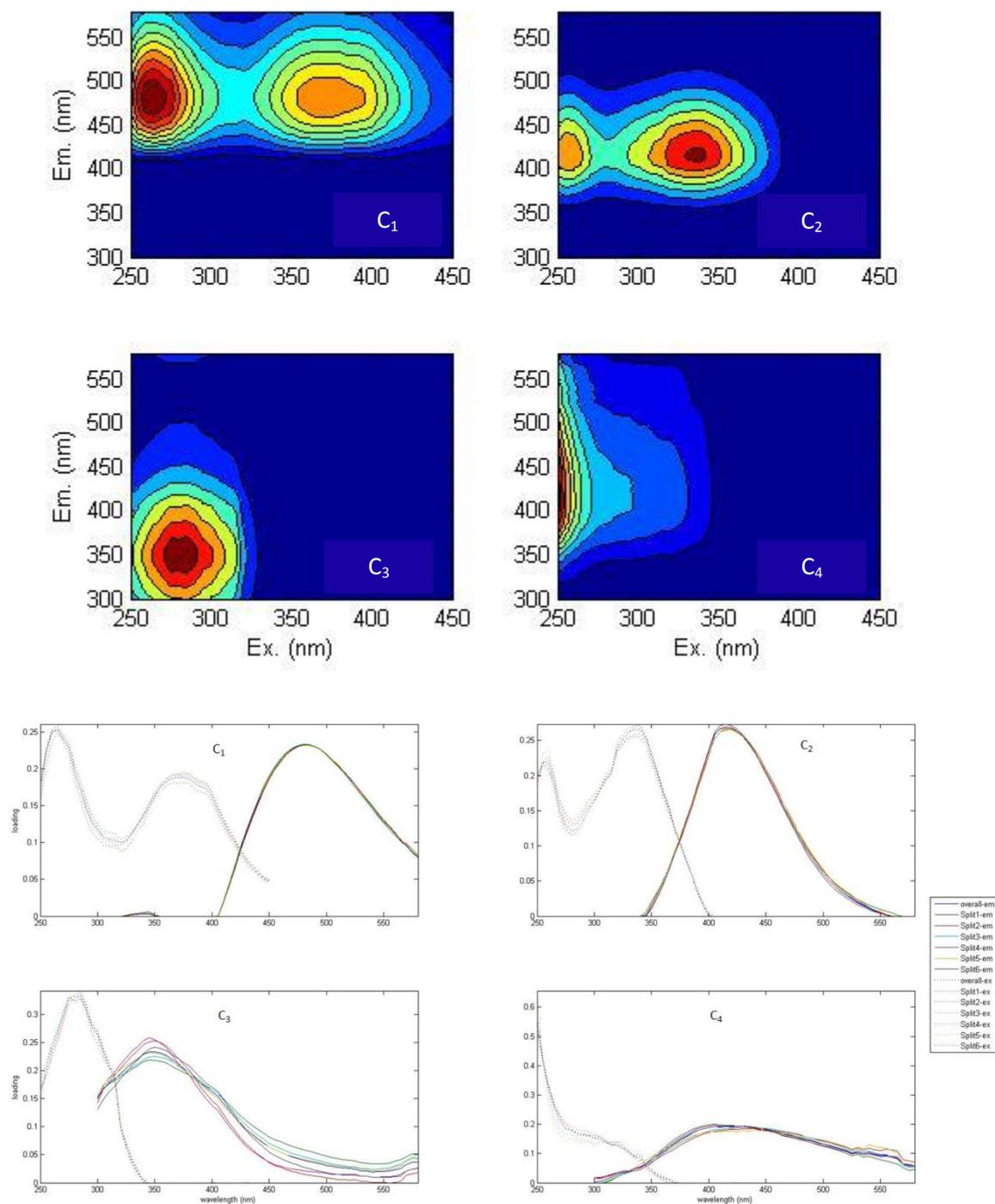


Figure 3 : Représentation des MEEF des quatre composantes et des spectres d'excitation et d'émission identifiés au moyen de PARAFAC, dans le cadre de l'étude de la MOD issue de la Marque et du lac du Héron.

Les spectres d'excitation et d'émission obtenus grâce à la modélisation PARAFAC ont été comparés aux spectres de fluorescence de la base de données Open Access Openfluor (www.openfluor.org) (Murphy et al. 2014) afin de permettre une meilleure identification des composantes PARAFAC.

Cette comparaison a révélé que les composantes C₁, C₂ et C₄ correspondent à du matériel dérivé des substances humiques identifiées précédemment dans une variété d'environnements aquatiques (Leenheer et al. 2003, Foden et al. 2008, Garcia et al. 2015). C₁ et C₂ présentent deux bandes d'absorption très distinctes, en effet deux maxima d'intensité d'excitation sont observés. C₁ présente un premier massif centré à 265 nm en excitation et un second à 375 nm pour une longueur d'onde d'émission à 480 nm. Cette composante présente des maxima d'intensité dans des grandes longueurs d'onde. De même, le maximum d'émission de C₁ a une longueur d'onde élevée, ce qui suggère qu'elle comporte des molécules fluorescentes dont la délocalisation électronique ou conjugaison est plus importante que celles des autres composantes (Sharma et al. 1999). Un maximum d'intensité d'excitation observé dans les grandes longueurs d'onde suggère que les fluorophores responsables de cette fluorescence sont plus aromatiques ou contiennent plusieurs groupes fonctionnels (Coble et al. 1998). Cette composante suggère donc la présence d'acides fulviques. C₂ a un premier maximum d'intensité d'excitation à 255 nm et un second à 335 nm, avec un maximum d'intensité d'émission à 415 nm. Cette composante est généralement associée à de la MOD d'origine terrestre à relativement haut poids moléculaire (Kamjunke et al. 2017). C₄ montre un seul massif d'excitation de fluorescence et est caractérisé par le couple de longueur d'onde excitation/émission 250/420 nm. Dans les milieux aquatiques terrestres, cette composante est produite lors de la dégradation microbienne de la matière organique et est souvent définie comme un fluorophore humique d'origine microbienne (Cory et al. 2005, Yamashita et al. 2013). La composante C₃ présente elle aussi un unique massif d'excitation de fluorescence et le couple de longueur d'onde excitation/émission caractéristique est observé à 280/350 nm. Cette composante a été de nombreuses fois identifiée (Stedmon et al. 2003, Walker et al. 2009) comme étant similaire à la plage de longueur d'onde d'excitation et d'émission des acides aminés liés aux protéines ou à des protéines seules et peut donc être considérée comme un mélange de tyrosines et de tryptophanes. Des études antérieures ont associé cette composante à une activité microbienne, indiquant un fluorophore d'origine autochtone (Coble 1996, Stedmon et al. 2005, Murphy et al. 2006). Le Tableau 1 récapitule les principales caractéristiques de ces quatre fluorophores.

Composante	λ_{max} émission (nm)	λ_{max} excitation (nm)	Pics	Affectation des sources et des fonctions potentielles
C ₁	480	265 (375)	C (α)	Type Humique, à haut poids moléculaire et très aromatique
C ₂	415	255 (335)	A (α')	Type Humique d'origine terrestre et a haut poids moléculaire
C ₃	350	280	B+T (γ)	Type protéine, mélange probable de tyrosines et tryptophanes
C ₄	420	250	M (β)	Type Humique d'origine microbienne

Tableau 1 : Longueurs d'onde d'émission et d'excitation maximales ainsi que affectation des sources potentielles et des fonctions des composantes trouvés par l'analyse avec PARAFAC selon la littérature. Maxima primaires donnés sans parenthèses, maxima secondaires entre parenthèses.

c) Evolution temporelle de la matière organique dissoute

L'allure des courbes de la Figure 4, représentant l'intensité maximale de fluorescence (F_{max}) des quatre composantes PARAFAC en fonction de la date de prélèvement, est globalement identique pour les quatre stations de prélèvement.

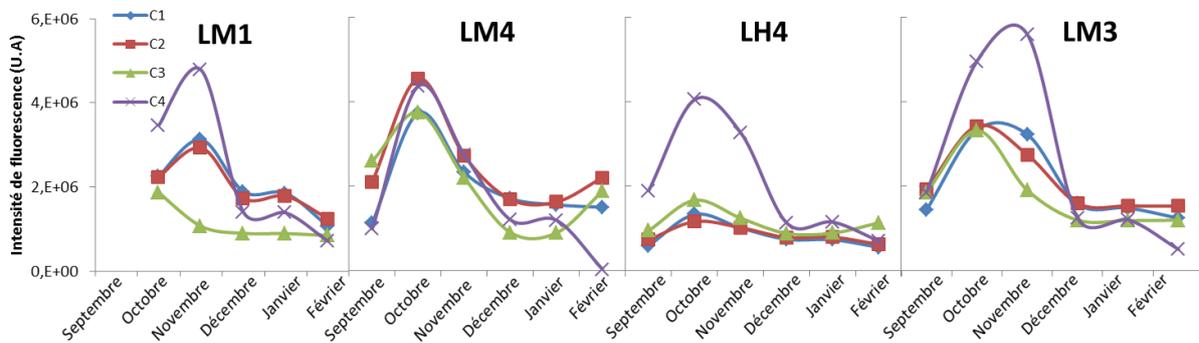


Figure 4 : Variation de l'intensité de fluorescence maximum (F_{max}) des composantes C₁, C₂ C₃ et C₄.

D'une manière générale on remarque que le F_{max} des quatre composantes est plus important pour les mois d'octobre et novembre et est du même ordre de grandeur pour les mois de décembre à février. L'intensité de chaque composante étant proportionnelle à la concentration de celle-ci en solution, ces variations indiquent donc une évolution temporelle de la composition de la MOD.

De plus, la composition de la MOD dépend aussi de la station de prélèvement. La station LH4 du lac du Héron présente une composition de sa MOD globalement homogène dans le temps, puisque les intensités des composés C_1 , C_2 et C_3 ne varient que légèrement, C_4 subit de plus grande variation. Pour la Marque, une tendance se dégage avec une concentration plus élevée des quatre composantes pour les mois d'octobre et novembre. Pour les points LM1 et LM3, on retrouve comme pour le lac, une importante évolution de la concentration de C_4 . La distribution des composantes pour le point LM4 est plus hétérogène, par exemple le mois de septembre est marqué par une forte proportion de C_3 , comparé au point LM1, et le mois de février est quant à lui marqué par l'absence de C_4 . Ceci peut s'expliquer une nouvelle fois par les apports de la STEU qui viennent se mélanger à la MO de la rivière et impactant ainsi sa composition.

L'ensemble des paramètres et indices ainsi que la distribution des différentes composantes PARAFAC permettent de conclure que la composition de la MOD n'est pas homogène dans le temps. La période d'étude peut être divisée en deux parties pour les points de prélèvement de la Marque. Une première partie correspondant la période octobre – novembre, durant laquelle le fluorophore C_4 associé à de la MO issu de l'activité biologique et microbienne est très présent au point LM1 et LM3. La dégradation du matériel végétal ainsi que des températures clémentes favorisent ces processus. Puis vient la deuxième partie, la période de décembre à février, où la MO autochtone laisse plus de place à de la MO d'origine allochtone, ceci est dû à une baisse des températures qui ralentit l'activité microbienne et aux évènements pluvieux qui apportent de la MO d'origine terrestre (C_2) et plus humifiée (C_1).

a) Apport des ouvrages d'assainissement à la composition de la matière organique :

Comme montré dans le Tableau 2, au point LM4, plusieurs paramètres semblent être affectés par les rejets de la STEU. Par rapport au point LM1 (séparé de LM4 situé en amont de 1,4 km), le COD varie, l'IF est plus élevé indiquant un apport de MO allochtone qui pourrait provenir de la MO contenue dans les rejets de la STEU. Cette hypothèse est confirmée par l'augmentation de F_{\max} de C_3 , C_3 étant un fluorophore caractéristique des eaux usées (Baker et al. 2004).

Intéressons-nous maintenant à la différence de composition entre les points amont (LM1) et aval (LM3) pour évaluer l'impact des rejets de la STEU et du lac du Héron sur la nature et la composition de la MOD de la Marque. Pour rappel, la STEU rejette en continu dans la Marque à des débits variables (dépendant de la consommation d'eau de la population et des précipitations) tandis que le lac présente des rejets ponctuels (liés à la régulation de son niveau d'eau par temps de pluie à l'aide

de pompes placées en sortie). Le fonctionnement de ces pompes a d'ailleurs eu lieu au cours des prélèvements des mois d'octobre, novembre et janvier.

Δ LM3-LM1	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février
Rejet du lac	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Non
COD	1,83	0	-1,99	-0,38	-0,61	0
Suva 254	-0,20	0,25	0	0	5,20	2,38
Indice Fluo	0,59	0	0	0	0	0
F_{max} C₁ (10⁶)	/	10,74	1,00	-3,05	-3,65	1,76
F_{max} C₂ (10⁶)	/	11,97	-1,86	-1,40	-2,50	2,83
F_{max} C₃ (10⁶)	/	14,59	8,41	2,97	2,91	3,48
F_{max} C₄ (10⁶)	/	14,95	8,30	-1,61	-1,82	-2,09

Tableau 2 : Valeur de la différence des paramètres COD, SUVA₂₅₄, IF et des F_{max} des composantes PARAFAC entre les points LM3 et LM1.

D'une manière générale tous les paramètres évoluent entre l'amont et l'aval de la rivière. Le mois de septembre est marqué par une forte augmentation de la concentration en COD. Ceci peut s'expliquer par les rejets de la STEU, en effet lors de ce prélèvement la STEU a rencontré un disfonctionnement (Ivanovsky 2016). De plus, on peut remarquer une diminution de la concentration en COD lors des mois d'octobre à janvier. Cette diminution peut s'expliquer par les apports du lac du Héron qui rejetait lors de trois prélèvements sur quatre. La concentration en COD du lac du Héron étant plus faible que celle de la rivière un effet de dilution est ainsi observé. Le second paramètre à être affecté entre l'amont et l'aval est la SUVA₂₅₄, avec une forte variation observée pour les mois de janvier et février. Le lac du Héron ne se rejetant pas dans la Marque lors du prélèvement du mois de février, les rejets ne peuvent donc pas être la cause de cette augmentation. Une autre raison probable de cette augmentation est la différence d'environnement et de topologie des deux stations de prélèvement. En effet, des événements pluvieux ont été relevés lors des prélèvements des mois de janvier et février provoquant ainsi un lessivage des sols et un apport de matière organique (qui se traduit par une augmentation de la SUVA₂₅₄). La station aval apparaît donc plus marquée par le lessivage des sols que la station amont, sans liens avec les rejets des ouvrages d'assainissement. L'indice de fluorescence n'est pas affecté par les différents apports entre l'amont et l'aval de la zone d'étude, indiquant de nouveau la présence d'une MOD d'origine mixte. L'intensité et donc la proportion des différentes composantes PARAFAC évoluent au fil de la rivière, avec une forte augmentation de la composante C₃ pour toute la durée de l'étude. Cette augmentation est certainement due aux apports de la STEU, et dans une moindre mesure du lac du Héron, C₃ étant une composante caractéristique des eaux usées.

2. Germignies

Trois campagnes de prélèvements ont été menées pour cette étude, une première en mars 2016 sur l'ensemble des mares et marais qui entourent le terail de Germignies (de GE01 à GE15) puis une seconde en juillet 2016 sur un nombre plus réduit de points (Points GE01 à GE05 et GE09 à GE15), et enfin une dernière campagne a été réalisée seulement sur les points GE01 à GE04, en février 2017. Pour faciliter la comparaison, nous présenterons ici uniquement les résultats obtenus pour les quatre points de GE01 à GE04.

a) Evolution des paramètres caractéristiques de la MOD

De la même manière que pour l'étude de la MOD du lac du Héron et de la Marque, le COD, les spectres d'absorption ainsi que les MEEF et les indices qui en découlent ont été mesurés et calculés pour les différents points de Germignies. La Figure 5 représente ces différentes valeurs.

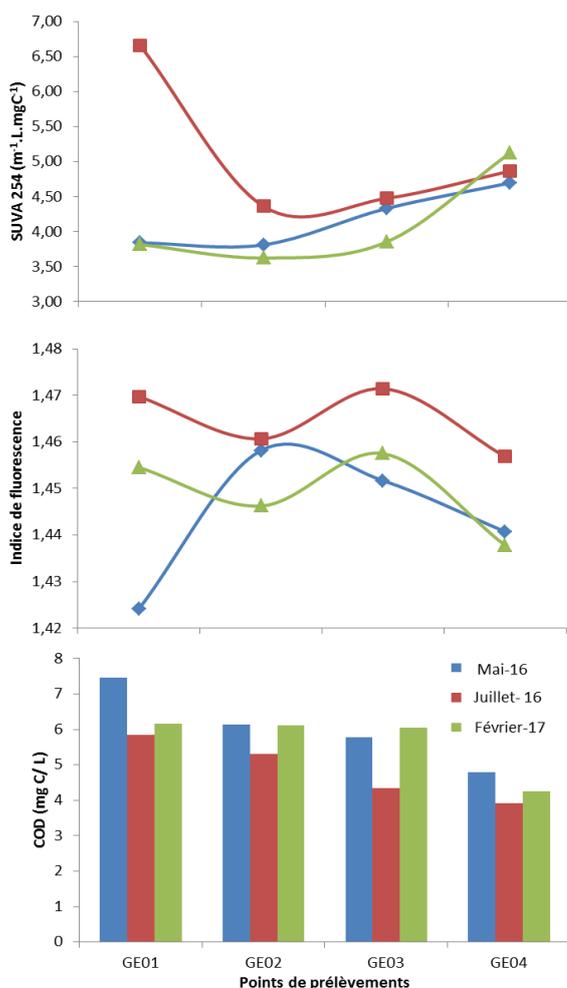


Figure 5 : Récapitulatif de la valeur de la SUVA₂₅₄ (L.mgC⁻¹.m⁻¹) du COD (mg C.L⁻¹) et de l'IF pour les quatre points de prélèvements pour les mois de mai 2016, juillet 2016 et février 2017.

La concentration en COD de ces quatre mares varie entre 3,92 et 7,46 mg C.L⁻¹, avec les valeurs les plus élevées pour la mare GE01 et les moins élevées pour la mare GE04. On observe les mêmes tendances pour les quatre points de prélèvements, les concentrations les plus élevées en mai et en février et les plus faibles en juillet. La SUVA₂₅₄ varie quant à elle entre 3,62 et 6,66 L.mg C⁻¹.m⁻¹, indiquant une MO riche en molécules aromatiques. L'indice de fluorescence reste stable (1,45 en moyenne) pour l'ensemble des points et de la période d'étude, indiquant une MO d'origine mixte qui présente très peu de fluctuations temporelles. En effet, ces marais sont sujets à des dépôts de matière organique particulaire importants et ont d'ailleurs été exploitées en tant que tourbières. En parallèle, ces forts apports de matière organiques partiellement biodégradables couplés à de faibles profondeurs d'eau favorisent une activité bactérienne et algale importante.

b) Modèle PARAFAC

Pour cette étude, un total de 27 MEEF a été utilisé pour obtenir un modèle à l'aide de PARAFAC : tous les échantillons sont issus des mares entourant le terrier de Germignies. Une analyse exploratoire utilisant des contraintes non négatives a été effectuée pour identifier les outliers. Comme pour l'étude précédente, les points GE04 et GE09 de la campagne de prélèvement du mois de juillet ont été retirés de l'ensemble des données car ils présentent des différences trop marquées par rapport aux autres échantillons. Pour ce modèle, trois composantes ont été identifiées et vérifiées par split half-validation. Les massifs de fluorescence ainsi que les spectres d'excitation et d'émission validés des trois composantes sont présentés sur la Figure 6.

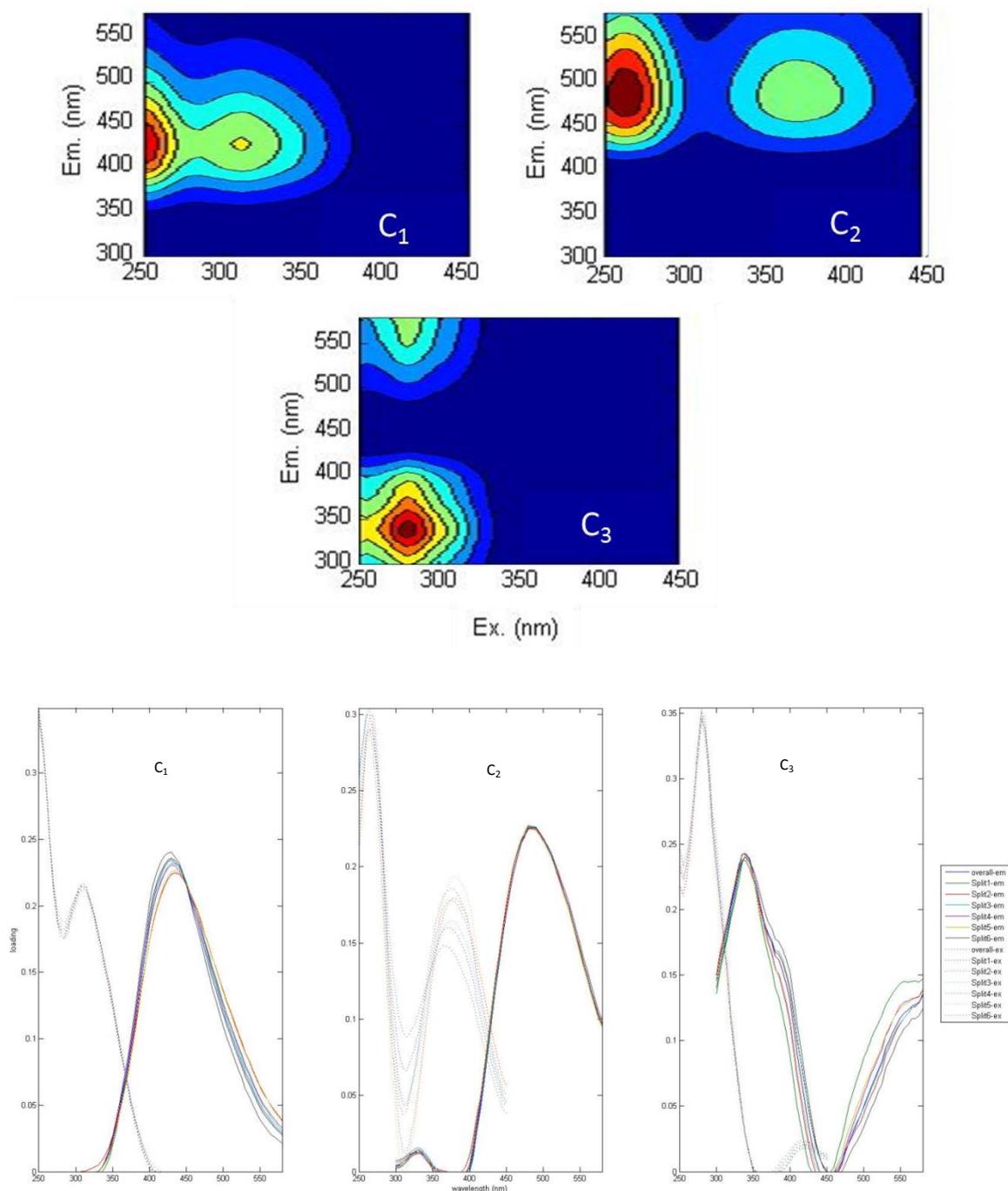


Figure 6 : Représentation des MEEF des trois composantes et des spectres d'excitation et d'émission identifiés par PARAFAC dans le cadre de l'étude de la MOD issus de Germignies.

De la même manière que pour l'étude faite pour la Marque et le lac du Héron, les spectres d'émission et d'excitation obtenus pour les trois composantes ont été comparés à la base de données OPENFLUOR. La position des massifs ainsi que leurs correspondances avec la littérature sont regroupées dans le Tableau 3.

Composante	λ_{\max} émission (nm)	λ_{\max} excitation (nm)	Pics	Affectation des sources et des fonctions potentielles	Références OPENFLUOR
C ₁	430	250 (310)	M (β)	Type humique, de haut poids moléculaire, associé à une activité biologique	C ₁ ¹ C ₄ ² (22 correspondances)
C ₂	480	260 (370)	A (α')	Type humique, de haut poids moléculaire, fortement aromatique très répandu	C ₂ ¹ (14 correspondances)
C ₃	340	<250 (280)	T (γ)	Type protéinique et tryptophane	C ₅ ³ (4 correspondances)

Tableau 3: Longueurs d'onde d'émission et d'excitation maximales ainsi que l'affectation des sources potentielles et des fonctions des composantes trouvées par l'analyse avec PARAFAC selon la littérature. Maxima primaires donnés sans parenthèses, maxima secondaires entre parenthèses. ¹(Amaral et al. 2016) ²(Graeber et al. 2012)³(Walker et al. 2013).

Deux des composantes (C₁ et C₂) sont du type substance humique à haut poids moléculaire et une composante est du type protéinique. La Figure 7 représente la contribution relative de chaque composante à la fluorescence totale de chaque échantillon. Cette contribution relative est calculée en divisant l'intensité F_{\max} d'une composante par la somme des F_{\max} de l'ensemble des composantes, puis multipliée par 100. Cette représentation permet une comparaison spatiotemporelle rapide de la proportion de chaque composante.

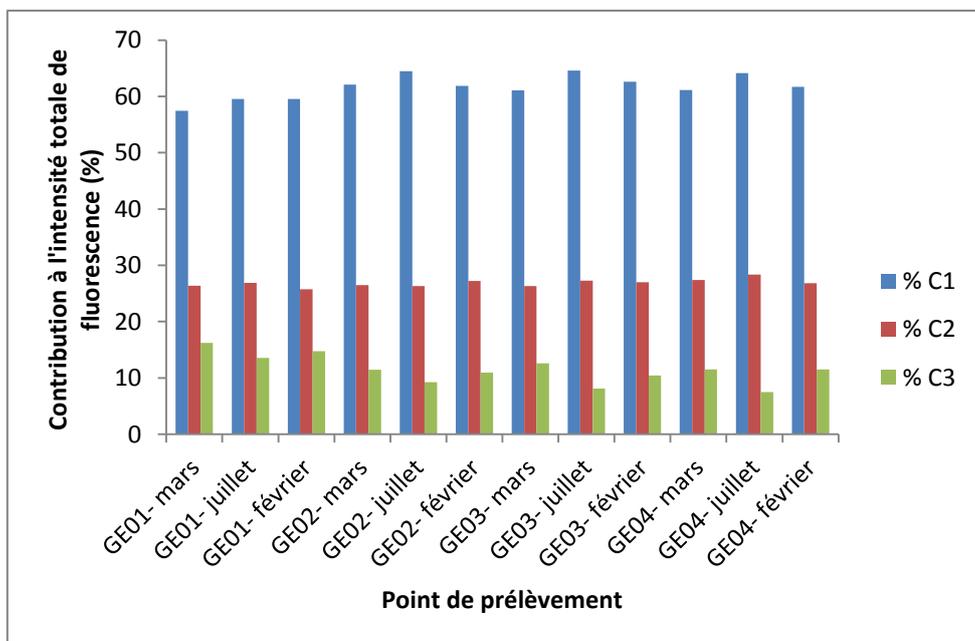


Figure 7 : Contribution des trois composantes à l'intensité totale de fluorescence pour l'ensemble des échantillons de l'étude.

On observe une distribution homogène des différentes composantes PARAFAC dans le temps, ce qui indique une origine constante et aucun changement dans les apports de MOD. Par rapport au site d'étude, cette conclusion semble pertinente car le système ne reçoit pas d'effluents riches en matière organique et issues d'activités anthropiques comme dans le cas de la Marque. Les mares de Germignies sont alimentées par la nappe de surface lorsqu'elle est affleurante, ainsi que par le lessivage du terril par temps de pluie dont la nature des matériaux est très minérale.

3. Comparaison des sites

Si nous comparons maintenant la composition des MOD issues des deux sites d'étude, nous pouvons faire comme premier constat que la MOD issue de la Marque est plus diversifiée puisque quatre composantes PARAFAC ont été modélisées alors que seules trois ont été obtenues pour la MOD de Germignies. Néanmoins ces deux MOD ont deux composantes en commun, la composante C_1 de LM3 est identique à la composante C_2 de Germignies et de même la composante C_3 est identique pour les deux sites. De plus, il apparaît que la MOD issue de la Marque subit des variations saisonnières et est impactée par les rejets des ouvrages d'assainissement, alors que la MOD de Germignies n'évolue quasiment pas dans le temps. Toutefois, la comparaison reste délicate car l'étude de ces deux MOD a été faite sur des périodes et des échelles de temps différentes.

Ce travail, réalisé pour la première fois au LASIR, constitue une première approche de caractérisation de la matière organique naturelle dans le bassin Artois-Picardie. L'agence de l'Eau s'intéresse d'ailleurs à ce genre d'études pour mieux comprendre l'origine de la matière organique dans ses masses d'eau, et ainsi entreprendre des actions en toute connaissance de cause. Réduire les apports en matière organique biodégradable dans les systèmes aquatiques lenticques est en effet un préalable pour lutter efficacement contre l'eutrophisation des masses d'eau et atteindre au final le bon état écologique dans les délais fixés par la DCE.

II) Etude de la complexation de cations métalliques

Afin d'étudier la complexation de certains cations métalliques par la MOD, il a été nécessaire de faire un choix judicieux des échantillons étudiés. En effet, le nombre d'échantillons est beaucoup trop conséquent pour imaginer étudier la complexation des cations métalliques pour chaque point de prélèvement et pour chaque période. Une seule station de prélèvement par site d'étude a été choisie pour étudier la complexation de divers cations métalliques par la matière organique dissoute. Pour le site d'étude de la Marque, c'est la station LM3 qui a été choisie puisque la MOD est composée de la MOD en amont et des deux ouvrages d'assainissement. Pour le site de Germignies c'est la station GE04 qui a été choisie car c'est l'une des stations les plus riches en sulfates ($2,1 \text{ g.L}^{-1}$ en juillet 2016) et en sulfures totaux (9 mg.L^{-1} en Juillet 2016). Des prélèvements d'eau spécifiques aux expérimentations de complexation par des cations métalliques ont été réalisés en Février 2017. Après prélèvement (protocole de prélèvement détaillé au chapitre II), les expériences de complexation ont été réalisées en moins de sept jours afin de limiter la dégradation de la MOD.

1. Détermination la concentration des groupements thiols

Pour les deux stations de prélèvement choisies pour l'étude de la complexation, la détermination de la concentration en groupements thiols a été réalisée. Comme attendu pour le cas de l'échantillon de la Marque, la concentration en fonctions thiols est trop faible pour être quantifiée par la méthode employée (voir détail du protocole chapitre II). Lors du dosage avec le réactif qBBr aucun changement de pente n'est observé comme on peut le voir sur la Figure 8a. En revanche une quantité non négligeable de groupements thiols a pu être déterminée pour l'échantillon GE04 de Germignies. On peut voir sur la Figure 8b, une rupture de pente au cours de l'ajout du réactif. L'intersection des deux droites de ce dosage permet de déduire que l'échantillon au point GE04 contient $0,77 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de groupements thiols, soit $0,154 \text{ } \mu\text{mol}$ pour un milligramme de COD. Ce qui représente environ cinq fois plus de thiols que dans un échantillon classique de MOD (Xia et al. 1998). Cette présence de groupements thiols (et probablement également de disulfures et autres espèces soufrées organiques réduites ou partiellement réduites) n'est pas surprenante dans les mares jouxtant le terril de Germignies : les fortes concentrations en sulfate (issues de l'oxydation de la pyrite présente dans les minéraux du terril) et les teneurs élevées en matière organique biodégradable favorisent l'activité des bactéries sulfato-réductrices mais également les bactéries thio-oxydantes, ces dernières étant actives dans les milieux où se côtoient les sulfures et le dioxygène, comme c'est le cas ici (Heitmann et al. 2006, Lamers et al. 2013, Yu et al. 2015).

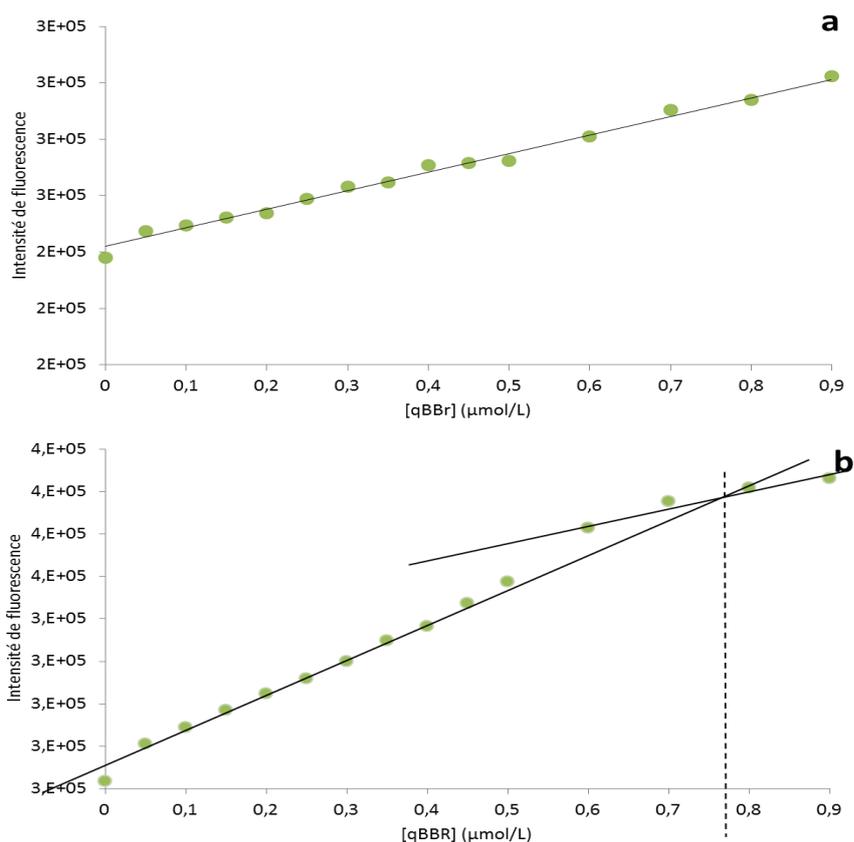


Figure 8 : Détermination de la concentration en groupements thiols pour les échantillons (a) LM3 et (b) GE04 contenant 5 mg C.L⁻¹.

2. Suivi de complexation

La complexation des cations métalliques Cu(II), Pb(II) et Zn(II) par la MOD des points LM3 et GE04 a été suivie par spectroscopie de fluorescence. La titration des différents échantillons a été réalisée par additions successives d'une solution de sel métallique à 100 mL de solution de MOD à 5 mg C.L⁻¹. La gamme de concentration du cation métallique s'étend de 0,1 à 150 μM. Le pH a été maintenu constant à une valeur de 6,8 tout au long de la titration par micro ajout de NaOH ou HCl. Après chaque ajout de métal, ajustement du pH et après 30 min de stabilisation (des tests cinétiques ont été réalisés au préalable), une MEEF a été enregistrée. La Figure 9 montre un exemple de MEEF, dans le cas de la complexation de Cu(II), par la MOD des point LM3 et GE04 avec les MEEF sans solution de Cu(II) et après ajout d'une solution de Cu(II) à 10, 80 et 150 μmol.L⁻¹. On observe bien un quenching de fluorescence sur les MEEF (de c à h) et sur l'ensemble des massifs de fluorescence. Il faut toutefois noter que l'intensité de la composante 3 est trop faible, par rapport aux autres composantes, pour être visualisée sur les MEEF.

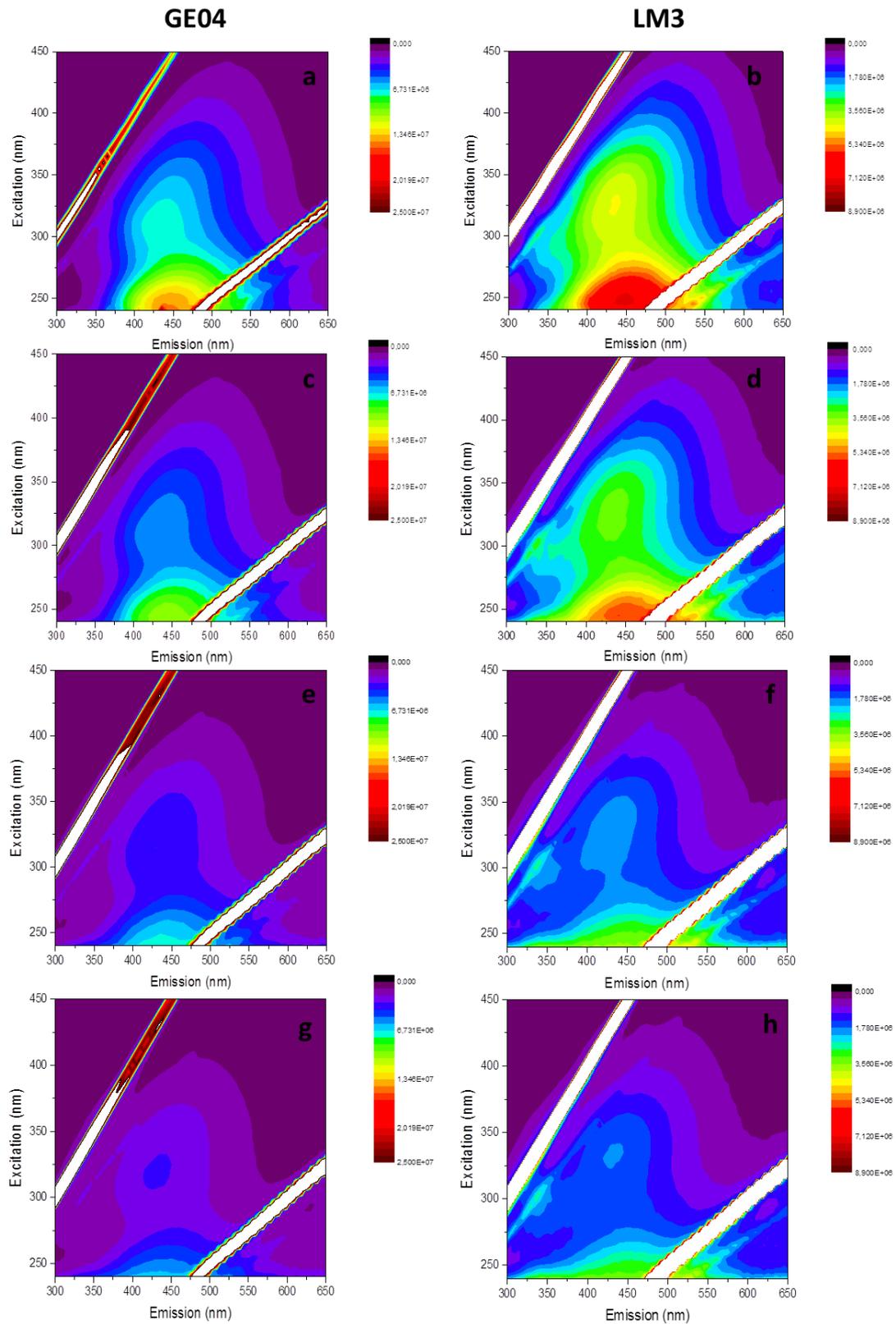


Figure 9 : MEEF de la MOD du point GE04 (a) et LM3 (b) avant ajout de la solution de cuivre et MEEF après ajout d'une solution de cuivre à 10 (c et d), 80 (e et f) et 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (g et h) pour la MOD de GE04 et LM3 respectivement.

3. Modélisation PARAFAC

Dans l'étude précédente concernant la MOD le modèle PARAFAC a été obtenu en utilisant l'ensemble des points de prélèvement sur chacun des deux sites étudiés. Cela a eu pour conséquence l'obtention d'un signal de fluorescence « moyen » relatif à chaque site. Comme l'étude de la complexation des cations métalliques n'a été réalisée que sur un point de prélèvement, il nous a semblé plus judicieux de calculer un nouveau modèle PARAFAC caractéristique de ce point particulier du site étudié. Lors de la titration métallique, après chaque ajout métallique une MEEF est enregistrée et l'ensemble de ces MEEF est utilisée pour la réalisation du modèle PARAFAC. Par conséquent, les nouveaux modèles obtenus pour cette étude sont susceptibles d'être différents de ceux calculés précédemment.

a) Point LM3 de la Marque

La modélisation PARAFAC des titrations pour LM3 (64 MEEF), donne un modèle à trois composantes, dont les massifs et spectres d'émission et d'excitation sont représentés sur la Figure 10 et les principales caractéristiques sont regroupées dans le Tableau 4. Cet échantillon LM3 a trois composantes, deux du type humique et une du type protéinique.

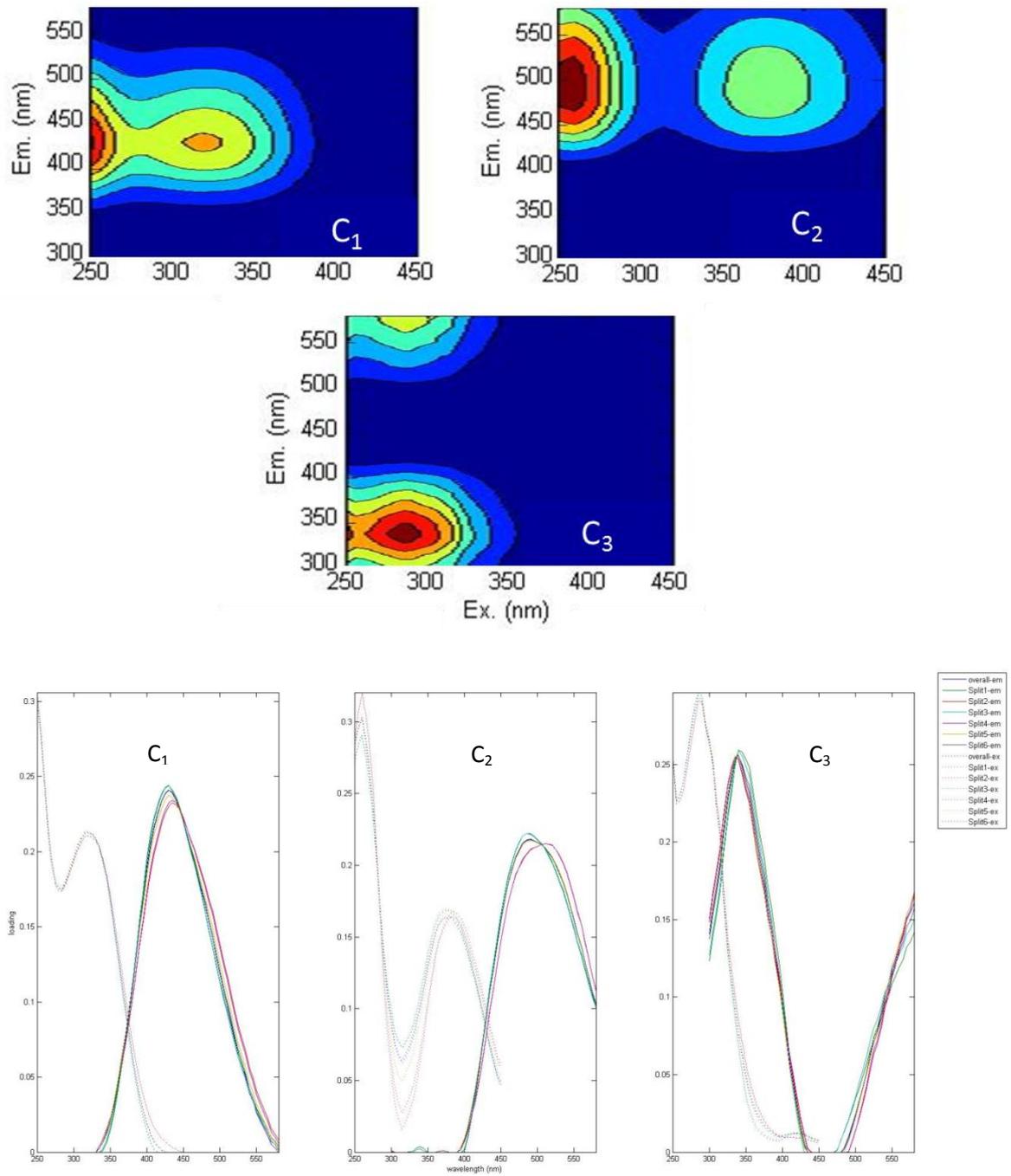


Figure 10 : Représentation des trois composantes et des spectres d'excitation et d'émission identifiés par PARAFAC dans le cadre du suivi de complexation de la MOD du point LM3.

Composante	λ_{\max} émission (nm)	λ_{\max} excitation (nm)	Pics	Affectation des sources et des fonctions potentielles	Références OPENFLUOR
C ₁	430	< 250 (320)	C (α)	Type humique, de haut poids moléculaire, associé à une activité biologique	C ₁ ¹ , C ₁ ² (14 correspondances)
C ₂	490	260 (375)	A (α')	Type humique, de haut poids moléculaire, fortement aromatique très répandu	C ₂ ¹ , C ₄ ³ (12 correspondances)
C ₃	340	285	T (γ)	Type protéinique et tryptophane	C ₅ ² , C ₃ ⁴ (2 correspondances)

Tableau 4 : Longueurs d'onde d'émission et d'excitation maximales ainsi que l'affectation des sources potentielles et des fonctions des composantes trouvés par l'analyse PARAFAC selon la littérature, dans le cadre du suivi de complexation de la MOD du point LM3. Maxima primaires donnés sans parenthèses, maxima secondaires entre parenthèses. (Amaral, Graeber et al. 2016)¹(Walker, Amon et al. 2013)²(Kamjunke, Nimptsch et al. 2017)³(Shutova et al. 2014)⁴

b) Point GE04 de Germignies

De la même manière que pour LM3, la modélisation PARAFAC des titrations (64 MEEF) donne trois composantes dont les massifs et spectres d'émission et d'excitation sont représentés sur la Figure 11 et les principales caractéristique dans le Tableau 5. Comme pour LM3, la MO est composée de deux composantes type humique et d'une composante type protéinique.

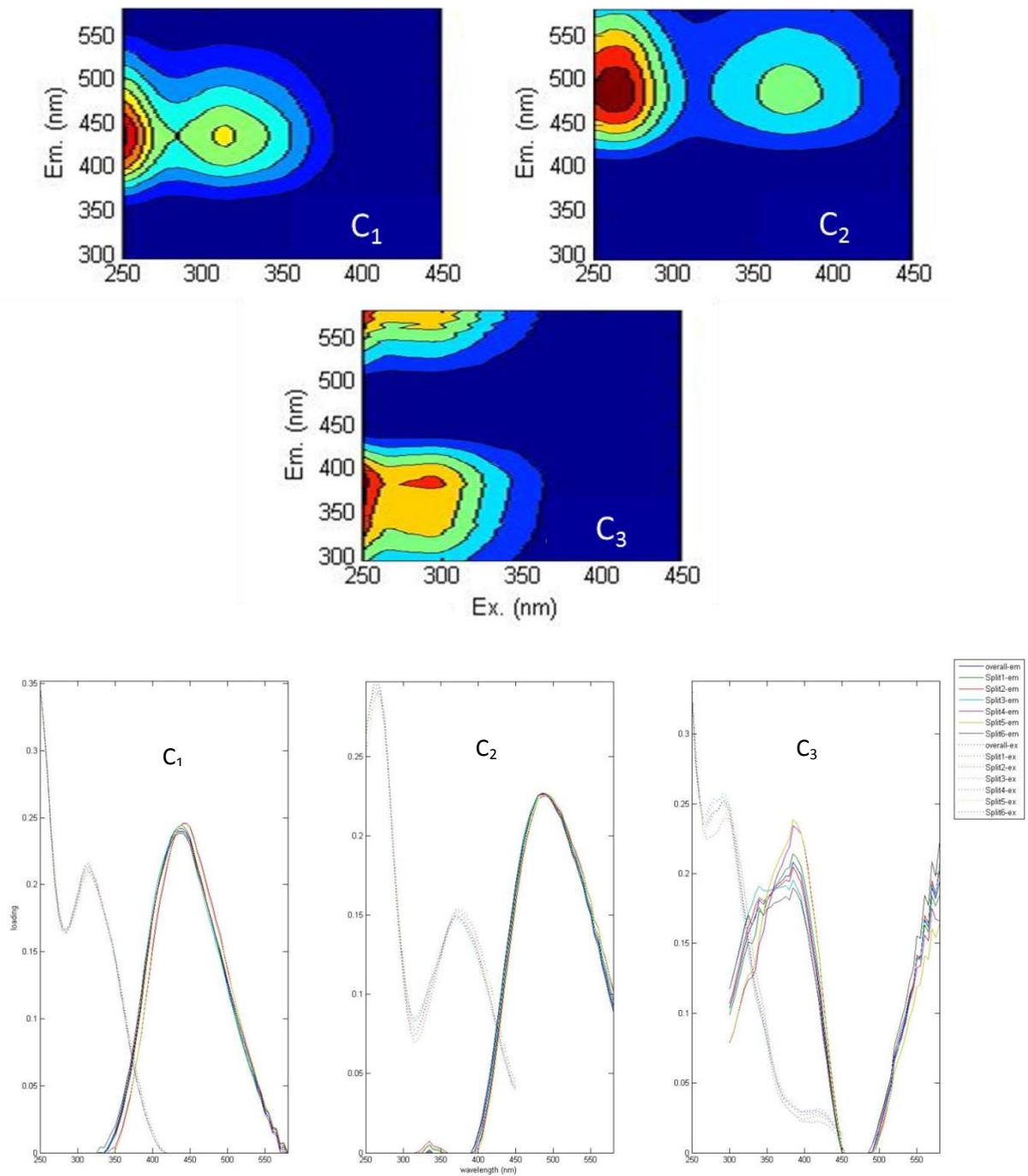


Figure 11 : Représentation des trois composantes et des spectres d'excitation et d'émission identifiés par PARAFAC dans le cadre du suivi de complexation de la MOD du point GE04.

Composante	λ_{max} émission (nm)	λ_{max} excitation (nm)	Pics	Affectation des sources et des fonctions potentielles	Références OPENFLUOR
C ₁	440	< 250 (315)	C (α)	Type humique, de haut poids moléculaire, associé à une activité biologique	C ₁ ¹ , C ₁ ² (15 correspondances)
C ₂	485	265 (375)	A (α')	Type humique, de haut poids moléculaire, fortement aromatique très répandu	C ₂ ³ , C ₁ ⁴ (25 correspondances)
C ₃	385	<250 (290)	T (γ)	Type protéinique et tryptophane + inconnu	0 correspondance

Tableau 5 : Longueurs d'onde d'émission et d'excitation maximales ainsi que l'affectation des sources potentielles et des fonctions des composantes trouvés par l'analyse PARAFAC selon la littérature, dans le cadre du suivi de complexation de la MOD du point GE04. Maxima primaires donnés sans parenthèses, maxima secondaires entre parenthèses. ¹Amaral, Graeber et al. (2016) ²(Walker, Amon et al. 2013) ³(Graeber, Gelbrecht et al. 2012) ⁴(Shutova, Baker et al. 2014).

c) Comparaison des modèles PARAFAC

Les composantes obtenues pour les deux modèles PARAFAC réalisés pour l'ensemble des échantillons de la Marque présentent quelques différences. En effet, les composantes C₁ et C₂ obtenues pour le modèle caractéristique de la MOD sont inversées pour le modèle où seule la station de prélèvement LM3 est étudiée. C₃ n'est pas modifiée. De plus la composante C₄ n'est pas présente. L'échantillonnage de LM3 pour le suivi de complexation a été effectué au mois de février 2017. A cette même période en 2016, lors du suivi de la composition de la MOD, C₄ était faiblement présente comparé aux autres mois de l'année. Cette comparaison démontre une nouvelle fois la variabilité de la composition de la MOD sur la rivière de la Marque. Pour Germignies très peu de différences sont observées pour les deux modèles PARAFAC. Seul 5 nm de différences sont observés pour C₁ et C₂. Toutefois pour la composante C₃, le massif obtenu pour le point GE04 est un peu plus étendu que celui obtenu pour l'ensemble des points de Germignies. Ceci laisse supposer pour ce point la présence de substances supplémentaires qui contribuent à la fluorescence.

En ce qui concerne maintenant la MOD des deux échantillons sélectionnés pour le suivi de la complexation des différents cations métalliques, celle-ci est globalement similaire : on retrouve les trois mêmes types de composantes, c'est-à-dire deux composantes du type humique (C₁ et C₂) et une composante du type protéinique (C₃). Cependant lorsque l'on compare les maxima des différents

massifs, on observe des différences plus ou moins importantes : elles sont faibles dans le cas de C_1 et C_2 (de l'ordre de 5 nm) et plus marquées pour C_3 avec 45 nm de différence pour le maximum d'émission du massif des substances protéiniques. Le massif de fluorescence de C_3 pour le site de Germignies s'étale largement dans les grandes longueurs d'onde d'émission (bien au-delà de la fluorescence des tryptophanes), ce qui confirme de nouveau la présence d'autres substances fluorescentes que les protéines qui participent à cette composante.

4. Modèle de Ryan et Weber

Afin d'appliquer l'équation du modèle de Ryan et Weber, l'intensité de fluorescence de chaque composante a été tracée en fonction de la quantité de cation métallique ajoutée. Etant donné la variation des intensités initiales de fluorescence (I_0) des différentes composantes, les intensités de fluorescence après addition du cation métallique ont été normalisées par rapport à I_0 pour faciliter la comparaison. Sur les Figures 12, 13 et 14 sont représentées les évolutions des intensités de fluorescence, ainsi que le résultat de l'optimisation de l'expression de Ryan et Weber, pour respectivement les composantes C_1 , C_2 et C_3 . La décroissance ou l'augmentation de fluorescence ne peut en aucun cas être modélisée par une seule fonction répondant à l'équation de Ryan et Weber. Il est nécessaire d'appliquer deux fois le modèle de Ryan et Weber pour chaque dosage, ce qui montre l'existence pour chaque composante d'au moins deux catégories de sites de complexation ayant des affinités vis-à-vis du métal très différentes. Cependant vu la quantité de métal ajouté, seule la première catégorie de sites présente un intérêt majeur dans le cadre de l'environnement naturel. Il faudrait en effet une pollution de très grande ampleur comme les effluents miniers, où les concentrations en métaux dissous peuvent atteindre des valeurs supérieures à $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ par exemple pour Zn(II) (Gammons et al. 2005), pour complexer la seconde catégorie de sites. Toutefois les constantes relatives à cette seconde complexation sont quand même reportées de manière à faire des comparaisons.

Pour chaque dosage, on observe une modification plus ou moins importante de l'intensité des composantes 1,2 et 3. D'une manière générale une extinction de fluorescence est observée sauf dans certains cas, telle la composante C_3 où une augmentation de l'intensité est observée.

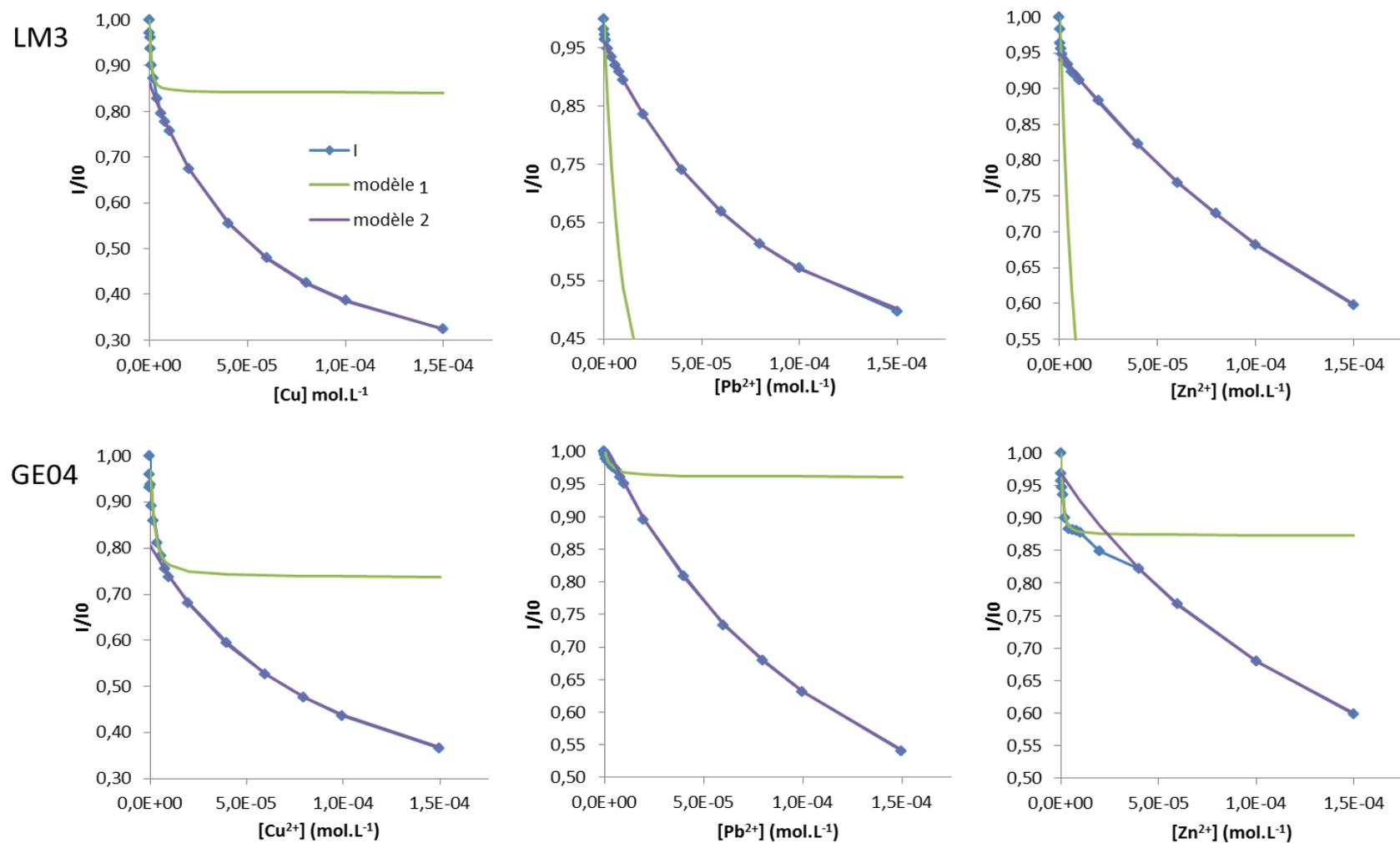


Figure 12 : Courbes d'extinction de fluorescence de la composante 1 des échantillons LM3 et GE04 avec l'ajout du cation métallique. Symbole : expérience, ligne continue : modélisation.

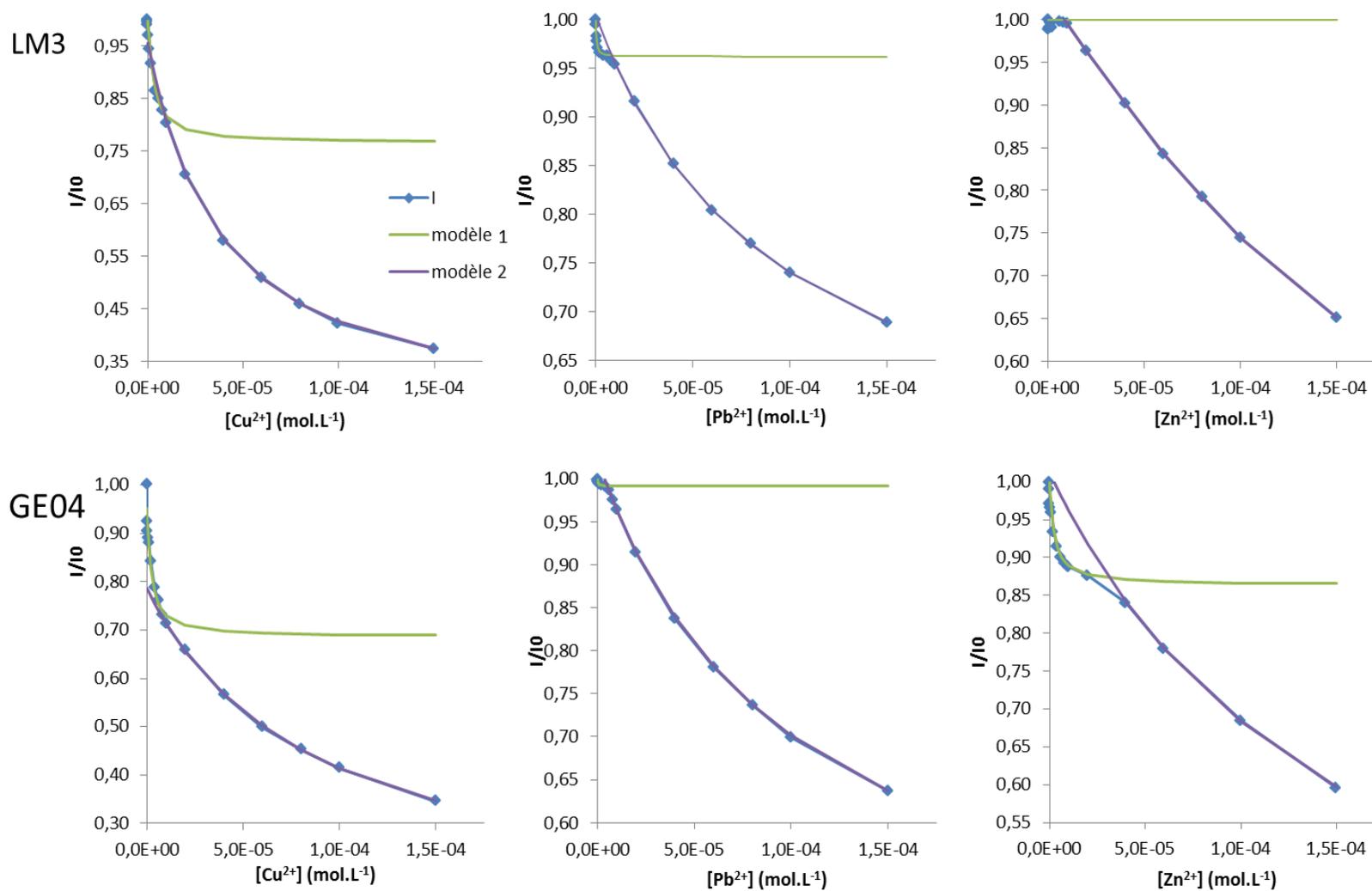


Figure 13 : Courbes d'extinction de fluorescence de la composante 2 des échantillons LM3 et GE04 avec l'ajout du cation métallique. Symbole : expérience, ligne continue : modélisation.

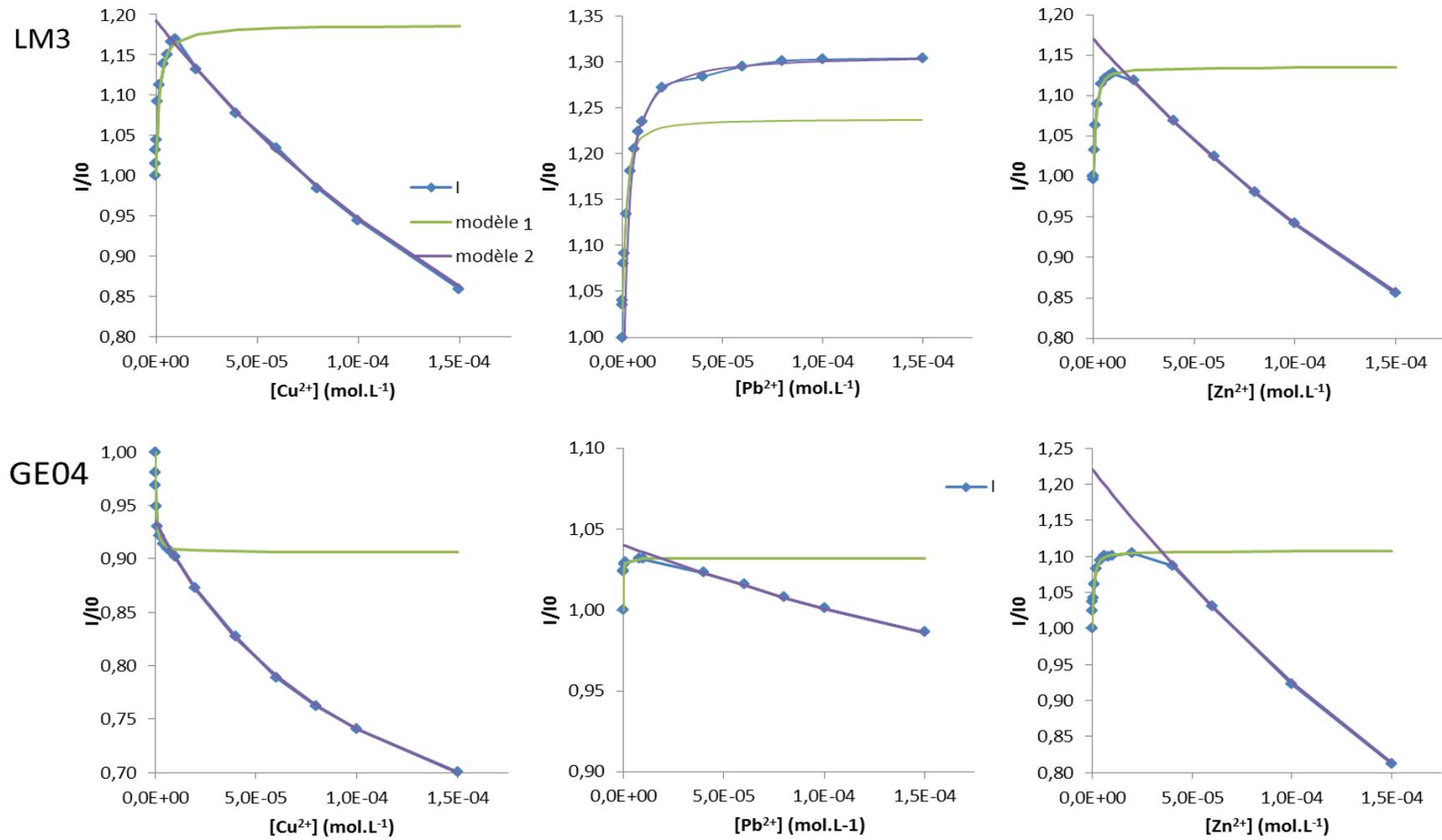


Figure 14 : Courbes d'extinction ou d'augmentation de fluorescence de la composante 3 des échantillons LM3 et GE04 avec l'ajout du cation métallique. Symbole : expérience, ligne continue : modélisation.

- Composante 1 (C_1)

La fluorescence de C_1 diminue quel que soit le métal ajouté où l'origine de la MOD. Le quenching est plus marqué dans le cas de l'ajout du cuivre (> à 60%) alors qu'il est moins important dans le cas du zinc et du plomb (< à 50 % pour une concentration en ion métallique de $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). Le changement de la catégorie des sites de fixation se fait à des concentrations métalliques différentes. Pour LM3, le changement a lieu beaucoup plus rapidement (entre 1 et 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) que pour GE04 (entre 8 et 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

- Composante 2 (C_2)

Pour la composante C_2 , on observe comme pour C_1 une extinction de la fluorescence pour les deux échantillons de MOD pour l'ensemble des métaux, sauf dans le cas de la complexation du Zn(II) avec LM3. Dans ce cas précis, l'intensité de fluorescence n'est pas modifiée lors des premiers ajouts de Zn(II) et commence à diminuer à partir de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. C'est le signe dans un premier temps d'une complexation avec une catégorie de sites non fluorescents puis une fois cette catégorie saturée, une complexation se produit avec une seconde catégorie de sites qui cette fois sont fluorescents. Comme pour C_1 , le quenching de C_2 est plus important avec Cu(II) (> 60%) et moins important pour Pb(II) et Zn(II) (entre 30 et 40% pour une concentration en ion métallique de $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). Pour cette composante, le changement de catégorie de sites se fait à des concentrations en métal plus élevées que pour C_1 dans le cas de LM3 (entre 8 et 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) et dans la même gamme de concentrations pour GE04 (entre 4 et 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

- Composante 3 (C_3)

Pour cette composante, on rencontre plusieurs cas de figures lors de l'ajout des différents ions métalliques. Dans le cas de LM3, lors de l'ajout de Cu(II) ou Zn(II), on observe d'abord une augmentation de la fluorescence jusqu'à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, puis une brusque diminution de celle-ci. Dans le cas de l'ajout de Pb(II), la fluorescence augmente en deux temps. Pour la MOD issue du point GE04 de Germignies, là aussi deux comportements différents sont observés. Le premier lors de la complexation de Pb(II) ou Zn(II), où dans un premier temps la fluorescence de la composante C_3 augmente jusqu'à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour Pb(II) et diminue ensuite faiblement, et pour Zn(II) la fluorescence augmente jusqu'à 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et ensuite diminue fortement. Lors de la complexation de Cu(II), la fluorescence de C_3 diminue comme pour les composantes C_1 et C_2 mais de manière moins prononcée (diminution de 30% de la fluorescence initiale).

L'optimisation du modèle de Ryan et Weber par une régression non linéaire permet d'obtenir la constante apparente de formation (K) pour les deux catégories de sites. L'ensemble des constantes K obtenus pour les trois cations métalliques sont répertoriées dans le Tableau 6.

		Cu(II)			Pb(II)			Zn(II)		
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₁	C ₂	C ₃	C ₁	C ₂	C ₃
LM3	log K ₁	6,36	5,61	5,88	4,97	6,59	6,06	5,03	/	6,23
	log K ₂	4,36	4,33	3,43	4,30	4,00	5,77	3,59	4,38	3,36
GE04	log K ₁	5,96	5,72	6,44	5,69	6,70	7,08	6,35	5,65	6,31
	log K ₂	4,05	4,02	3,93	3,86	3,98	4,09	3,68	3,70	3,64

Tableau 6 : Constantes apparentes de formation calculées pour les différentes composantes des échantillons LM3 et GE04.

Les constantes de formation de la première catégorie de sites (K₁) sont toujours supérieures à celles obtenues pour la seconde catégorie de sites (K₂). Ce résultat était attendu, les sites qui se complexent les premiers ont un pouvoir complexant supérieur et donc une valeur de log K plus élevée. L'évolution de l'intensité des composantes avec l'ajout de cations métalliques varie de manière sensible en fonction de la nature de celui-ci. Par exemple, nous avons vu que la composante 1 obtenue à partir de la MOD LM3 a un comportement très différent dans le cas de Cu(II) que dans les cas de Pb(II) et Zn(II). Pour Cu(II), la décroissance de fluorescence est beaucoup plus marquée que pour les deux autres cations pour les faibles concentrations. Cela conduit à l'obtention d'une constante de formation 23 fois plus importante que celle calculée pour Pb(II) et Zn(II). A partir de cette constatation, il est possible de comparer pour chaque composante issue des MOD LM3 et GE04 les constantes de formation apparentes des complexes formés et ainsi établir un classement des affinités des différentes catégories de sites complexant vis-à-vis des cations métalliques employés. Les résultats du classement sont reportés dans le Tableau 7 pour les deux constantes K₁ et K₂.

		K1	K2
C1	LM3	Pb(II) ~ Zn(II) << Cu(II)	Zn(II) < Pb(II) < Cu(II)
	GE04	Pb(II) < Cu(II) < Zn(II)	Zn(II) < Pb(II) < Cu(II)
C2	LM3	Cu(II) < Pb(II) (Zn(II)*)	Pb(II) < Cu(II) < Zn(II)
	GE04	Zn(II) < Cu(II) < Pb(II)	Zn(II) < Pb(II) < Cu(II)
C3	LM3	Cu(II) < Pb(II) < Zn(II)	Zn(II) < Cu(II) < Pb(II)
	GE04	Zn(II) < Cu(II) < Pb(II)	Zn(II) < Cu(II) < Pb(II)

Tableau 7 : Récapitulatif du classement des affinités des cations métalliques pour chaque composante de MOD.
 (*réaction de complexation observée mais constante non déterminée)

Nous pouvons tirer plusieurs constats de ces classements. D'une manière générale, l'ordre est différent pour les deux constantes des 3 composantes.

Pour la constante K_1 , l'ordre de stabilité des complexes est différent pour les trois composantes de LM3 et GE04. De même pour un métal et une composante donnés, il est possible d'observer de très importantes variations dans la valeur de la constante de formation (facteur 10 pour Pb(II) pour C_3 , par exemple). Cela peut s'expliquer par une composition chimique différente pour les deux échantillons, due à une origine différente, ce qui est confirmé par la position spectrale des maxima des massifs de fluorescence des différentes composantes. De plus pour les composantes C_2 et C_3 de chaque échantillon, l'ordre de K_1 est conservé. Par contre il est différent de celui de C_1 . Pour GE04, l'ordre de C_1 est l'inverse de celui de C_2 et C_3 .

En ce qui concerne K_2 , l'ordre du pouvoir complexant des métaux est plus régulier que celui de K_1 pour les deux échantillons, même si une inversion est observée pour Zn(II) dans le cas de C_2 . D'une manière générale, Zn(II) est le cation qui a le moins d'affinité pour la seconde catégorie de sites de sites de complexation.

En ce qui concerne l'affinité des différents métaux pour les deux origines de la MOD, dans le cas du Pb(II), quelle que soit la composante, la valeur de K_1 de GE04 est supérieure à celle de LM3, et l'ordre inverse est obtenu pour K_2 . Pour Cu(II) et Zn(II), le pouvoir complexant des deux échantillons dépend de la composante. Toutefois, au regard des constantes, on peut dire que d'une manière générale, GE04 a un pouvoir complexant légèrement supérieur à celui de LM3 en ce qui concerne la première catégorie de sites impliqués dans la complexation. La situation est par contre inversée pour la seconde catégorie de sites.

A partir de conditions identiques (pH, pourcentage de COD, quantité de métal ajouté) pour les deux échantillons, les variations observées dans la valeur des constantes de formation et le classement de l'affinité des cations métalliques montrent une nette différence dans le

comportement des deux échantillons. Le pouvoir complexant et la sélectivité différentes de ces deux échantillons peut s'expliquer par des origines différentes de LM3 et GE04 et par conséquent ces deux MOD doivent présenter une composition chimique et une distribution des sites potentiels de fixation des métaux très différentes.

Conclusion

Le premier objectif de l'étude présentée dans ce chapitre était de caractériser et d'évaluer l'évolution spatio-temporelle de la MOD des deux sites d'études. Cette MOD issue des deux sites présente quelques similitudes, une composition mixte : mélange de MOD allochtone et autochtone, et des composantes communes : des substances humiques à haut poids moléculaire et des substances protéiniques, toutes deux associées à une activité biologique. Néanmoins, la MOD de ces deux sites ne suit pas la même évolution temporelle. La MOD de Germignies subit peu de variation de sa composition alors que la MOD de la Marque présente des variations saisonnières et est impactée par des apports extérieurs. En effet, la MOD de la rivière est non homogène dans le temps, la première période de l'étude (septembre à novembre) est dominée par une MOD issue d'une forte activité biologique alors que pour la seconde période (décembre à février) une MOD allochtone provenant du lessivage des sols est observée. De plus, les apports des deux ouvrages d'assainissements (la STEU et le lac du Héron) influence la composition de cette MOD avec une augmentation des substances protéiniques. Ces résultats soulignent donc l'importance de la caractérisation de la MOD afin de mieux étudier son devenir dans le milieu naturel.

Le second objectif de ce chapitre était d'étudier les interactions entre la MOD d'un point de prélèvement de chacun des sites d'étude avec différents cations métalliques. Pour cela, le processus de complexation de trois cations métalliques (Cu(II), Pb(II) et Zn(II)) par les deux MOD a été suivi par spectroscopie de fluorescence. Pour les deux sites d'étude, les résultats obtenus montrent que la matrice de fluorescence de la MOD est constituée de trois composantes, deux correspondent à des substances humiques et la troisième à des substances protéiniques. Ces trois composantes sont impactées par l'ajout des cations et on observe que deux catégories de sites de complexation sont mises en jeu dans la fixation du cation métallique, mais seule la première représente un intérêt environnemental. Les valeurs des constantes de formation obtenues sont très variables (la plus grande constante obtenues est 130 fois plus importante que la plus faible), elles dépendent à la fois de l'origine de la MOD, de la composante et du cation métallique. Toutefois on peut noter que quelle que soit la MOD et la composante, l'ajout de Cu(II) provoque la plus grande évolution de l'intensité de fluorescence, mais ce sont Pb(II) ou Zn(II) qui ont le plus d'affinité pour les fluorophores de chaque composante. De plus, de manière générale c'est la composante C3 (substances protéiniques) qui est constituée de la catégorie de sites ayant la plus grande affinité pour les différents cations métalliques étudiés. Enfin, comme le montre le graphe de la Figure 15, où les constantes obtenues pour la MOD de Germignies sont représentées en fonction de celles de la Marque, c'est la MOD issue

des mares de Germignies qui est la plus complexante. En effet, à l'exception de la constante obtenue pour la complexation de Cu(II) pour C₁, toutes les autres constantes se situent au-dessus de la diagonale.

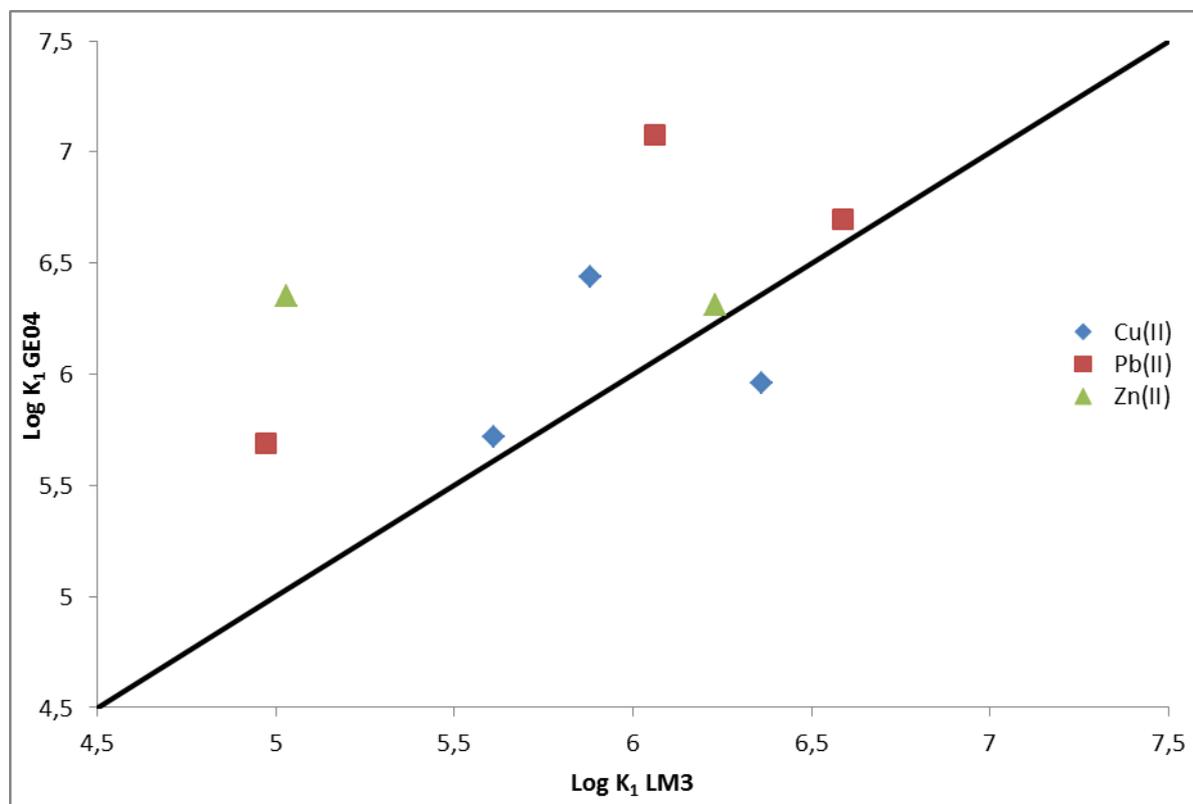


Figure 15 : Distribution des constantes log K₁ obtenues pour GE04 en fonction de celles obtenues pour LM3.

L'ensemble des résultats précédemment exposés soulèvent donc plusieurs questionnements :

- La composition de la MOD de la Marque évolue dans le temps avec notamment l'apparition d'une composante supplémentaire lorsque l'activité biologique est importante. Comment évolue donc la spéciation des éléments traces au cours de l'année ? Celle-ci est-elle fortement impactée ?
- La MOD de la Marque est impactée par les rejets des ouvrages d'assainissement qui se traduit principalement par une augmentation de la composante C₃. C₃ étant constituée de la catégorie de sites les plus complexants, ces rejets vont-ils entraîner une modification significative de la disponibilité des métaux ?
- La MOD de la mare GE04 a un pouvoir complexant des métaux étudiés supérieur à celui observé pour la MOD de la Marque. D'un point de vue de la signature spectroscopique de la MOD, seul C₃ montre des différences notables. La composante C₃ de GE04 est plus étendue spectralement que celle de C₃ de LM3, et laisse ainsi supposer la contribution d'autres espèces qui ne sont pas du type

protéinique. On notera également une importante différence dans la concentration des espèces soufrées avec une concentration en groupements thiols cinq fois supérieure à la moyenne pour GE04. Les groupements soufrés, étant considérés comme de très bons sites de complexation, sont-ils à l'origine des différences observées ?

La réponse à la première question nécessiterait de faire un grand nombre d'études avec un suivi spatio-temporel de la complexation des différents cations métalliques avec la MOD. Ce travail ne rentre pas dans le cadre de cette thèse et constitue une perspective envisageable à long terme. Par contre, dans la suite de ce travail nous avons essayé d'une part, de mieux appréhender le rôle des composés soufrés dans le processus de complexation et d'autre part, évaluer l'impact des eaux usées sur la complexation.

Références bibliographique :

- Amaral, V., D. Graeber, D. Calliari and C. Alonso (2016). "Strong linkages between DOM optical properties and main clades of aquatic bacteria." Limnology and Oceanography **61**(3): 906-918.
- Baker, A. and R. Inverarity (2004). "Protein-like fluorescence intensity as a possible tool for determining river water quality." Hydrological Processes **18**(15): 2927-2945.
- Barber, L. B., J. A. Leenheer, T. I. Noyes and E. A. Stiles (2001). "Nature and transformation of dissolved organic matter in treatment wetlands." Environmental Science and Technology **35**(24): 4805-4816.
- Coble, P. G. (1996). "Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy." Marine Chemistry **51**(4): 325-346.
- Coble, P. G., C. E. Del Castillo and B. Avril (1998). "Distribution and optical properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monsoon." Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography **45**(10-11): 2195-2223.
- Cory, R. M. and D. M. McKnight (2005). "Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter." Environmental Science and Technology **39**(21): 8142-8149.
- Foden, J., D. B. Sivyer, D. K. Mills and M. J. Devlin (2008). "Spatial and temporal distribution of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) fluorescence and its contribution to light attenuation in UK waterbodies." Estuarine, Coastal and Shelf Science **79**(4): 707-717.
- Gammons, C. H., D. A. Nimick, S. R. Parker, T. E. Cleasby and R. B. McCleskey (2005). "Diel behavior of iron and other heavy metals in a mountain stream with acidic to neutral pH: Fisher Creek, Montana, USA." Geochimica et Cosmochimica Acta **69**(10): 2505-2516.
- Garcia, R. D., M. Reissig, C. P. Queimalinos, P. E. Garcia and M. C. Dieguez (2015). "Climate-driven terrestrial inputs in ultraoligotrophic mountain streams of Andean Patagonia revealed through chromophoric and fluorescent dissolved organic matter." Sci Total Environ **521-522**: 280-292.
- Graeber, D., J. Gelbrecht, M. T. Pusch, C. Anlanger and D. von Schiller (2012). "Agriculture has changed the amount and composition of dissolved organic matter in Central European headwater streams." Science of the Total Environment **438**: 435-446.
- Heitmann, T. and C. Blodau (2006). "Oxidation and incorporation of hydrogen sulfide by dissolved organic matter." Chemical Geology **235**(1-2): 12-20.
- Ivanovsky, A. (2016). "Ouvrages d'assainissement des eaux et qualité du milieu récepteur en zone urbaine. Cas de rejets dans La Marque à Villeneuve d'Ascq."
- Kamjunke, N., J. Nimptsch, M. Harir, P. Herzsprung, P. Schmitt-Kopplin, T. R. Neu, D. Graeber, S. Osorio, J. Valenzuela, J. Carlos Reyes, S. Woelfl and N. Hertkorn (2017). "Land-based salmon aquacultures change the quality and bacterial degradation of riverine dissolved organic matter." Scientific Reports **7**.

Lamers, L. P., L. L. Govers, I. C. Janssen, J. J. Geurts, M. E. Van der Welle, M. M. Van Katwijk, T. Van der Heide, J. G. Roelofs and A. J. Smolders (2013). "Sulfide as a soil phytotoxin-a review." Front Plant Sci **4**: 268.

Leenheer, J. A. and J. P. Croué (2003). "Characterizing aquatic dissolved organic matter." Environmental Science and Technology **37**(1): 18A-26A.

Mash, H., P. K. Westerhoff, L. A. Baker, R. A. Nieman and M.-L. Nguyen (2004). "Dissolved organic matter in Arizona reservoirs: assessment of carbonaceous sources." Organic Geochemistry **35**(7): 831-843.

Murphy, K. R., G. M. Ruiz, W. T. M. Dunsmuir and T. D. Waite (2006). "Optimized parameters for fluorescence-based verification of ballast water exchange by ships." Environmental Science and Technology **40**(7): 2357-2362.

Murphy, K. R., C. A. Stedmon, P. Wenig and R. Bro (2014). "OpenFluor- An online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment." Analytical Methods **6**(3): 658-661.

Sharma, A. and S. G. Schulman (1999). Introduction to Fluorescence Spectroscopy.

Shutova, Y., A. Baker, J. Bridgeman and R. K. Henderson (2014). "Spectroscopic characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: From PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths." Water Res **54**: 159-169.

Stedmon, C. A. and S. Markager (2005). "Resolving the variability in dissolved organic matter fluorescence in a temperate estuary and its catchment using PARAFAC analysis." Limnology and Oceanography **50**(2): 686-697.

Stedmon, C. A., S. Markager and R. Bro (2003). "Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy." Marine Chemistry **82**(3-4): 239-254.

Walker, S. A., R. M. W. Amon, C. Stedmon, S. Duan and P. Louchouart (2009). "The use of PARAFAC modeling to trace terrestrial dissolved organic matter and fingerprint water masses in coastal Canadian Arctic surface waters." Journal of Geophysical Research **114**.

Walker, S. A., R. M. W. Amon and C. A. Stedmon (2013). "Variations in high-latitude riverine fluorescent dissolved organic matter: A comparison of large Arctic rivers." Journal of Geophysical Research: Biogeosciences **118**(4): 1689-1702.

Xia, K., F. Weesner, W. F. Bleam, P. R. Bloom, U. L. Skyllberg and P. A. Helmke (1998). "XANES studies of oxidation states of sulfur in aquatic and soil humic substances." Soil Science Society of America Journal **62**(5): 1240-1246.

Yamashita, Y., J. N. Boyer and R. Jaffé (2013). "Evaluating the distribution of terrestrial dissolved organic matter in a complex coastal ecosystem using fluorescence spectroscopy." Continental Shelf Research **66**: 136-144.

Yu, Z. G., S. Peiffer, J. Gottlicher and K. H. Knorr (2015). "Electron transfer budgets and kinetics of abiotic oxidation and incorporation of aqueous sulfide by dissolved organic matter." Environ Sci Technol **49**(9): 5441-5449.

Chapitre IV : Caractérisation d'extrait de MO et complexation métallique

Chapitre IV : Caractérisation d'extrait de MO et complexation métallique

I.	Caractérisation des fractions de matière organique	104
1.	Analyse élémentaire	104
2.	Spectroscopie UV-Visible et de fluorescence	105
a)	Indices	105
b)	MEEF	105
c)	Modélisation PARAFAC	106
d)	Comparaison	110
3.	Spectrométrie de masse à résonance cyclonique ionique (FT-ICR-MS)	111
4.	Détermination des groupements thiols	116
II.	Suivi de la complexation métallique	117
1.	Fractions Suwannee River et Pony Lake	118
2.	Fractions de Jeddah	120
III.	Discussion	129
1.	Comparaison extraits eaux de surface / eaux usées	129
2.	Comparaison eaux de surface non extraites / extraites	131
Conclusion		132
Références bibliographiques :		134

Le chapitre précédent a mis en évidence des comportements différents de complexation en fonction du cation métallique complexé mais aussi en fonction de l'origine et de la composition de la MO issue d'eaux naturelles prélevées sur deux sites distincts. Une des hypothèses émises pour expliquer les différences observées serait la présence plus abondante de groupements soufrés. Il a donc été envisagé de vérifier cette hypothèse en comparant les propriétés de complexation d'extraits de MO contenant une quantité non négligeable de soufre à un extrait de MO plus classique. L'extrait de référence choisi est la fraction hydrophobe acide (i.e substances humiques) de la Suwannee River (SR_HPOA). Cet extrait a été très largement étudié, que ce soit en termes de composition ou de complexation avec les métaux. Trois autres extraits ont été choisis pour leur plus forte teneur en soufre ainsi que pour leur origine. Il s'agit de l'acide fulvique de Pony Lake (PL_FA) qui est la fraction de référence de l'IHSS la plus soufrée. Les deux autres extraits sont les fractions hydrophobe (HPO) et transphilique (TPH) de la MO issue des eaux usées de la STEU de Jeddah/Arabie Saoudite (JWW) qui contiennent plus de 2% de soufre.

Le but du travail présenté dans ce chapitre est dans un premier temps, de caractériser les extraits de MO afin de mettre en évidence leurs différences de composition chimique. Puis dans un second temps, seront présentés le suivi de la complexation de cations métalliques au moyen de l'enregistrement de MEEF et la détermination des caractéristiques des complexes formés. Les quantités d'extrait de SR_HPOA et PL_FA étant assez limitées, seuls trois cations métalliques (Cu(II), Pb(II) et Zn(II)) ont été choisis pour l'étude des interactions MO-métaux. Pour les extraits JWW, l'étude a été réalisée avec un quatrième cation : Ni(II). Enfin dans une dernière partie les différences de comportement entre ces quatre extraits ainsi que ceux des MOD présentés dans le chapitre précédent seront discutées.

I. Caractérisation des fractions de matière organique

Dans ce paragraphe sera détaillée la caractérisation des quatre extraits de MO étudiés. La caractérisation a été obtenue en utilisant différentes techniques (analyse élémentaire, spectroscopies UV-visible et de fluorescence ainsi que FT-ICR-MS) et par une quantification des groupements thiols.

1. Analyse élémentaire

La composition élémentaire relative de chaque fraction est reportée dans le Tableau 1. La somme des masses élémentaires dépasse 94 % dans chaque fraction, indiquant que les constituants inorganiques ont été efficacement éliminés pendant le fractionnement. Les différentes fractions présentent une teneur assez similaire en carbone et en hydrogène organique. Le carbone organique a une contribution moyenne de 50% de la masse de l'extrait, tandis que celle de l'hydrogène est de 5 %. Une différence significative est observée pour les autres éléments. Le pourcentage massique de l'oxygène varie entre 41,3 et 26,5 %, celui de l'azote entre 0,7 et 6,51 % et celui du soufre entre 0,44 et 3,03 %. L'extrait SR_HPOA présente le plus d'oxygène et le moins d'azote et de soufre organique, PL_FA a le pourcentage massique d'azote et de soufre le plus élevé des quatre extraits. Les deux extraits issus des eaux usées de Jeddah ont quant à eux une composition hétérogène. La fraction HPO possède le plus fort taux de carbone organique (56,6 %) et le plus faible taux d'oxygène (26,5%) ainsi qu'un pourcentage de soufre plus élevé que la moyenne. La fraction TPH possède un taux d'azote organique très élevé (6%). Les rapports atomiques indiquent que la fraction SR_HPOA est la plus aromatique puisque, elle a le rapport O/C le plus élevé et le rapport H/C le plus faible (Ma et al. 2001) et que les fractions de Jeddah sont les moins aromatiques.

Extrait (%)	C	H	O	N	S	P	O/C	H/C
SR HPOA ¹	48,00	4,10	41,30	0,70	0,44	<0,01	0,65	1,02
PL FA ²	52,47	5,39	31,38	6,51	3,03	0,55	0,45	1,22
JWW HPO ³	56,60	6,30	26,50	2,90	2,20	<0,01	0,35	1,33
JWW TPH ³	50,20	6,00	30,10	6,00	2,50	<0,01	0,45	1,42

Tableau 1 : Analyse élémentaire en pourcentage massique des quatre extraits étudiés. Valeurs issues de la littérature ¹(Croue et al. 2000)²(Cawley et al. 2013)³(Zheng et al. 2014).

2. Spectroscopie UV-Visible et de fluorescence

a) *Indices*

Pour les quatre extraits étudiés la $SUVA_{254}$ et l'indice de fluorescence ont été déterminés, les valeurs obtenues sont répertoriées dans le Tableau 2. Ces deux indices confirment l'origine et la nature des extraits. Pour SR_HPOA la valeur de la $SUVA_{254}$ est supérieure à 3 et l'IF est inférieur à 1,2, indiquant une MO fortement aromatique provenant de la décomposition de végétaux (supérieurs ou macrophytes). Pour PL_FA la valeur des deux indices est intermédiaire, ceci indiquant une MO d'origine à la fois allochtone et autochtone. Et enfin pour les deux extraits JWW, les indices obtenus sont en accord avec l'origine de la MO (fractions issues d'eaux usées) puisque la $SUVA_{254}$ est faible et que l'IF est supérieure à 1,8.

	$SUVA_{254}$	IF
SR HPOA	4,6	1,17
PL FA	3,0	1,46
JWW HPO	1,4	2,04
JWW TPH	1,2	1,92

Tableau 2 : Récapitulatif de la $SUVA_{254}$ et de l'indice de fluorescence pour les quatre extraits de MON étudiés.

b) *MEEF*

La Figure 1 montre les MEEF des quatre extraits étudiés, enregistrées en l'absence de métaux, pour une concentration de 5 mg C.L⁻¹. Pour les deux extraits JWW, des massifs de fluorescence sont observés à la fois dans la région des substances du type protéiniques ($E_m < 400$ nm) et substances humiques ($E_m > 400$ nm). Les fractions SR_HPOA et PL_FA présentent tous deux, à première vue, uniquement des massifs de fluorescence dans la région des substances humiques ($E_m > 400$ nm).

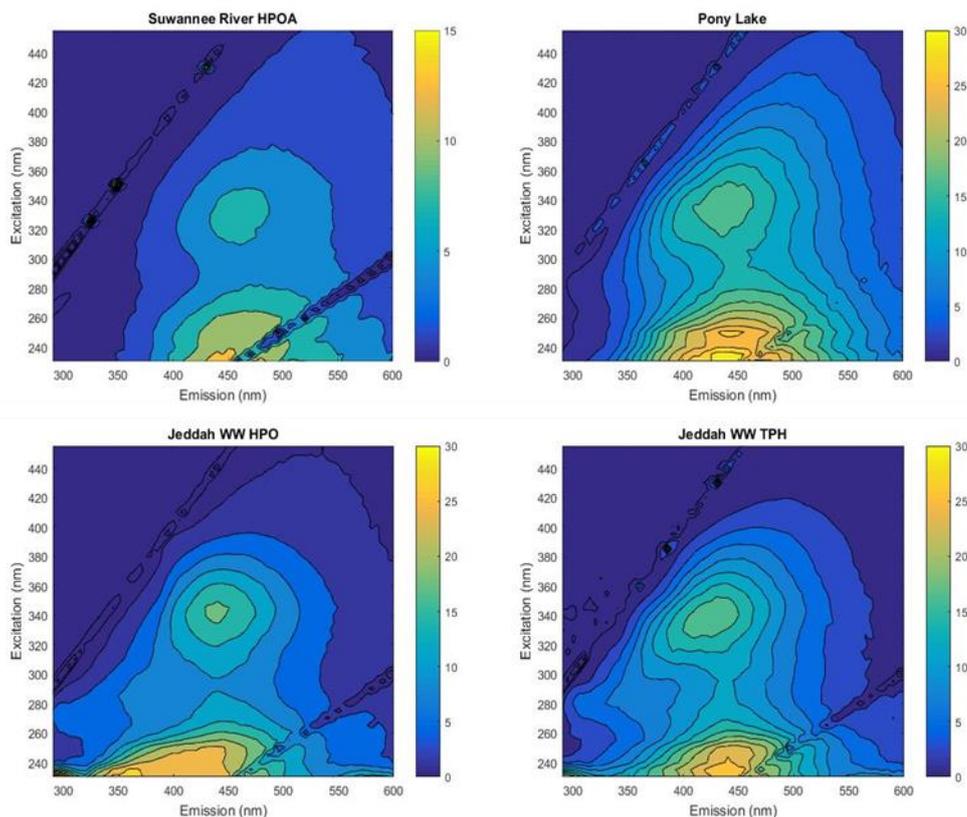


Figure 1 : MEEF des quatre extraits de MO étudiés, pour une concentration de 5 mgC.L⁻¹.

c) Modélisation PARAFAC

Les extraits utilisés ayant des origines et des compositions différentes, il a été choisi de réaliser deux modèles PARAFAC distincts afin d'obtenir la meilleure modélisation possible. Un premier modèle a été retenu pour les deux extraits de MO issus d'eau de surface, c'est-à-dire SR_HPOA et PL_FA et un second pour les deux extraits de MO provenant des eaux usées JWW.

- Cas de la Suwannee River HPOA et de Pony lake FA

Pour ces deux extraits, la modélisation PARAFAC a été réalisée sur un ensemble de 149 MEEF, 3 outliers ont été enlevés du modèle. Un modèle composé de trois composantes a été validé par split half analysis. La représentation des trois composantes est présentée sur la Figure 2.

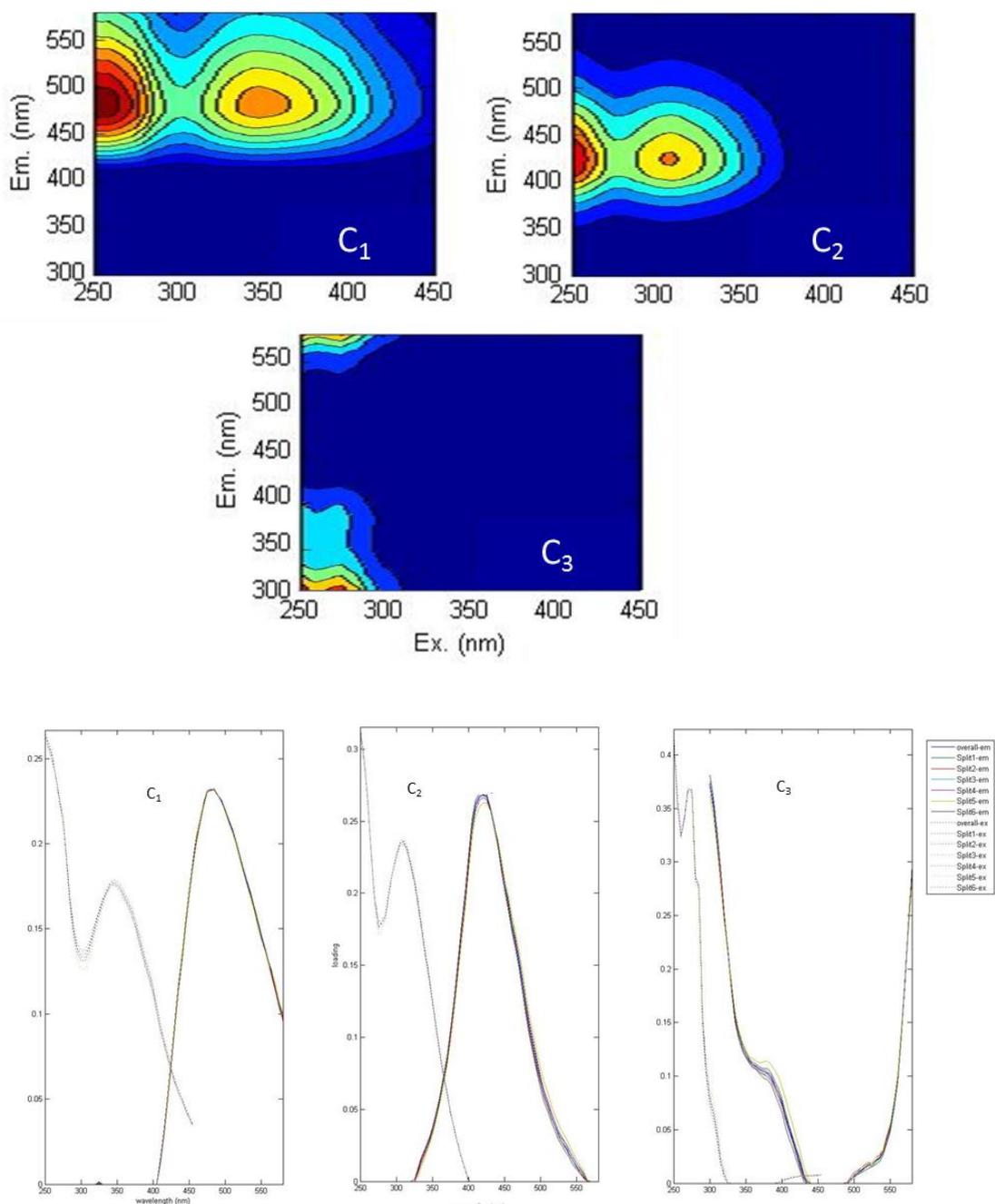


Figure 2 : Représentation des trois composantes et des spectres d'excitation et d'émission identifiées par PARAFAC dans le cadre du suivi de complexation de la MOD de SR_HPOA et PL_FA.

Les deux premières composantes sont du type substances humiques et la troisième du type substance protéinique. Les maxima d'émission et d'excitation, l'attribution de ces massifs ainsi que leurs correspondances avec la littérature sont regroupés dans le Tableau 3.

Composante	λ_{\max} Emission (nm)	λ_{\max} Excitation (nm)	Pics	Affectation des sources et des fonctions potentielles	Références OPENFLUOR
C ₁	485	255 (350)	C(α)	Type humique, à haut poids moléculaire associé à une activité biologique	C ₁ ¹ C ₄ ² (23 correspondances)
C ₂	425	250 (310)	M(β)	Type humique, à faible poids moléculaire associé à une activité biologique	C ₂ ¹ C ₃ ² (15 correspondances)
C ₃	300	250 (275)	B(γ)	Type Tyrosine	C ₄ ³ (1 correspondance)

Tableau 3 : Longueur d'ondes d'émission et d'excitation maximales ainsi que l'affectation des sources potentielles et des fonctions des composantes trouvées par l'analyse de PARAFAC selon la littérature, dans le cadre du suivi de complexation de la MOD des extraits de SR et PL. Maxima primaires donnés sans parenthèses, maxima secondaires entre parenthèses.¹Shutova et al. (2014) ²(Kamjunke et al. 2017) ³(Dainard et al. 2015).

Pour ces deux extraits, l'utilisation de l'outil de modélisation PARAFAC, met en évidence la présence de substances type protéinique que l'on ne peut pas détecter par une simple analyse visuelle du type « pic peaking » réalisée en première approche.

- Cas des fractions des eaux usées de Jeddah

Pour ces deux extraits issus d'eaux usées, la modélisation PARAFAC a été réalisée sur un ensemble de 229 MEEF, 3 outliers ont été enlevés du modèle. Un modèle composé cette fois-ci de quatre composantes a été validé par split half analysis. La représentation des quatre composantes est présentée sur la Figure 3. Trois des quatre composantes sont du type substances humiques et la dernière est du type substance protéinique. Les maxima d'émission et d'excitation, l'attribution de ces massifs ainsi que leurs correspondances avec la littérature sont regroupés dans le Tableau 4.

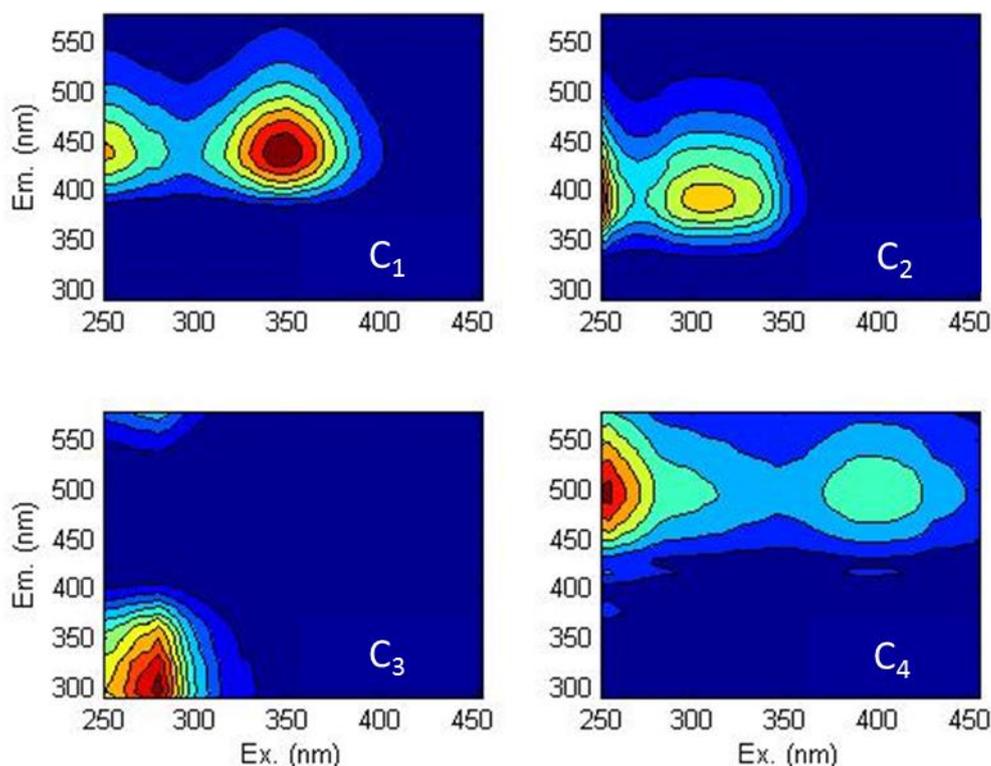


Figure 3 : Représentation des quatre composantes et des spectres d'excitation et d'émission identifiées par PARAFAC dans le cadre du suivi de complexation de la MOD des deux extraits de Jeddah.

Composante	λ_{\max} Emission (nm)	λ_{\max} Excitation (nm)	Pics	Affectation des sources et des fonctions potentielles	Références OPENFLUOR
C ₁	440	250 (350)	C (α)	Type humique	$C_1^1 C_3^2$ (5 correspondances)
C ₂	395	<250 (310)	M (β)	Type fulvique ou humique	$C_2^1 C_2^2 C_1^3$ (20 correspondances)
C ₃	305	275	B (γ)	Produit de l'activité microbienne du type tyrosine	$C_5^2 C_5^3$ (11 correspondances)
C ₄	500	255 (395)	U	Type humique avec une origine autochtone	$C_2^4 C_4^5$ (13 correspondances)

Tableau 4 : Longueur d'ondes d'émission et d'excitation maximales ainsi que l'affectation des sources potentielles et des fonctions des composantes trouvées par l'analyse de PARAFAC selon la littérature, dans le cadre du suivi de complexation de la MOD des extraits de Jeddah. Maxima primaires donnés sans parenthèses, maxima secondaires entre parenthèses. ¹(Osburn et al. 2011), ²(Shutova, Baker et al. 2014), ³(Cawley et al. 2012), ⁴(Graeber et al. 2012), ⁵(Kamjunke, Nimptsch et al. 2017). (U = Unknown)

La matière organique issue des eaux usées est composée de constituants organiques globaux, comme les acides humiques et fulviques, les tanins, des composés apparentés à la lignine et une variété de tensioactifs. Beaucoup d'eaux usées ont un microbiote complexe comprenant des bactéries et des virus, ainsi que du plancton et des algues (Ahmad et al. 1995). Une partie de ces composés se retrouve dans nos extraits de MO JWW. Ceci peut donc expliquer l'obtention d'un modèle PARAFAC plus complexe que pour la MO issue des deux extraits d'eaux de surface.

d) Comparaison

Afin de comparer les différentes composantes obtenues pour les deux modèles PARAFAC, il est possible d'associer en fonction des pics et des affectations, respectivement les trois composantes C₁, C₂ et C₃ du modèle PARAFAC réalisé pour les fractions SR_HPOA et PL_FA aux composantes C₁, C₂ et C₃ du modèle PARAFAC de Jeddah. L'abondance relative des différentes composantes PARAFAC des quatre extraits de MO est représentée sur la Figure 4. Elle permet une rapide comparaison de la composition des extraits issus de la même modélisation PARAFAC. Ainsi on observe pour les extraits JWW le même ordre de présence des composantes mais les intensités varient. Ainsi pour JWW_TPH la composante C₁ est plus présente que pour JWW_HPO, au détriment de C₂. C₃, C₄ sont présentes dans des proportions identiques pour les deux extraits. Pour SR_HPOA et PL_FA les proportions de C₁ et C₂ varient légèrement et C₃ reste constante pour les deux extraits. De plus SR_HPOA et PL_FA ont une composition moins diversifiée que les extraits JWW puisque seulement 3 composantes ont été modélisées.

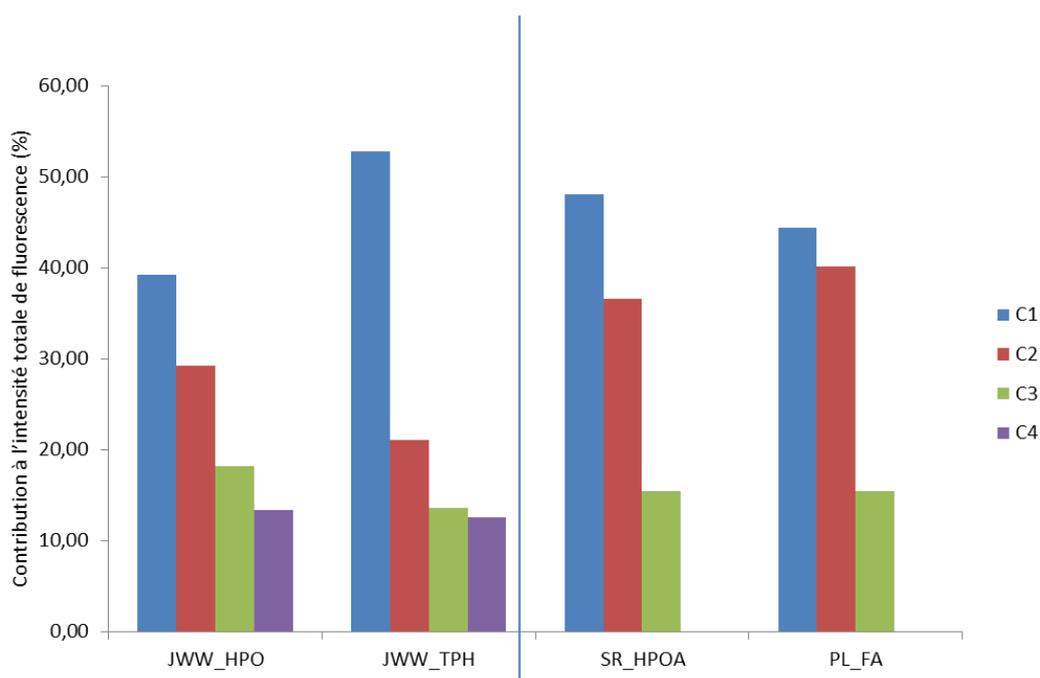


Figure 4 : Comparaison des intensités relatives des composantes PARAFAC des quatre extraits de MO étudiés.

L'analyse par spectroscopie de fluorescence couplée à une modélisation chimiométrique des quatre extraits de MO, montre une différence dans la composition de la MO. Pour les deux extraits de MO issue d'eaux usées, ils contiennent quatre groupes de fluorophores, signe d'une MO plus diversifiée et dont l'origine est marquée par une forte proportion de l'activité microbienne. Alors que pour les deux extraits issus des eaux naturelles, la MO est majoritairement composée de substances humiques.

3. Spectrométrie de masse à résonance cyclonique ionique (FT-ICR-MS)

Une analyse par spectrométrie de masse à résonance cyclonique ionique a été réalisée sur les extraits de MO choisis. Ces analyses ont été réalisées par le Helmholtz Center de Munich (Allemagne). Les résultats permettent l'obtention d'informations qualitatives complémentaires sur la composition élémentaire, moléculaire et structurale des extraits.

Dans un premier temps, les spectres de masse FT-ICR-MS obtenues en mode négatif des quatre MOD isolées, représentés sur la Figure 5, montrent une large distribution continue des pics de masse indiquant une matière organique hautement transformée. Bien que les distributions de masse des quatre extraits s'étendent sur la même gamme ($200 < m/z < 850$), la répartition des pics est différente. Ces spectres montrent donc des extraits de MOD complexes et hétérogènes qui possèdent un nombre important d'espèces moléculaires diversifiées.

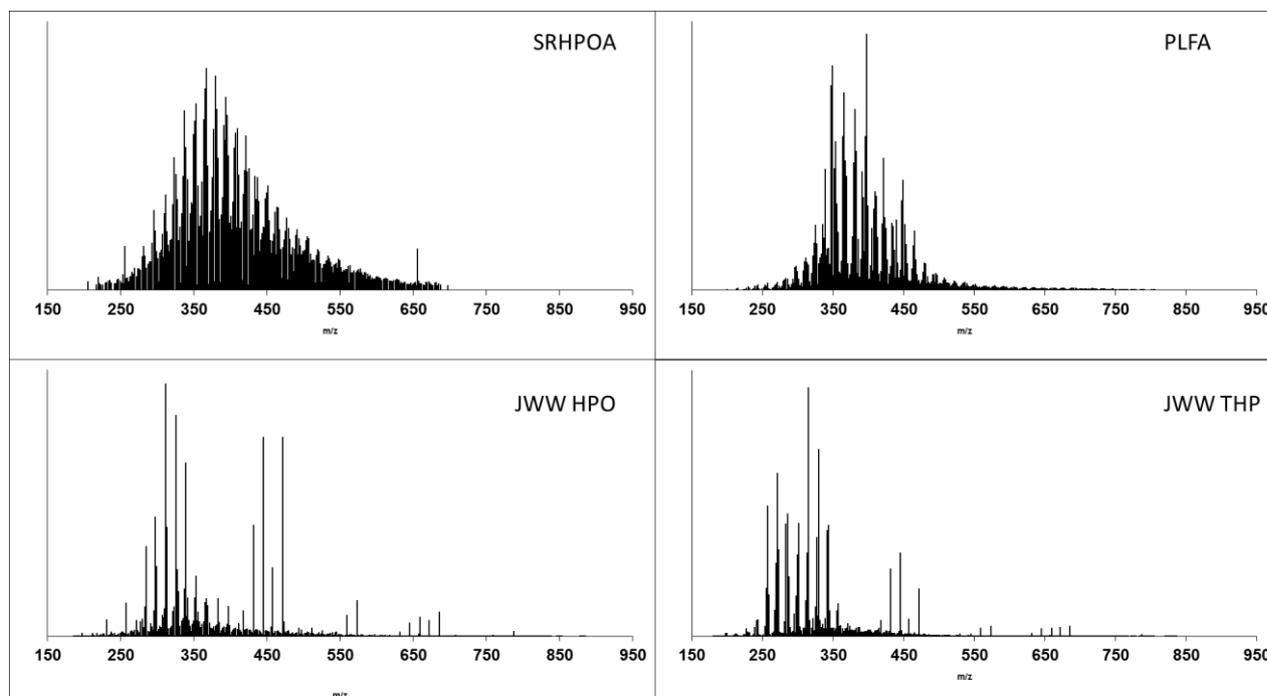


Figure 5 : Spectres de masse FT-ICR-MS négatifs des quatre extraits de MON étudiés.

Le Tableau 5 regroupe la somme des formules élémentaires assignées en quatre catégories : CHO, CHON, CHOS et CHONS, pour les quatre extraits de MOD étudiés. Comme observé sur les spectres de masse, les quatre extraits ont des caractéristiques différentes. Pour SR_HPOA, 3943 pics de masse sont obtenus, alors que les autres extraits en comportent plus de 5800, ceci laisse présumer que SR_HPOA contient moins de molécules variées que les autres extraits de MO. De plus, SR_HPOA est composé à 71,5% de fragment CHO, alors que pour les trois autres extraits la composition est plus hétérogène avec une contribution plus importante des fragments contenant de l'azote et du soufre. En effet PL_FA, JWW_HPO et JWW_TPH sont composés respectivement à 67,3 %, 58,1% et 73,9% de fragments contenant N et/ou S, contre seulement 28,5% pour SR_HPOA. Cette différence de composition peut s'expliquer par l'origine variée des extraits de MON.

	CHO	CHON	CHOS	CHONS	Total
SRHPOA	2820	835	123	165	3943
%	71,5	21,2	3,1	4,2	
PLFA	1920	2018	872	1062	5872
%	32,7	34,4	14,9	18,1	
JWW HPO	2690	1627	1351	745	6413
%	41,9	25,4	21,1	11,6	
JWW TPH	1788	2211	1252	1591	6842
%	26,1	32,3	18,3	23,5	

Tableau 5 : Somme des formules moléculaires assignées et contribution, en pourcentage, à l'ensemble des formules assignées pour chaque catégorie.

Une attribution de structure à ces formules est délicate, puisqu'une formule élémentaire pouvant représenter des millions d'isomères de constitution selon la masse, les nombres d'éléments et le nombre d'insaturation. Mais il existe une méthode de représentation des grands ensembles de données, appelée digramme de Van Krevelen, qui permet d'attribuer les formules moléculaires à des grandes classes de substances distinctes. Le diagramme de Van Krevelen est un graphique représentant le rapport atomique H/C en fonction du rapport atomique O/C des différentes formules élémentaires obtenues. Ce schéma, dont un exemple de référence est présenté sur la Figure 6 est une excellente méthode pour visualiser la nature chimique des molécules qui composent la MOD, en ce qui concerne les composés facilement ionisables. Etant donné que les molécules caractéristiques de la MOD ont des rapports H/C et O/C spécifiques, elles ont tendance à se regrouper dans des régions distinctes du diagramme.

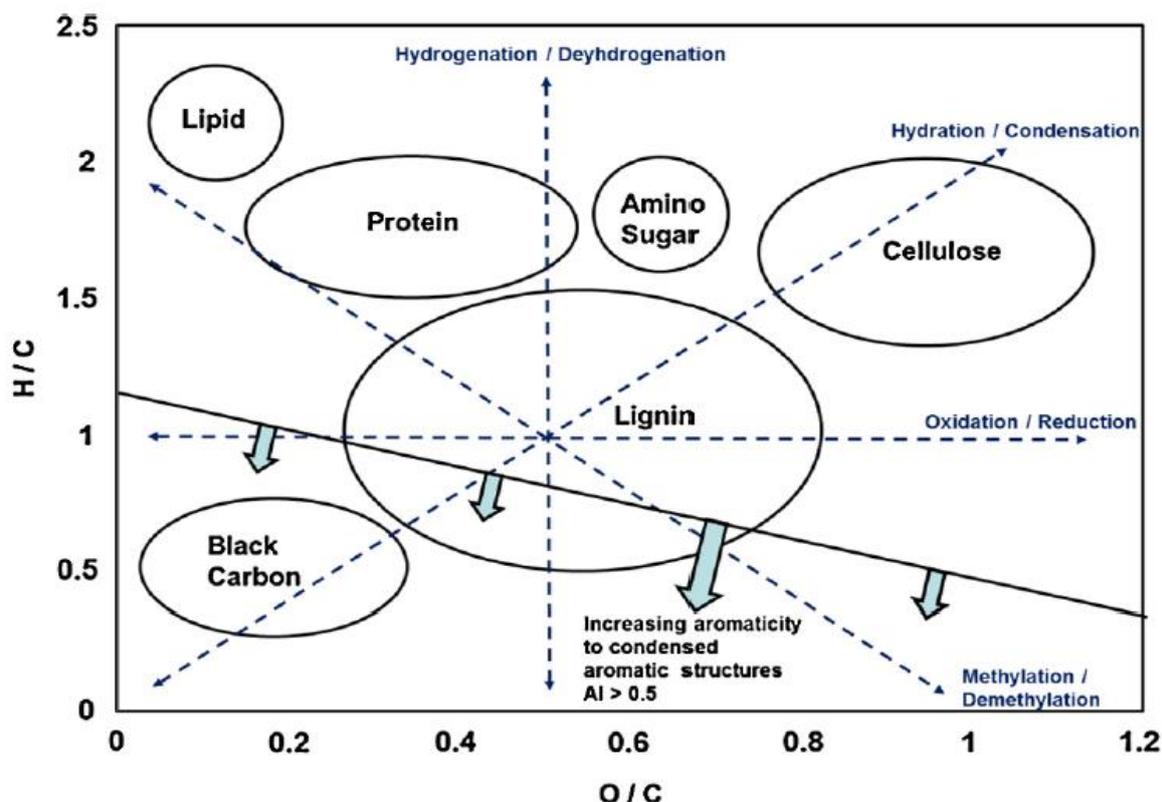


Figure 6 : Digramme type de Van Krevelen d'après D'Andrilli et al. (2013).

La Figure 7 représente les diagrammes de Van Krevelen de chacune des fractions étudiées. Chaque point des diagrammes représente une formule attribuée à un pic du spectre de masse. La distribution de ces différents points est globalement identique dans le cas des extraits SR_HPOA et PL_FA, ils sont regroupés en un groupe homogène indiquant des composés similaires, néanmoins ce groupe n'est pas centré de la même manière, SR_HPOA a pour centre les coordonnées 1 pour le rapport H/C et 0,45 pour le rapport O/C tandis que PL_FA est centré sur 1,27 pour le rapport H/C et 0,39 pour le rapport O/C. Cela montre que PL_FA a une part plus importante de protéines et une MO plus faiblement oxygénée et un degré de saturation en hydrogène plus élevé que SR_HPOA. Pour les fractions JWW la disposition des points est plus dispersée. Pour la fraction HPO, les points sont regroupés dans la région des protéines peu oxygénées. Quant à la fraction TPH, elle est plus hétérogène, les points sont répartis à la fois dans la région des fragments de lignine, des protéines et des aminoacides, et les fragments de molécules semblent plus oxydés et réduits que les molécules de la fraction HPO.

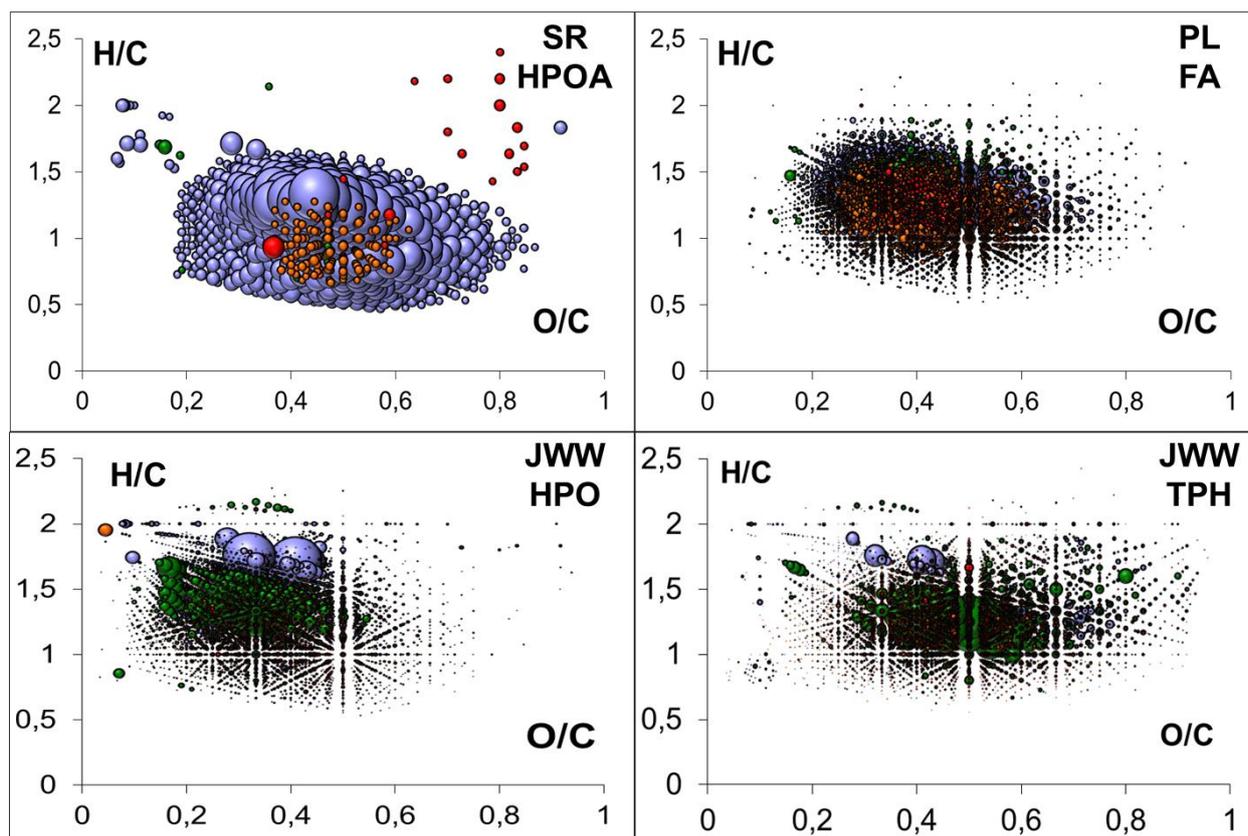


Figure 7 : Diagramme de Van Krevelen des quatre extraits de MON étudiés. Les différentes formules élémentaires étant représentées dans des couleurs différentes avec en bleu les fragments CHO, en vert CHOS, en orange CHNO et en rouge CHNOS. La surface des points reflète l'intensité relative moyenne des pics de masse.

Pour une meilleure visualisation de la localisation des différentes formules élémentaires, la Figure 8 montre la représentation des diagrammes de Van Krevelen pour chaque classe de formules élémentaires, des quatre extraits étudiés. Pour l'extrait SR_HPOA, de nouveau on observe la présence majoritaire de fragment CHO fortement aromatique, appartenant à de la lignine. Les fragments CHON appartiennent à la même catégorie. Les quelques fragments CHOS se retrouvent dans la partie lignine et protéine du diagramme. Pour PL_FA, toutes les catégories de formules élémentaires se regroupent au milieu de la région des espèces de la lignine. Cependant, chaque classe s'étend différemment depuis le centre ($H/C=1$ et $O/C=0,5$). Les fragments présents dans la région des acides aminés sont exclusivement composés de formules élémentaires CHONS alors que pour la région des protéines, on retrouve les classes de formules élémentaires CHO et CHOS. Quant à la classe CHON, elle est majoritairement présente dans la région de la lignine. Les formules élémentaires assignées aux extraits de Jeddah sont elles aussi centrées sur la région de la lignine, mais leurs distributions suivant le rapport O/C sont différentes. Pour la fraction HPO, les fragments sont regroupés dans la zone où le rapport O/C est inférieur à 0,5, alors que pour la fraction TPH, la distribution se fait de manière homogène de part et d'autre du centre du rapport O/C.

Une distribution semblable des classes de formules chimiques à celle de PL_FA est observée pour la fraction HPO. Quant à la fraction TPH, l'ensemble de classes est présent dans les régions protéine, lignine, acide aminé et cellulose.

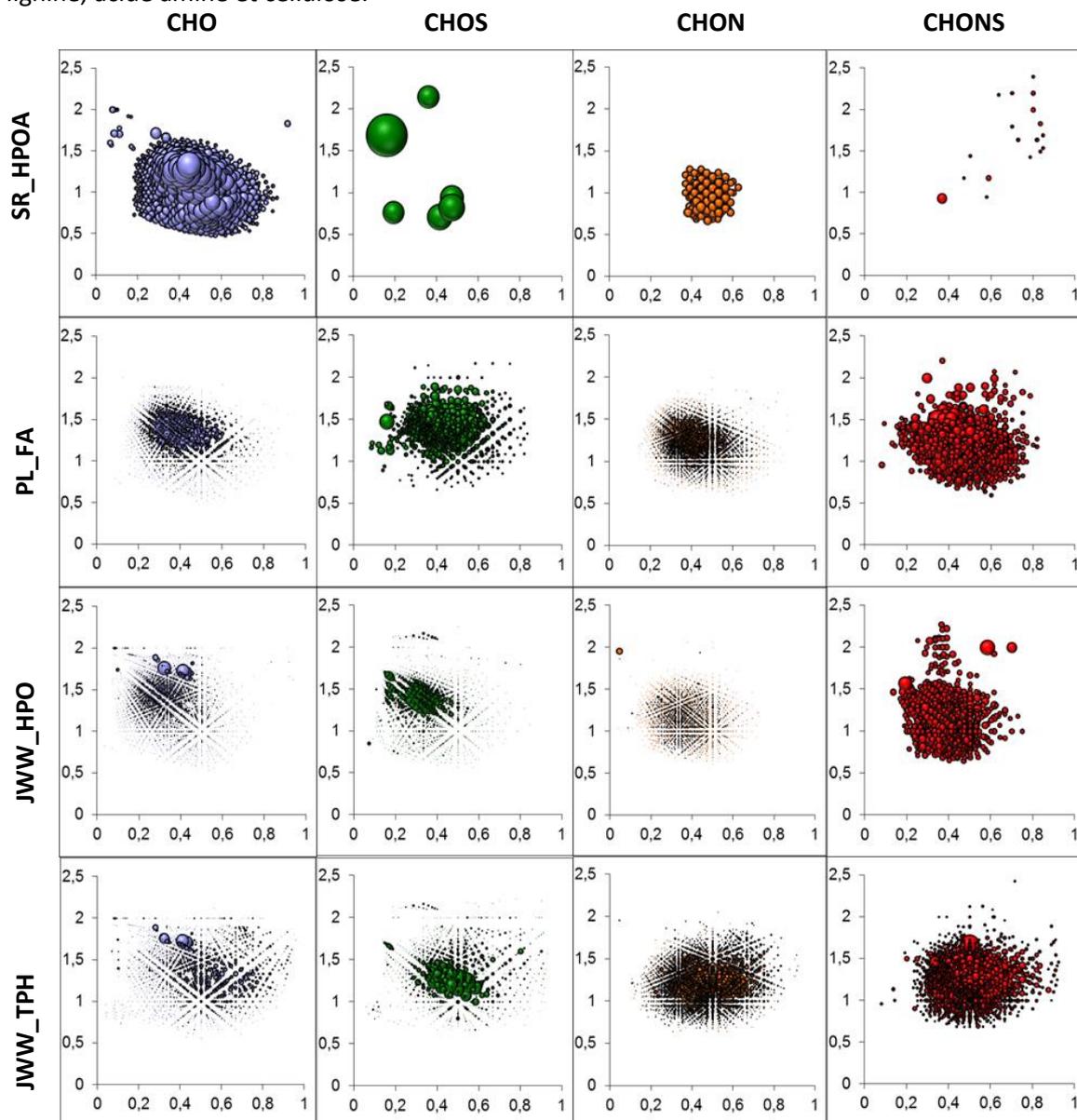


Figure 8 : Diagrammes de Van Krevelen décomposés pour, de gauche à droite, les formules élémentaires CHO (bleu), CHOS (vert), CHON (orange) et CHONS (rouge) pour les quatre extraits étudiés. La surface des points reflète l'intensité relative moyenne des pics de masse.

PL_FA et les extraits JWW sont donc composés de nombreuses classes chimiques mises en évidence sur les figures 7 et 8, avec sensiblement plus d'hétéroatomes tels que l'azote et le soufre issus de protéines et d'acides aminés ainsi qu'un plus grand nombre d'espèces aromatiques plus condensées que pour SR_HPOA.

4. Détermination des groupements thiols

Dans le but d'avoir une idée plus précise de la nature et de la concentration des groupements complexants présents dans les extraits, leur concentration en groupements thiols a été déterminée. Pour cela une quantité croissante (allant jusqu'à $70 \mu\text{mol.L}^{-1}$) du réactif qBBr a été ajoutée aux solutions contenant entre 78 et 162 mg.L^{-1} d'extrait de MO. La Figure 9 montre la détermination (voir détail chapitre II) de la concentration en groupements R-SH pour les quatre extraits.

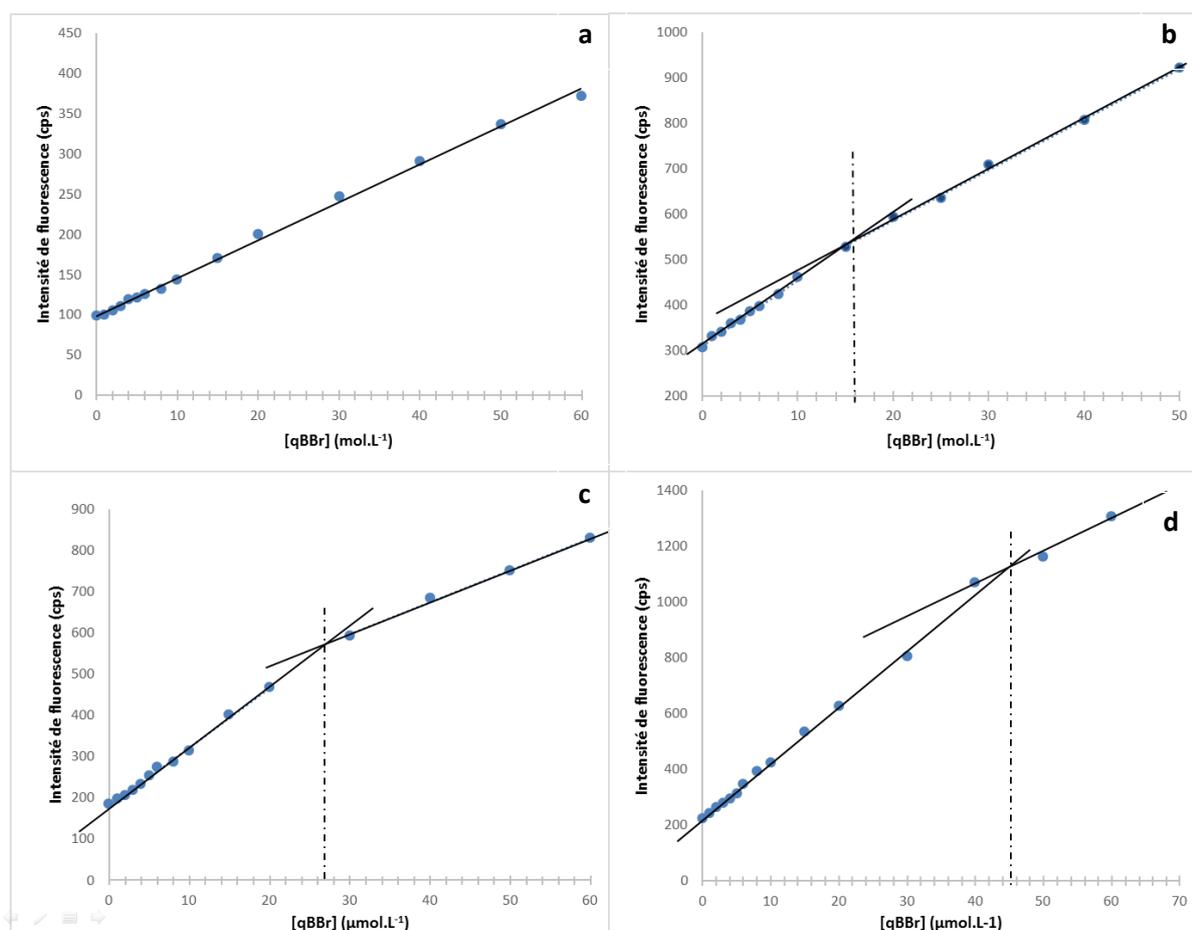


Figure 9 : Détermination de la concentration en groupement R-SH pour (a) SR_HPOA 170 mg.L^{-1} (b) PL_FA 78 mg.L^{-1} (c) JWW_HPO 162 mg.L^{-1} et (d) JWW_TPH 128 mg.L^{-1} .

Comme attendu, en raison de la faible concentration en composés soufrés dans SR_HPOA, aucun groupement R-SH n'a pu être quantifié. PL_FA est l'extrait qui contient le plus de groupement R-SH avec une concentration de $0,41 \mu\text{mol.mg}^{-1}$, ce qui représente 6 fois plus de R-SH qu'un extrait de MO qui en contient en moyenne $0,063 \mu\text{mol.mg}^{-1}$. Pour les fractions JWW, l'extrait TPH contient $0,21 \mu\text{mol.mg}^{-1}$ de groupement R-SH alors que l'extrait HPO contient $0,28 \mu\text{mol.mg}^{-1}$.

Ces extraits pourraient alors contenir jusqu'à 41% pour PL_FA et 27% pour les extraits JWW de leur soufre sous formes de groupements thiols. Ces résultats sont en accord avec la littérature, qui dit que entre 1 et 46% du soufre de la MO est sous forme de thiol (Catrouillet 2015).

Cette étude a permis au travers des différentes analyses et techniques employées de mettre en évidence les différences de nature et de composition chimique des quatre extraits étudiés. SR_HPOA, où la MOD est constituée principalement de substances humiques d'origine terrestre, présentant un caractère aromatique marqué et composées principalement de carbone, oxygène et hydrogène. L'extrait PL_FA est lui aussi constitué de substances humiques, mais contrairement à SR_HPOA cette MO est moins dégradée et contient une part de MO issue de l'activité microbienne dont les molécules chimiques sont composées d'un plus grand nombre d'hétéroatomes azotés et soufrés. Cette fraction d'hétéroatome supplémentaire s'exprime par une très forte concentration en groupements thiols. La différence d'origine de la MO des extraits JWW, s'observe par une fluorescence plus complexe que celle des extraits d'eau de surface. Des structures de type substances humiques sont présentes dans ces extraits, mais la part de substances organiques d'origine microbienne est cette fois bien plus élevée. Comme pour PL_FA, la MO de ces extraits est riche en azotes et en soufres, qui proviennent de molécules de types protéiniques, acides aminés ou de cellulose. Ces différences de structure chimique laissent présagées une complexation des métaux différente due à la nature et la concentration variées des sites de complexations.

II. Suivi de la complexation métallique

L'objectif de cette étude est de présenter les résultats relatifs à la complexation de différents cations métalliques d'intérêt environnemental avec les fractions de MOD qui ont été caractérisées dans la partie précédente. Le même protocole que le chapitre précédent a été appliqué. Les constantes de formation obtenues dans cette partie sont dites conditionnelles car uniquement valides pour des conditions physicochimiques particulières (pH=6,8, force ionique 10^{-3} mol.L⁻¹ KNO₃). Ces constantes ont été déterminées pour l'ensemble des composantes PARAFAC déterminées précédemment.

1. Fractions Suwannee River et Pony Lake

Pour cette catégorie d'extraits, les suivis de complexation ont été réalisés avec trois cations métalliques, Cu(II), Pb(II) et Zn(II). Les dosages ont été effectués en duplicat à pH = 6,8 (constant) et pour une gamme de concentration en cation métallique allant de 0 à 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

D'une manière générale, aucune modification significative des propriétés de fluorescence, n'a été relevée pour les trois composantes, lors de la complexation de Zn(II) par les deux extraits. Cette absence de modification spectrale a déjà été observée pour des extraits de Suwannee River (Constantino et al. 2017) mais aussi pour de la MO provenant de sols (Dudal et al. 2006). Il est donc impossible de suivre la complexation de Zn(II), si elle existe, par spectroscopie de fluorescence. Dans le cas de Cu(II) et Pb(II), on observe que toutes les composantes ne sont pas affectées lors de l'ajout des sels métalliques. En effet la composante C₃, ne réagit pas de manière significative lors de l'ajout de Cu(II) et de Pb(II). McIntyre et al. (2013) avaient fait cette même observation pour la composante attribuée aux protéines de la MO provenant des acides fulviques de la Suwannee River et de Pony Lake. Seules les composantes C₁ et C₂ de SR_HPOA et PL_FA subissent une diminution de leur fluorescence lors de l'ajout de Cu(II) et Pb(II). Les courbes d'extinction de fluorescence normalisées ainsi que la modélisation au moyen de l'équation de Ryan et Weber sont représentées sur la Figure 10 et 11 pour respectivement SR_HPOA et PL_FA.

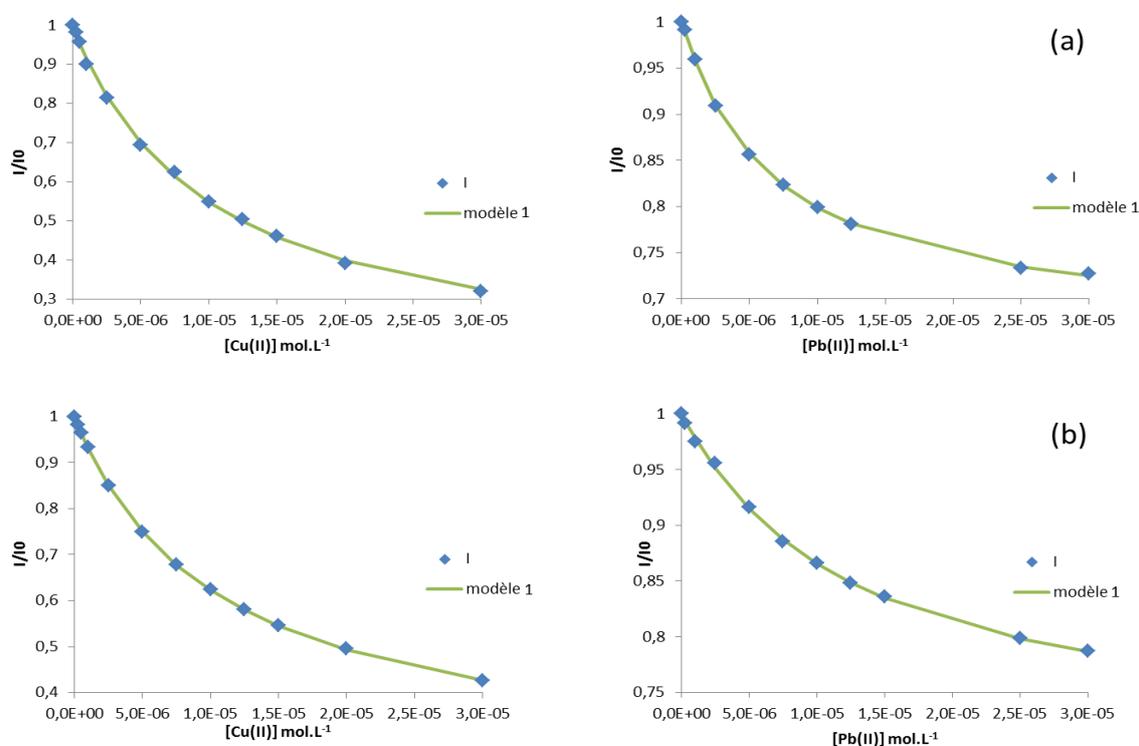


Figure 10 : Courbes d'extinction de fluorescence des composante C₁ (a) et C₂ (b) de l'extrait de MO SR_HPOA après ajout de Cu(II) ou Pb(II) métallique. Symbole : expérience, ligne continue : modélisation.

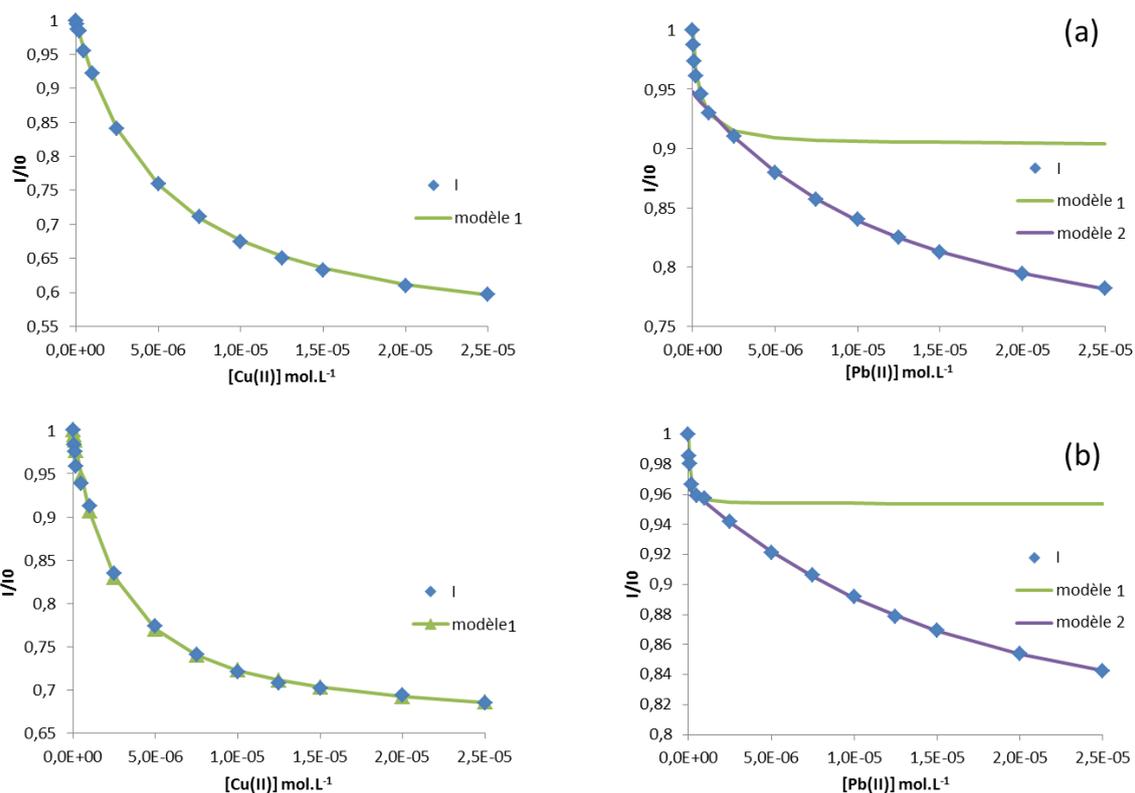


Figure 11 : Courbes d'extinction de fluorescence des composante C₁ (a) et C₂ (b) de l'extrait de MO PL_FA après ajout de Cu(II) ou Pb(II) métallique. Symbole : expérience, ligne continue : modélisation.

Les deux composantes C₁ et C₂ ont le même comportement lors de l'ajout de Cu(II) et de Pb(II). Dans le cas de SR_HPOA, on observe une forte diminution (70%) de ces composantes lors de l'ajout de Cu(II) et une diminution plus faible (~25%) lors de l'ajout de Pb(II). De plus pour cet extrait, la décroissance de fluorescence a pu être modélisée en utilisant une seule équation de Ryan et Weber, indiquant l'implication d'une seule catégorie de sites dans la complexation. Pour PL_FA, l'ajout de Cu(II) induit une décroissance de la fluorescence (40%) plus importante que lors de l'ajout de Pb(II) (entre 15 et 30%). Dans le cas de cet extrait, une seule catégorie de sites est impliquée lors de la complexation de Cu(II), alors que deux catégories de sites sont impliquées lors de la complexation avec Pb(II) puisque deux optimisations ont été nécessaires pour modéliser l'extinction de fluorescence.

A partir de l'équation de Ryan et Weber, les constantes apparentes de complexation ont été calculées et sont regroupées dans le Tableau 6.

		Cu(II)		Pb(II)	
		C ₁	C ₂	C ₁	C ₂
SR_HPOA	Log K ₁	5,02	4,98	5,18	5,00
PL_FA	Log K ₁	5,33	5,64	6,48	7,18
	Log K ₂	/	/	4,99	5,06

Tableau 6 : Récapitulatif des constantes de formation apparentes obtenues lors de la complexation de Cu(II) et Pb(II) avec les extraits de MO SR_HPOA et PL_FA.

Les constantes obtenues pour la complexation de SR_HPOA et PL_FA avec Cu(II) sont du même ordre de grandeur que celles reportées dans la littérature pour des conditions similaires à celle de cette étude. McIntyre and Gueguen (2013) ont obtenu pour SR_HPOA et PL_FA les constantes suivantes : pour C₁ $\text{Log}K_{1\text{SR_HPOA}} = 5,06$ et $\text{Log}K_{1\text{PL_FA}} = 5,44$ et pour C₂ $\text{Log}K_{1\text{SR_HPOA}} = 4,97$ et $\text{Log}K_{1\text{PL_FA}} = 5,30$. De plus ils n'ont observé aucune modification de fluorescence pour C₃. Ceci valide les conditions expérimentales ainsi que la méthode utilisée pour estimer la valeur des constantes. Quels que soient le cation métallique et la composante, les constantes obtenues pour PL_FA sont systématiquement supérieures à celles obtenues pour SR_HPOA. On constate également que Pb(II) est plus facilement complexé que Cu(II) par les deux extraits. Néanmoins, cette différence est moins importante dans le cas de l'extrait SR_HPOA ($\Delta\text{Log} K = 0,16$ pour C₁) que de PL_FA ($\Delta\text{Log} K = 1,54$ pour C₁). On peut également noter qu'une composante qui est constituée d'une même catégorie de sites, n'a pas la même affinité pour un métal donné, puisque quel que soit le cation métallique c'est C₁ pour SR_HPOA et C₂ pour PL_FA qui contient la catégorie de sites qui a le plus fort pouvoir complexant.

2. Fractions de Jeddah

Pour cette catégorie d'extrait, les suivis de complexation ont été réalisés cette fois avec quatre cations métalliques, Cu(II), Pb(II), Ni(II) et Zn(II). Les dosages ont été effectués en duplicat à pH=6,8 et pour une gamme de concentration des cations allant de 0 à 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

D'une manière générale, pour les différents types de fraction et de métal ajouté, les courbes $I/I_0=f([M^{2+}])$ présentent une allure très variable. Toutes les composantes de ces extraits ont été affectées par l'ajout des cations métallique. L'intensité de fluorescence a subit une augmentation ou une diminution, et dans la majorité des cas deux catégories de sites sont impliqués dans les réactions de complexation. L'évolution de la fluorescence est détaillée ci-après pour chacune des quatre composantes.

- Composante 1

Pour la composante C_1 , dont les suivis et les modélisations des dosages sont présentés sur la Figure 12, on peut remarquer que les deux fractions ne réagissent pas de la même manière. Pour la fraction HPO, quel que soit le cation métallique ajouté la composante 1 diminue et deux catégories de sites sont impliquées dans la complexation. Pour la fraction TPH, seuls trois des quatre cations métalliques (Cu(II), Pb(II) et Ni(II)) entraînent une diminution de la fluorescence de cette composante. Dans le cas de Cu(II), une seule catégorie de sites est impliquée dans la complexation alors que pour Pb(II) et Ni(II) deux catégories de sites interviennent successivement lors de la complexation. La fluorescence de cette fraction n'est nullement affectée par l'ajout de Zn(II).

- Composante 2

Pour la composante C_2 , dont les décroissances sont présentées sur la Figure 13, une diminution de la fluorescence est observée quel que soit le cation métallique pour les deux fractions. Pour la fraction HPO deux catégories de sites sont impliquées dans la complexation, alors que pour TPH une seule catégorie de sites est mise en jeu lors de la complexation avec Cu(II) et Zn(II) et deux catégories avec Pb(II) et Ni(II).

- Composante 3

Cette composante subie de manière globale une augmentation de fluorescence lors de l'ajout des différents cations métallique, ces augmentations sont présentées sur la Figure 14. Pour la fraction HPO, tous les cations métalliques réagissent avec la MOD de cette composante. La complexation avec Cu(II) et Pb(II) implique deux catégories de sites alors que la complexation avec Ni(II) et Zn(II) implique seulement une catégorie de sites. Pour la fraction TPH, une modification de la fluorescence est observée pour trois cations métalliques. Dans le cas de l'ajout de Cu(II) ou de Ni(II), une augmentation de la fluorescence est observée et une seule catégorie de sites est mise en jeu. Lors de l'ajout de Pb(II), l'évolution de la fluorescence se fait en deux temps, impliquant deux catégories de sites de complexation, la fluorescence augmente dans un premier temps jusqu'à saturation de la première catégorie de sites, puis elle diminue lorsque la seconde catégorie de sites est impliquée.

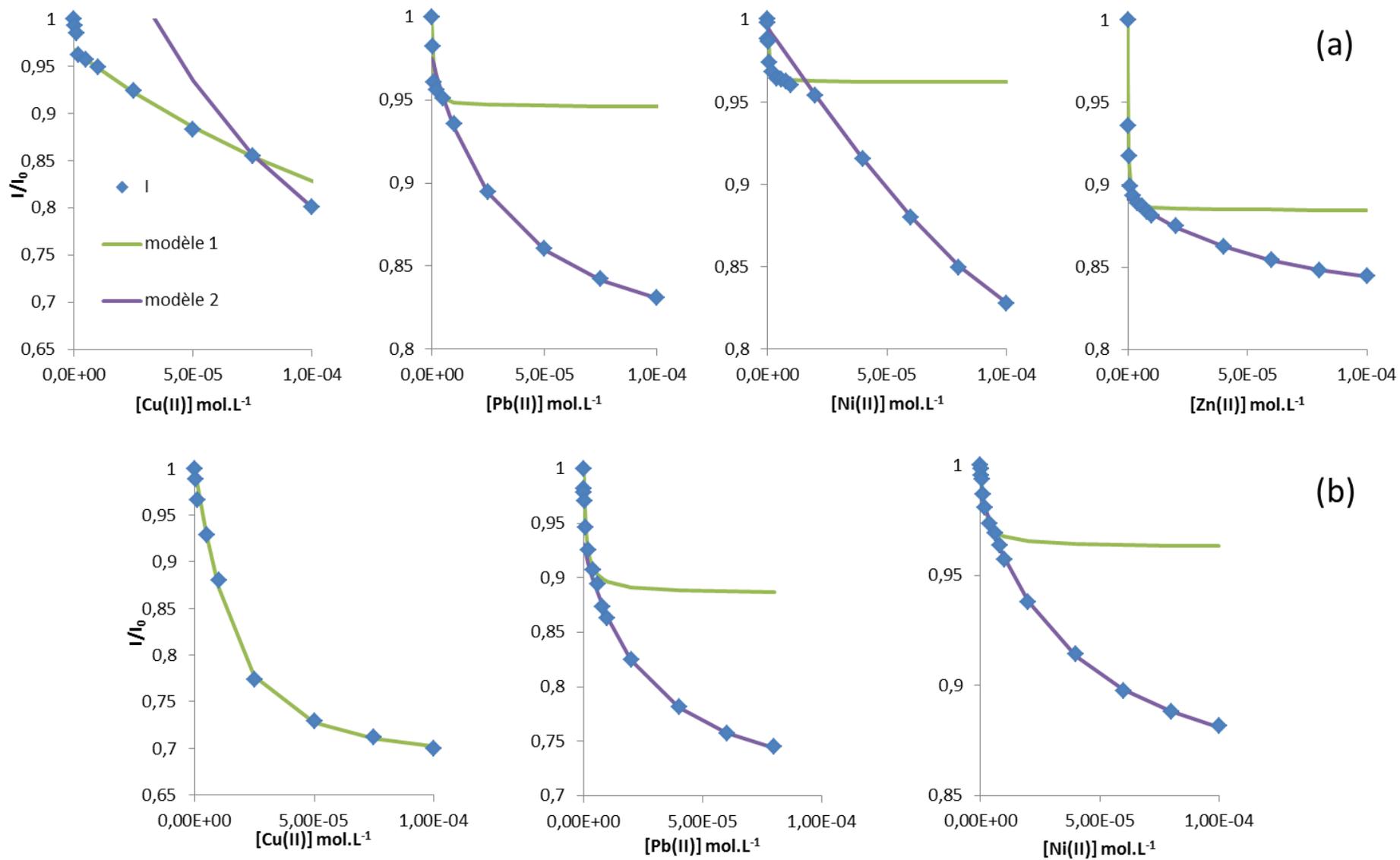


Figure 12 : Courbes d'extinction de fluorescence de C_1 des extraits de MO JWW_HPO (a) et JWW_TPH (b) après ajout de Cu(II), Pb(II), Ni(II) ou Zn(II). Symbole : expérience, ligne continue : modélisation.

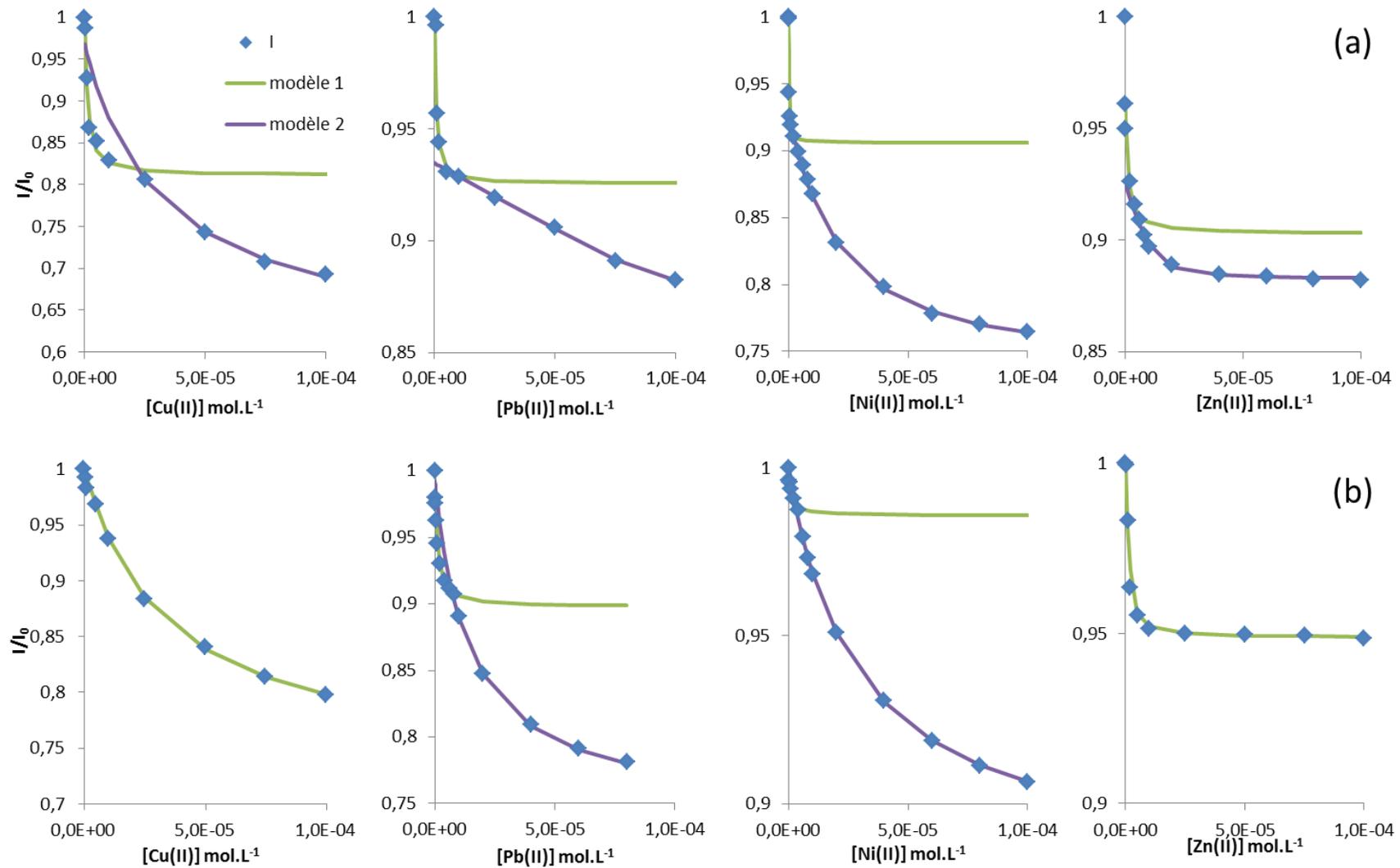


Figure 13 : Courbes d'extinction de fluorescence de C_2 des extraits de MO JWW_HPO (a) et JWW_TPH (b) après ajout de Cu(II), Pb(II), Ni(II) ou Zn(II). Symbole : expérience, ligne continue : modélisation.

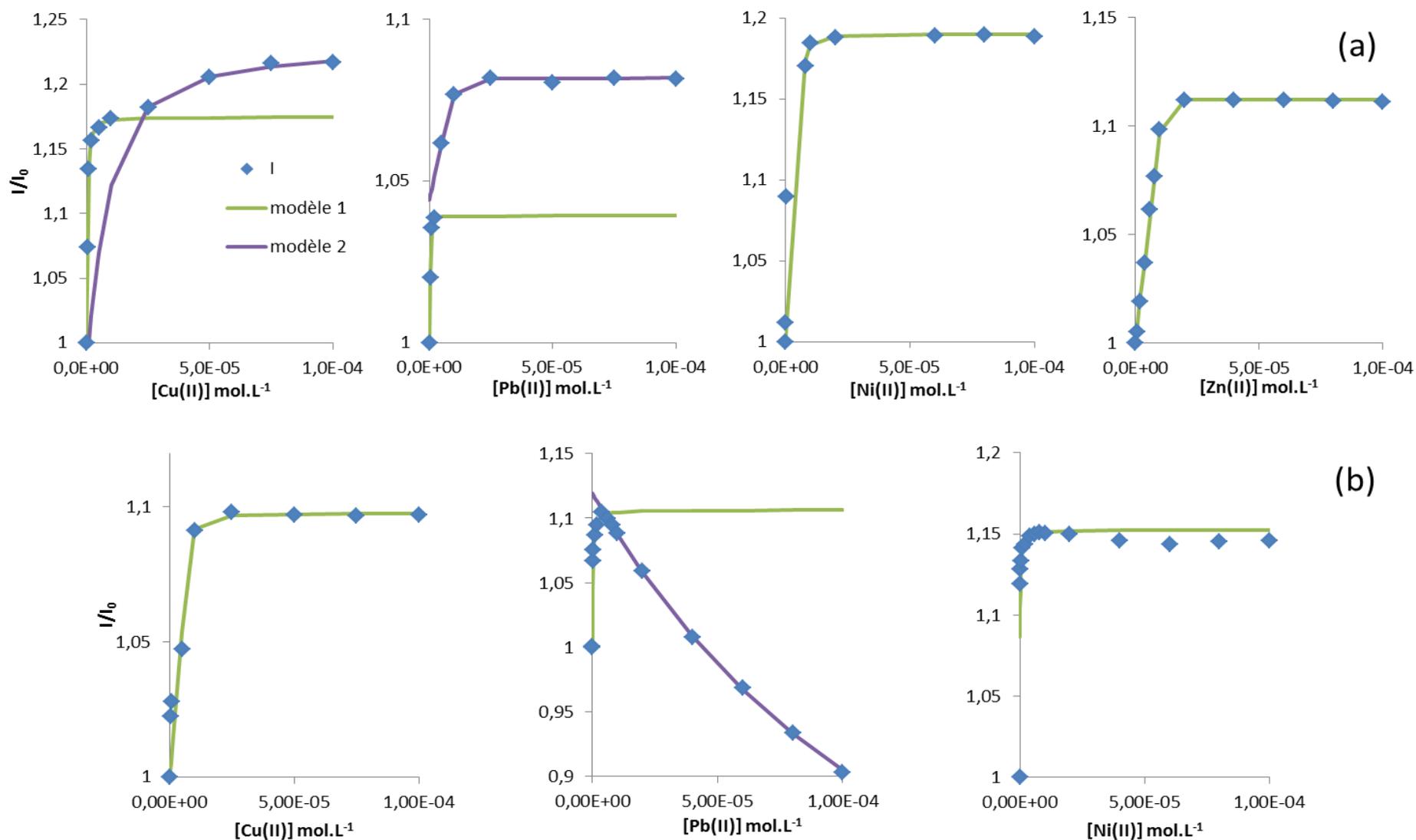


Figure 14 : Courbes d'extinction ou d'augmentation de fluorescence de C₃ des extraits de MO JWW_HPO (a) et JWW_TPH (b) après ajout de Cu(II), Pb(II), Ni(II) ou Zn(II).
Symbole : expérience, ligne continue : modélisation.

- Composante 4

Pour cette composante, dont les évolutions sont présentées sur la Figure 15, l'allure des courbes dépend de la fraction étudiée. Pour la fraction HPO, trois cations métalliques interagissent avec la MOD. Pour Cu(II) et Pb(II), l'intensité de fluorescence augmente puis diminue, alors que pour Ni(II) l'intensité de fluorescence diminue. De plus, pour cette fraction deux catégories de sites interviennent dans la complexation. Pour la fraction TPH, les quatre cations métalliques sont impliqués dans la complexation de la MOD. Pour Cu(II), Ni(II) et Zn(II) l'intensité de fluorescence diminue et deux catégories de sites sont impliquées, alors que pour Pb(II), la fluorescence augmente puis la fluorescence diminue fortement. Cependant, le faible nombre de points n'a pas rendu possible la modélisation de la croissance de la fluorescence. De nouveau Zn(II) a un comportement particulier puisqu'il ne se complexe pas avec la MOD de la fraction HPO, mais réagit avec la fraction TPH.

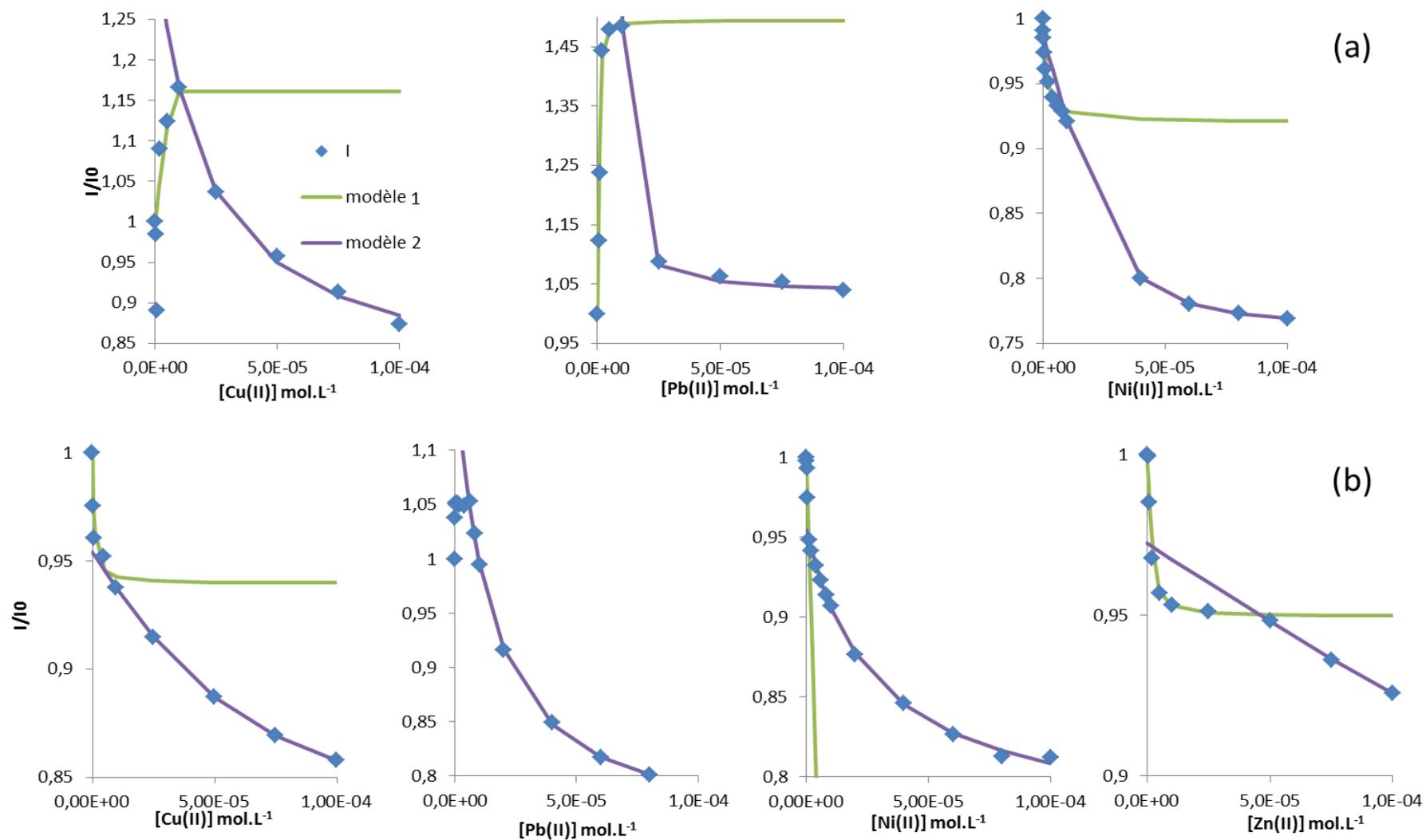


Figure 15 : Courbes d'extinction ou d'augmentation de fluorescence de C4 des extraits de MO JWW_HPO (a) et JWW_TPH (b) après ajout de Cu(II), Pb(II), Ni(II) ou Zn(II).
Symbole : expérience, ligne continue : modélisation.

Le Tableau 7 regroupe l'ensemble des constantes de formation (log K) calculées pour les deux fractions de MO JWW. D'une manière générale, on peut remarquer que les valeurs de la constante de formation K_1 des complexes obtenus s'étendent sur une gamme très étendue, avec des écarts entre les valeurs extrêmes qui sont supérieures à 10^8 . Ceci démontre des comportements de complexation très différents pour deux fractions de MO issue de la même source. Toutes les composantes n'ont pas deux catégories de sites impliquées dans la complexation et comme attendu la deuxième catégorie de sites à une constante de formation plus faible que celle de la première catégorie de sites. On peut noter que C_3 est la composante pour laquelle les constantes de formation sont en moyenne les plus élevées.

		Cu(II)				Pb(II)				Zn(II)				Ni(II)			
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
JWW HPO	log K ₁	3,64	6,09	6,90	10,00	6,30	6,39	7,78	7,08	6,84	6,06	11,27	/	6,57	6,87	7,02	6,00
	log K ₂	4,37	4,13	5,32	4,48	4,58	5,74	6,84	5,76	4,30	5,70	/	/	4,44	4,79	/	5,26
JWW TPH	log K ₁	5,17	4,48	6,95	6,32	5,99	6,08	6,81	FM	/	6,26	/	6,25	5,89	6,01	6,69	12,39
	log K ₂	/	/	/	4,51	4,58	4,68	4,00	4,82	/	/	/	4,36	4,34	4,54	/	4,30

Tableau 7 : Constantes de formation (log K) calculées pour les différentes composantes des extraits de MO JWW. (La constante K_1 la plus élevée des deux fractions obtenue pour chaque composante est en rouge)

De manière générale, on observe dans ce tableau que la fraction HPO est souvent plus complexante que la fraction TPH pour la première constante calculée.

Afin de faciliter les comparaisons, les classements des pouvoirs complexant des métaux vis-à-vis des quatre composantes, pour chacune des fractions, sont regroupés dans le Tableau 8. De nouveau des différences apparaissent entre les deux fractions étudiées. D'une manière générale, les classements obtenus pour la première catégorie de sites est différent de celui de la deuxième catégorie de sites quelle que soit la fraction. De plus une comparaison pour la deuxième catégorie de sites reste délicate puisque tous les dosages n'impliquent pas une seconde catégorie. Cependant, on peut remarquer que C_3 est la composante qui a le moins de seconde catégorie de sites engagé dans la complexation et que pour les deux fractions, le deuxième ensemble de sites à une forte affinité pour le plomb, quelle que soit la composante.

	K₁ HPO	K₁ TPH	K₂ HPO	K₂ TPH
C₁	Cu(II) << Pb(II) < Ni(II) < Zn(II)	Cu(II) < Ni(II) < Pb(II)	Zn(II) < Ni(II) < Pb(II)	Ni(II) < Pb(II)
C₂	Zn(II) ~ Cu(II) < Pb(II) < Ni(II)	Cu(II) < Ni(II) < Pb(II) < Zn(II)	Cu(II) < Ni(II) < Zn(II) ~ Pb(II)	Ni(II) < Pb(II)
C₃	Cu(II) < Ni(II) < Pb(II) < Zn(II)	Ni(II) < Pb(II) < Cu(II)	Cu(II) < Pb(II)	Pb(II)
C₄	Ni(II) < Pb(II) < Cu(II)	Zn(II) < Cu(II) << Ni(II)	Cu(II) < Ni(II) < Pb(II)	Ni(II) < Zn(II) < Cu(II) < Pb(II)

Tableau 8: Récapitulatif des classements d'affinité des cations métallique pour chaque composante des deux extraits de MO JWW.

Pour la fraction HPO, l'ordre des pouvoirs complexants des cations métalliques est très hétérogène pour les quatre composantes, mais une tendance se dégage, avec Cu(II) qui est l'un des cations présentant le moins d'affinité avec les fluorophores de C₁, C₂, et C₃ alors qu'il a au contraire le plus d'affinité avec ceux de C₄, pour la première catégorie de sites. Quant à la seconde catégorie de sites, Pb(II) est le mieux complexé et Cu(II) le moins, quelle que soit la composante. On peut donc dire que Cu(II), Pb(II) et Zn(II) ont des comportements plus marqués tandis que Ni(II) présente des différences moins marqué vis-à-vis des deux extraits.

La fraction TPH a des composantes dont les propriétés de complexation sont très disparates, pour chaque composante le métal qui a la meilleure affinité est différent. Les composantes C₁ et C₂ ont chacune indépendamment le même classe du pouvoir complexant pour la première et la seconde catégorie de sites. De plus, TPH a moins de seconde catégorie de sites impliqués dans la complexation que la fraction HPO, ce qui laisse penser que la première catégorie de sites est présente en plus grande concentration dans la fraction TPH.

Ces deux fractions de MO provenant de la même source ont des propriétés de complexation très différentes. Ce résultat peut s'expliquer en partie, comme nous l'avons vu au travers des résultats de FT-ICR-MS, par une composition chimique différente et donc par des sites complexants différents et dont les concentrations peuvent varier d'un extrait à l'autre. Mais ces deux fractions ont d'une manière générale des constantes de formation très grandes et toutes leurs composantes sont impliquées.

III. Discussion

Dans cette partie, une comparaison sera faite dans un premier temps entre les différents extraits étudiés dans ce chapitre, afin de mettre en évidence les différents comportements qu'il peut y avoir entre de la MO issue de milieu naturel et d'un milieu anthropique. Puis dans une seconde partie, la complexation de la MOD issue d'eaux naturelles sera comparée à celle des extraits de MO.

1. Comparaison extraits eaux de surface / eaux usées

Les extraits SR_HPOA et PL_FA sont issus de matière organique naturelle (MON) et les échantillons JWW sont quant à eux issus de matière organique anthropique (MOA). Ces quatre extraits qui ont trois composantes PARAFAC en commun, n'ont pas le même comportement de complexation vis-à-vis des cations métalliques étudiés. Seules les propriétés de complexation des composantes C₁ et C₂, lors de l'ajout de Cu(II) et de Pb(II) peuvent être comparées, puisque aucune modification de la fluorescence n'est observée pour le composante C₃ ainsi que lors de l'ajout de Zn(II) pour les MON. Le Tableau 9, répertorie le classement d'affinité et les constantes de formation obtenus par cation et par composante.

	C ₁	C ₂
Cu(II)	JWW_HPO (3,64) < SR_HPOA (5,02) < JWW_TPH (5,17) < PL_FA (5,33)	JWW_TPH (4,48) < SR_HPOA(4,98) < PL_FA (5,64) < JWW_HPO (6,09)
Pb(II)	SR_HPOA(5,18) < JWW_TPH (5,90) < JWW_HPO (6,03) < PL_FA (6,48)	SR_HPOA (5) < JWW_TPH (6,08) < JWW_HPO (6,39) < PL_FA (7,18)

Tableau 9 : Classement d'affinité par métal des extraits de MO pour les composantes C₁ et C₂.

Au travers de ces classements, on remarque que l'affinité pour Cu(II) est dépendante de la composante, contrairement à Pb(II) où les classements sont identiques pour les deux composantes. Les constantes obtenues ont des ordres de grandeur très différents, de l'ordre de 50 pour Cu(II) et jusqu'à 150 pour le Pb(II). Ces composantes communes à la MON et à la MOA, qui proviennent de substances humiques, montrent que la MOA issue des eaux usées a des propriétés de complexation intermédiaires pour Pb(II). En effet les constantes de formation sont comprises entre celles de la SR_HPOA, MON classique d'origine végétale, et celle de PL_FA, dont la MON est d'origine autochtone issue d'une forte activité biologique.

Cependant, la composante associée aux substances du type protéinique (C₃) de la MOA est un très bon ligand pour la complexation de l'ensemble des cations métalliques étudiés contrairement à la composante de la MON. Ces deux composantes du type protéinique (C₃) ont donc une signature

spectrale proche mais une composition chimique différente. A cela s'ajoute les fortes valeurs des constantes obtenues pour la composante supplémentaire C_4 . Les données présentées ici montrent donc que malgré une capacité complexante intermédiaire des deux premières composantes C_1 et C_2 , les propriétés complexantes de C_3 et C_4 de la MOA résultent d'une capacité complexante globale considérablement accrue comparé à la MON. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans d'autres études similaires (Van Veen et al. 2002, Sarathy et al. 2005, Chaminda et al. 2010). Les rejets d'eaux usées dans le milieu naturel peuvent donc impacter la spéciation des métaux. De plus, la MOA contient une catégorie de ligand avec une affinité pour Zn(II) qui est sensiblement supérieure à celle des ligands dérivés de sources naturelles. On peut donc émettre l'hypothèse qu'une MO issue d'un milieu naturel qui subit de fortes pressions anthropiques va être une source potentiel de ligand complexant Zn(II).

Ces différences de complexation sont dues aux sites complexant qui ont une composition chimique, une nature et des concentrations différentes. La présence d'un plus grand nombre d'hétéroatomes comme le soufre ou l'azote peut être à l'origine de ces différences. Sarathy and Allen (2005) ont proposé que les différences de la complexation du cuivre observées entre une eau de rivière et celle d'un effluent, soient attribuables à la présence de soufre. Dans notre cas, comme on peut le voir sur la Figure 16 pour la complexation de C_1 et C_2 avec Pb(II), on obtient une très bonne corrélation entre la concentration en groupement R-SH et la valeur des constantes. Cette corrélation est uniquement observée dans le cas de la complexation de Pb(II), aucune autre corrélation de ce type n'a pu être obtenue avec Zn(II), Cu(II) ou encore Ni(II).

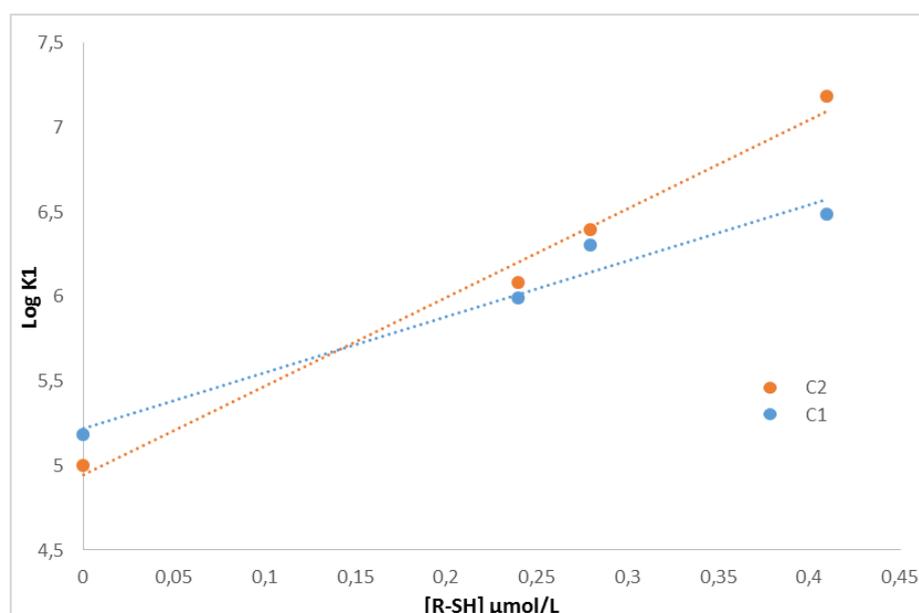


Figure 16 : Représentation des constantes de formation de C_1 et C_2 lors la chélation de Pb(II) en fonction de la concentration en groupement thiol des différents échantillons de MO.

D'autres études ont aussi démontré l'impact de la présence de groupement azoté sur les propriétés de complexation (Reuter et al. 1977, Croue et al. 2003, Ravichandran 2004, Atalay et al. 2013)

2. Comparaison eaux de surface non extraites / extraites

La comparaison entre la complexation de la MO des eaux prélevées sur site et celle des extraits est assez délicate pour plusieurs raisons. La première est que la MOD de la Marque et de Germignies n'a pas été extraite ni fractionnée. La complexation entre la MOD et les métaux peut alors être en compétition avec les colloïdes dissous ou d'autres ions tels que les anions, chlorures ou sulfates. La deuxième raison est que les fluorophores de la MO de la Marque et de Germignies sont différents de ceux présents dans la MO des extraits, à l'exception de la composante C₁ qui est commune aux deux études. Une comparaison des propriétés complexantes est alors possible et les classements d'affinité ainsi que les constantes de formation obtenues pour les différents cations métalliques sont reportés dans le Tableau 10.

Cu(II)	JWW_HPO (3,64) < SR_HPOA (5,02) < JWW_TPH (5,17) < PL_FA (5,33) < GE04 (5,96) < LM3 (6,36)
Pb(II)	LM3 (4,97) < SR_HPOA (5,18) < GE04 (5,69) < JWW_TPH (5,99) < JWW_HPO (6,30) < PL_FA (6,48)
Zn(II)	LM3(5,03) < GE04 (6,35) < JWW_HPO (6,84)

Tableau 10 : Classement d'affinité par métal de l'ensemble des MO étudié pour la composante commune C₁ (type C).

De nouveau on observe que la chélation de ces éléments métalliques est complexe. Les constantes de formation obtenues sont très disparates par exemple pour Cu(II) un facteur 525 est observé. La MOD non fractionnée apparaît plus complexante pour Cu(II) et un peu moins pour Pb(II) que la MO des extraits. Il apparaît en outre que les propriétés complexantes entre la MO et Pb(II) pourraient être liées à la concentration en groupement R-SH, puisque que les deux MO les moins complexantes sont celles qui ne contiennent pas de R-SH (LM3 et SR_HPOA).

La complexation de C₁ et C₃ avec le Zn(II) laisse penser, que la Marque et Germignies sont impactés par des apports de MO anthropogénique. Les valeurs des constantes étant plus faibles que celles obtenues pour les extraits JWW, cela suggère que les molécules anthropiques responsables de cette complexation sont présentes en quantité plus faible que dans les eaux usées.

Conclusion

Dans ce chapitre, la caractérisation des quatre extraits de MO d'origines différentes réalisée par diverses techniques analytiques a mis en évidence une composition très hétérogène de ces extraits. L'analyse élémentaire ainsi que les calculs des indices spectroscopiques confirment l'origine des extraits et la nature plus aromatique des extraits de MO issus des eaux de surfaces. L'analyse de fluorescence 3D couplée à la modélisation PARAFAC montre que ces extraits de MO sont composés d'un mélange de substances humiques et protéiniques qui présentent une signature spectrale semblable. Cependant, cette information est incomplète puisque les résultats de FT-ICR-MS mettent en évidence des extraits de MO complexes et hétérogènes qui possèdent une diversité moléculaire importante. Les extraits PL_FA et JWW sont composés de plus d'hétéroatomes (azote et soufre) que la fraction de référence SR_HOPA. Cette observation est confirmée par la détermination des groupements thiols présents dans ces extraits. La fluorescence permet donc d'obtenir qu'une information partielle, car même s'ils sont en concentrations faibles, cette spectroscopie ne permet pas de mettre en évidence la présence de fonctions souffrées.

Le suivi de complexation a mis en évidence de nombreux résultats. Dans un premier temps, les composantes et constantes obtenues pour SR_HPOA et PL_FA lors de la complexation avec Cu(II) sont semblables à celles reportées dans la littérature, ce qui permet de valider l'étude et notamment l'exploitation des résultats. Dans un second temps de grandes différences de comportement de complexation sont observées pour les extraits étudiés. L'ensemble des fluorophores des composantes ne réagit pas de manière identique, une augmentation, une diminution et/ou une stabilité de l'intensité des composantes est observée après l'ajout des différents cations métalliques. Cette modification met en jeu une ou deux catégories de sites, dont les valeurs des constantes de formation varient de plusieurs ordres de grandeur.

La comparaison des MO provenant d'une même « catégorie d'eau » met en évidence que la fraction PL_FA apparaît plus complexant que SR_HPOA et que l'extrait JWW_HPO est quant à lui globalement plus complexant que JWW_TPH vis-à-vis des métaux étudiés. De plus dans le cas de la MO issue des eaux naturelles seulement deux (C_1 et C_2) des trois composantes subissent des modifications des intensités de fluorescence alors que pour la MO issue d'eaux usées les quatre composantes sont affectées. Il apparaît donc que la MOA a une capacité complexante totale plus importante que la MON. Le rejet de MOA dans le milieu naturel aura donc un impact sur la spéciation des métaux.

Une comparaison globale des propriétés de complexation de l'ensemble des MO étudiées dans ce manuscrit est délicate puisque les constantes obtenues sont spécifiques aux composantes de chaque extrait. Il est donc impossible de classer de manière définitive la MO vis-à-vis des cations métalliques et inversement, il est difficile pour un cation métallique d'établir un classement d'affinité par nature de MO. Toutefois, il semble se dégager quelques tendances notamment pour Zn(II) et la composante associée aux substances protéiniques (C₃). En effet Zn(II) est le seul cation métallique étudié qui ne réagit pas avec toutes les MOD et, lorsque qu'elle est affectée par la complexation, C₃ voit de manière générale son intensité de fluorescence augmenter. En outre, on constate qu'en moyenne pour les extraits JWW, les constantes obtenues pour la composante C₃ sont les plus élevées et que c'est également la composante qui a le moins de seconde catégorie de sites impliquée. De plus cette composante n'est pas affectée dans le cas des extraits de MON de référence. Tout ceci suggère une composition en sites complexants différente dans ces extraits. Les analyses de caractérisation montrent une concentration en hétéroatomes comme l'azote et le soufre supérieure à l'extrait de référence SR_HPOA. Comme dans le cas de la MO de Germignies, la présence de groupements soufrés pourrait expliquer cette augmentation de complexation. Néanmoins, il apparaît difficile avec les informations en notre possession d'établir un lien direct entre la présence de potentiels sites complexants soufrés et une augmentation significative des propriétés complexantes de ces extraits. L'utilisation de molécules modèles de la matière organique contenant des sites de fixation soufrés permettrait d'étudier les interactions au niveau microscopique et de quantifier plus précisément l'impact de la substitution de l'oxygène par du soufre sur le pouvoir complexant d'une fonction donnée.

Références bibliographiques :

Ahmad, S. R. and D. M. Reynolds (1995). "Synchronous fluorescence spectroscopy of wastewater and some potential constituents." Water Research **29**(6): 1599-1602.

Atalay, Y. B., D. M. Di Toro and R. F. Carbonaro (2013). "Estimation of stability constants for metal-ligand complexes containing neutral nitrogen donor atoms with applications to natural organic matter." Geochimica et Cosmochimica Acta **122**(Supplement C): 464-477.

Catrouillet, C. (2015). Les interactions entre l'arsenic, le fer et la matière organique en milieu anoxique, Université de Rennes.

Cawley, K. M., K. D. Butler, G. R. Aiken, L. G. Larsen, T. G. Huntington and D. M. McKnight (2012). "Identifying fluorescent pulp mill effluent in the Gulf of Maine and its watershed." Marine Pollution Bulletin **64**(8): 1678-1687.

Cawley, K. M., D. M. McKnight, P. Miller, R. Cory, R. L. Fimmen, J. Guerard, M. Diesler, C. Jaros, Y.-P. Chin and C. Foreman (2013). "Characterization of fulvic acid fractions of dissolved organic matter during ice-out in a hyper-eutrophic, coastal pond in Antarctica." Environmental Research Letters **8**(4): 045015.

Chaminda, G. G. T., F. Nakajima, H. Furumai, I. Kasuga and F. Kurisu (2010). "Comparison of metal (Zn and Cu) complexation characteristics of DOM in urban runoff, domestic wastewater and secondary effluent." Water Science and Technology **62**(9): 2044-2050.

Constantino, C., S. D. W. Comber and M. D. Scrimshaw (2017). "The effect of wastewater effluent derived ligands on copper and zinc complexation." Environmental Science and Pollution Research **24**(9): 8363-8374.

Croue, J.-P., G. V. Korshin and M. M. Benjamin (2000). Characterization of natural organic matter in drinking water, American Water Works Association.

Croue, J. P., M. F. Benedetti, D. Violleau and J. A. Leenheer (2003). "Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site." Environmental Science and Technology **37**(2): 328-336.

D'Andrilli, J., C. M. Foreman, A. G. Marshall and D. M. McKnight (2013). "Characterization of IHSS Pony Lake fulvic acid dissolved organic matter by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and fluorescence spectroscopy." Organic Geochemistry **65**: 19-28.

Dainard, P. G., C. Guéguen, N. McDonald and W. J. Williams (2015). "Photobleaching of fluorescent dissolved organic matter in Beaufort Sea and North Atlantic Subtropical Gyre." Marine Chemistry **177**: 630-637.

Dudal, Y., R. Holgado, G. Maestri, E. Guillon and L. Dupont (2006). "Rapid screening of DOM's metal-binding ability using a fluorescence-based microplate assay." Sci Total Environ **354**(2-3): 286-291.

Graeber, D., J. Gelbrecht, M. T. Pusch, C. Anlanger and D. von Schiller (2012). "Agriculture has changed the amount and composition of dissolved organic matter in Central European headwater streams." Science of the Total Environment **438**: 435-446.

Kamjunke, N., J. Nimptsch, M. Harir, P. Herzsprung, P. Schmitt-Kopplin, T. R. Neu, D. Graeber, S. Osorio, J. Valenzuela, J. Carlos Reyes, S. Woelfl and N. Hertkorn (2017). "Land-based salmon aquacultures change the quality and bacterial degradation of riverine dissolved organic matter." Scientific Reports **7**.

Ma, H., H. E. Allen and Y. Yin (2001). "Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent." Water Research **35**(4): 985-996.

McIntyre, A. M. and C. Gueguen (2013). "Binding interactions of algal-derived dissolved organic matter with metal ions." Chemosphere **90**(2): 620-626.

Osburn, C. L., C. R. Wigdahl, S. C. Fritz and J. E. Saros (2011). "Dissolved organic matter composition and photoreactivity in prairie lakes of the U.S. Great Plains." Limnology and Oceanography **56**(6): 2371-2390.

Ravichandran, M. (2004). "Interactions between mercury and dissolved organic matter--a review." Chemosphere **55**(3): 319-331.

Reuter, J. H. and E. M. Perdue (1977). "Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural waters." Geochimica et Cosmochimica Acta **41**(2): 325-334.

Sarathy, V. and H. E. Allen (2005). "Copper complexation by dissolved organic matter from surface water and wastewater effluent." Ecotoxicology and Environmental Safety **61**(3): 337-344.

Shutova, Y., A. Baker, J. Bridgeman and R. K. Henderson (2014). "Spectroscopic characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: From PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths." Water Res **54**: 159-169.

Van Veen, E., N. Burton, S. Comber and M. Gardner (2002). "Speciation of copper in sewage effluents and its toxicity to *Daphnia magna*." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(2): 275-280.

Zheng, X., M. T. Khan and J. P. Croue (2014). "Contribution of effluent organic matter (EfOM) to ultrafiltration (UF) membrane fouling: isolation, characterization, and fouling effect of EfOM fractions." Water Res **65**: 414-424.

Chapitre V : Complexation de cations métalliques par des
molécules modèles oxygénées et soufrées de la famille des
polyphénols : Etude de la 3-hydroxyflavone et de la 3-
hydroxyflavothione

Chapitre V : Complexation de cations métalliques par des molécules modèles oxygénées et soufrées de la famille des polyphénols : Etude de la 3-hydroxyflavone et de la 3-hydroxyflavothione

I. Structure et propriétés des flavonoïdes	137
1. Structure et propriétés générales	137
2. Propriétés spectroscopiques	138
II. Complexation des cations métallique Zn(II), Pb(II), Cd(II), Ni(II) et Co(II) par la 3-OHF et 3-OHFT	143
1. Complexation de Zn(II)	144
2. Complexation de Pb(II), Ni(II), Co(II), et Cd(II)	148
3. Comparaison des propriétés complexantes	151
a) Constante de formation	152
b) Propriétés spectrales	153
III. Complexation du Cu(II) par la 3-OHF et la 3-OHFT	159
1. Suivi de complexation par spectroscopie UV-Visible	160
a) Méthode des rapports molaires	160
b) Méthode des variations continues	161
c) Interprétation des spectres d'absorption du complexe 1 :2	164
2. Spectroscopie de fluorescence	167
Conclusion	170
Références bibliographiques :	173

Nous avons vu précédemment que l'étude des interactions entre la matière organique naturelle et les métaux était très complexe et il apparaît que les propriétés de complexation varient en fonction de la composition de la MO. Ainsi nous avons mis en évidence des changements dans le processus de complexation de la MO qui pourrait être liés notamment à une concentration en soufre plus élevée. Afin d'avoir une meilleure compréhension de l'influence des groupements soufrés sur les mécanismes de complexation, nous avons choisi d'étudier et de comparer la complexation de cations métalliques par des molécules modèles de faible taille, molécules précurseurs/fragments de la MO, qui présentent des groupements fonctionnels oxygénés ou soufrés identiques à ceux observés dans les substances humiques.

Dans ce chapitre, nous présentons l'étude d'une famille de polyphénols : les flavonoïdes, et plus précisément la 3-hydroxyflavone. Dans une première partie sera discutée l'influence de la substitution de l'oxygène par le soufre sur les propriétés structurales et spectroscopiques de la 3-hydroxyflavone. La 3-hydroxyflavothione étant une molécule très peu connue d'un point de vue physicochimique, nous avons entrepris une étude approfondie de celle-ci, qui a d'ailleurs donné lieu à la publication d'un article (SAA). Les résultats obtenus s'appuient à la fois sur des données expérimentales (spectre d'absorption électronique et matrice de fluorescence) et théoriques (calculs DFT et TD-DFT). La deuxième partie sera consacrée à l'étude de la complexation de cations métalliques par les deux flavonoïdes, dans les mêmes conditions physicochimiques. La complexation a été suivie par les techniques spectroscopiques d'absorption UV-visible et de fluorescence. Les résultats ainsi obtenus ont été combinés à des calculs de chimiométrie et de chimie quantique afin de déterminer pour chaque complexe la stœchiométrie, la constante de formation apparente et les spectres d'absorption UV-visible et d'émission de fluorescence des espèces pures. Pour des raisons de clarté, seule l'étude de la complexation de Zn(II) sera présentée de manière détaillée, puis des comparaisons seront faites pour les autres cations métalliques.

Enfin, une dernière partie est consacrée à l'investigation de la complexation de Cu(II) par la 3-hydroxyflavone et la 3-hydroxyflavothione. En effet, bien que le cuivre présente un intérêt indéniable en environnement ou même dans le domaine biologique, l'étude de la complexation de celui-ci avec la 3-hydroxyflavone n'a jamais été reportée dans la littérature, alors que l'on trouve des informations concernant les autres cations métalliques. Ce constat a attiré toute notre attention, et nous avons très vite compris, devant la complexité du système, pourquoi une telle étude n'a jamais été publiée. Aussi, nous essayons d'apporter un éclairage sur le système Cu(II)/3-hydroxyflavone en utilisant de manière conjointe les techniques spectroscopiques et de chimie quantique.

I. Structure et propriétés des flavonoïdes

1. Structure et propriétés générales

La 3-hydroxyflavone (3-OHF) et la 3-hydroxyflavothione (3-OHFT) font partie de la famille des flavonoïdes. Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C6 (notés A et B) reliés par une chaîne à trois carbones ponté par un oxygène (cycle C). La Figure 1 montre la structure type des flavonols (flavonoïdes possédant un groupement hydroxyl en position 3) ainsi que la numérotation des atomes et la désignation des angles utiles pour déterminer la structure géométrique de cette molécule et notamment son degré de planéité et utilisés dans la suite de ce chapitre. Cependant, la comparaison de la structure de la 3-OHF et de la 3-OHFT ne sera pas abordée ici en détails, dans la mesure où elle a été reportée dans un article récent (Falantin et al. 2017). Nous avons pu montrer notamment que la 3-OHFT présente tout comme la 3-OHF une liaison hydrogène intramoléculaire très forte.

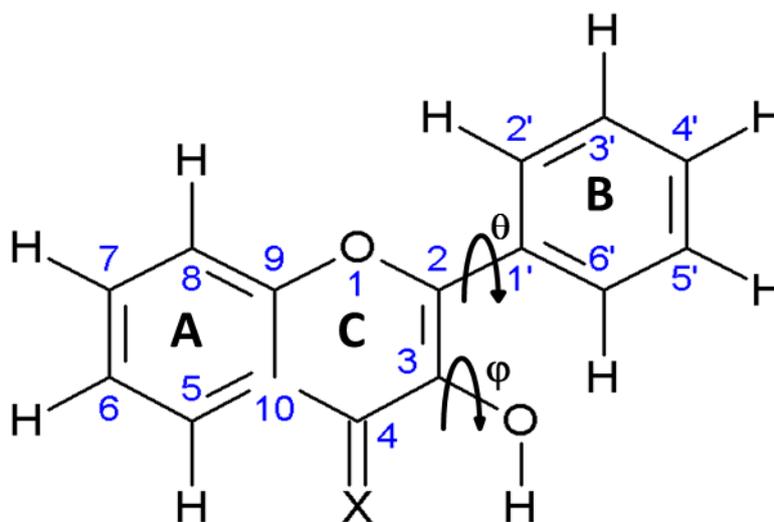


Figure 1 : Structure type des flavonoïdes. X = O pour la 3-OHF et X= S pour la 3-OHFT.

Du fait de la faible solubilité de ces flavonoïdes dans l'eau, il a été choisi de travailler dans le méthanol, solvant ayant les propriétés se rapprochant le plus de celles de l'eau (notamment dans la possibilité de former des liaisons hydrogène). De plus, il a été choisi de travailler à $\text{pH}_{\text{apparent}} = 5$. A ce pH apparent, les deux ligands sont principalement sous formes protonées, puisque le pK_a de la 3-OHF vaut 10,34 (Thompson, 1976 ; Lemańska, 2001) et il est très proche de celui de la 3-OHFT : 10,5 (déterminé expérimentalement). Dans la suite du chapitre la mention du pH se référera toujours à un pH apparent.

2. Propriétés spectroscopiques

Des informations sur la structure des flavonoïdes en solution aqueuse peuvent être obtenues par leurs spectres UV-visible (K. R. Markham 1975). En effet, les caractéristiques les plus évidentes, communes à tous les flavonoïdes, sont l'existence de deux bandes d'absorption principales dans le domaine spectral de l'UV. La bande d'absorption située dans les plus grandes longueurs d'onde est notée bande I, et la bande II, celle dans les plus courtes longueurs d'onde. La plupart des flavonoïdes présentent une absorption dans la gamme 310-380 nm (bande I) alors que la bande II est située dans la région spectrale 210-290 nm (Harborne 1964, T. J. Mabry 1970, Voirin 1983). La position des bandes d'absorption présente une grande sensibilité aux propriétés des solvants et des études de solvatochromisme de différents flavonoïdes ont été rapportés dans la littérature (Sancho et al. 2011, Voicescu et al. 2014). La Figure 2 présente les spectres d'absorption UV-visible de la 3-OHF et de la 3-OHFT dans le méthanol.

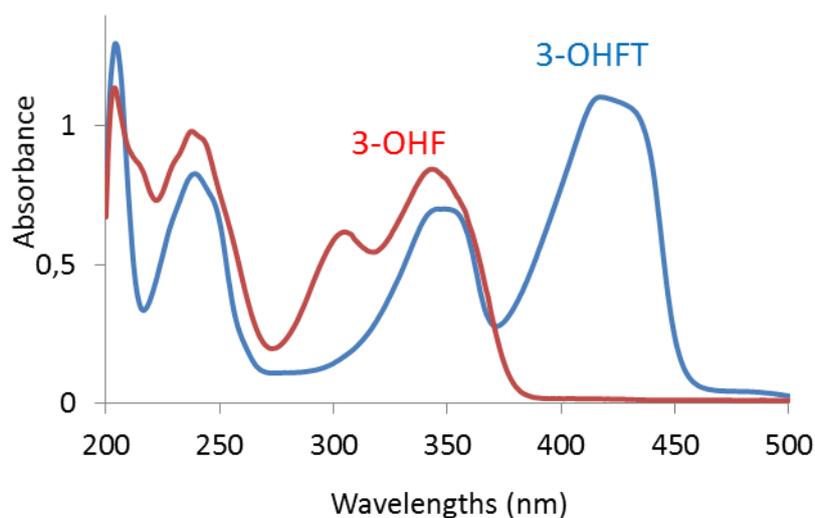


Figure 2 : Spectre UV-visible de la 3-OHF (en rouge) et de la 3-OHFT (en bleu) dans le méthanol ($4 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹).

Si la forme générale du spectre d'absorption de la 3-OHFT est proche de celle de la 3-OHF, la substitution de l'oxygène par un atome de soufre dans la molécule provoque un effet bathochrome de 75 nm de la bande I. Comme mentionné précédemment dans la littérature, la 3-OHF dans le méthanol pur présente une double bande I à 344 nm (bande Ia) et 304 nm (bande Ib) et une bande II située à 242 nm (Lapouge et al. 2005, Cornard et al. 2006, Protti et al. 2008, Mondal et al. 2009, Davila et al. 2012). Alors que la bande II présente à peu près la même longueur d'onde pour la 3-

OHFT que la 3-OHF, la double bande I a subit un décalage vers le rouge avec les bandes Ia et Ib observées respectivement à 416 et 348 nm. La forme des bandes d'absorption diffère également: une sous-structure est observée pour les deux bandes dans le cas de 3-OHFT.

Par décomposition spectrale, une différence d'énergie de 0,1 eV a été obtenue entre les deux composantes de chacune des bandes d'absorption. Le spectre vibrationnel calculé contient un mode normal à une fréquence de 814 cm^{-1} (0,1 eV) qui est principalement situé sur le cycle C et implique l'atome de soufre. Le couplage vibronique de ce mode de vibration avec une excitation électronique devrait expliquer l'apparition de la structure fine des bandes d'absorption de la 3-OHFT.

La Figure 3 montre les matrices d'excitation et d'émission de fluorescence enregistrées pour la 3-OHF et la 3-OHFT dans le méthanol.

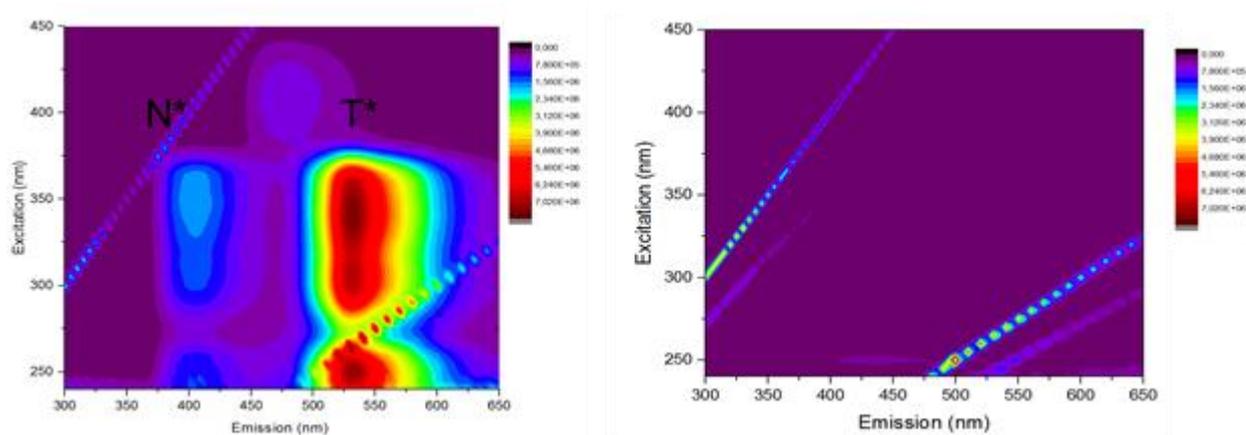


Figure 3 : Matrice d'excitation et d'émission de fluorescence de la 3-OHF ($4.10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$ – fente 3 nm) et de la 3-OHFT ($4.10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$ – fente 5 nm) dans le méthanol. (N* et T* font référence, respectivement, à la forme normale et à la forme tautomère).

Une fluorescence duale est observée dans le cas de la 3-OHF, ce phénomène est bien connu dans la littérature (Sengupta et al. 1979, Kasha 1986, Swinney et al. 1993, Klymchenko et al. 2002, Klymchenko et al. 2003). La 3-OHF, qui subit une réaction de transfert de proton intramoléculaire à l'état excité (ESIPT), présente ainsi deux bandes d'émission de fluorescence intenses et bien séparées. La première bande d'émission dans les courtes longueurs d'onde correspond à la forme normale à l'état excité (S_1^N ou N*) et la seconde correspond à l'émission de la forme tautomère S_1^T ou T* formée après le transfert de proton à l'état excité. On observe bien ces deux signaux sur la MEEF de la Figure 3, l'émission de la forme normale se situant à 404 nm et celle de la forme tautomère à 534 nm. Cette dernière forme est l'espèce prédominante dans le premier état excité et par conséquent son émission est presque quatre fois supérieure à celle de la forme normale.

Au contraire, la MEEF de la 3-OHFT ne montre aucune émission de fluorescence. Seules les diffusions Raman et Rayleigh, du premier et second ordre, du solvant sont observées même en augmentant la sensibilité du spectrofluorimètre (augmentation de la largeur de fente, par exemple). Ainsi, le remplacement de l'atome d'oxygène de la 3-OHF par un atome de soufre provoque une extinction complète de la fluorescence. La forme anionique de 3-OHF est également une espèce fluorescente qui présente une bande d'émission entre les bandes bleue et verte de la molécule neutre (Tomin 2011) tandis que la déprotonation de 3-OHFT, obtenue par des augmentations successives du pH, ne conduit à aucune fluorescence.

Dans le but d'expliquer ces modifications spectrales importantes, lors de la substitution du groupement cétone par un groupement thiocétone, des calculs de TD-DFT ont été effectués au sein de l'équipe, ce qui permet notamment d'avoir une meilleure idée de la nature des transitions de faible énergie mises en jeu. Ces calculs ont été réalisés suivant la procédure expliquée dans le chapitre II.

Les transitions électroniques calculées, à partir des structures optimisées dans le méthanol, pour la 3-OHF et la 3-OHFT sont représentées par des lignes verticales sur les Figures 4a et 4b, les spectres expérimentaux y sont également représentés.

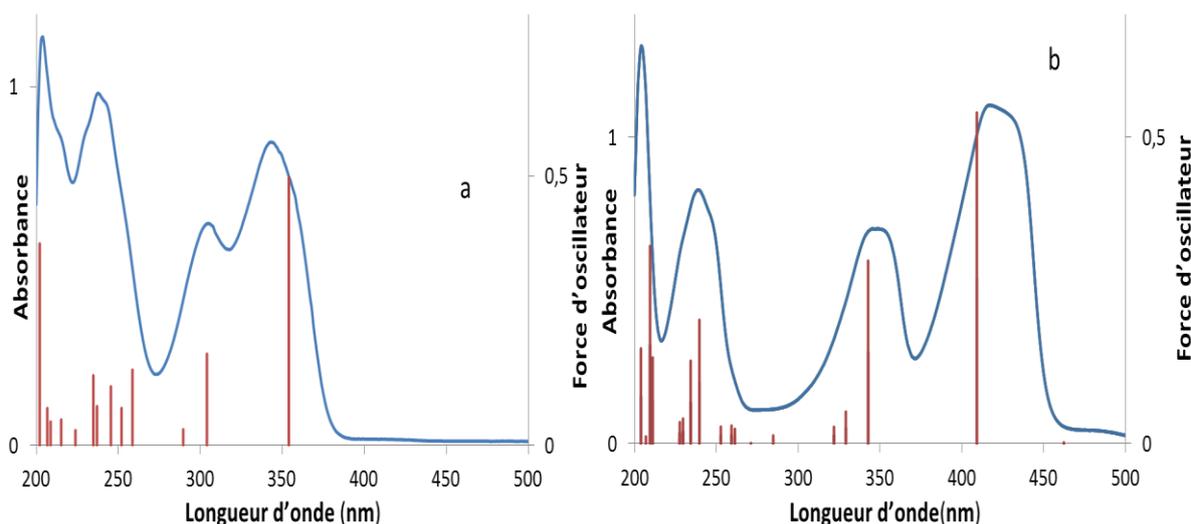


Figure 4 : Transitions électronique calculées (traits verticaux) et spectre d'absorption de la 3-OHF (a) et de la 3-OHFT (b).

Un bon accord entre les données théoriques et expérimentales est obtenu pour les deux molécules modèles. Cet accord est satisfaisant à la fois en longueurs d'onde, où l'effet bathochrome de la bande I observé expérimentalement est bien reproduit par le calcul, et à la fois en intensité. En effet, les valeurs calculées pour les forces de l'oscillateur sont en bon accord avec les absorbances mesurées. Cependant, une seule grande transition est calculée pour les bandes à faible énergie de la 3-OHFT, ce qui confirme l'hypothèse que la forme de la bande est due à une structure vibronique.

Pour les deux molécules modèles étudiées, les principales longueurs d'ondes calculées avec leur attribution sont reportées dans le Tableau 1 et la représentation des orbitales moléculaires (OM) impliquées dans les transitions sont représentées sur la Figure 5.

3-OHF	Exp	Calc				
	λ (nm)	λ (nm)	E (eV)	f	O.M.	contribution (%)
Bande Ia	344	354	3,50	0,50	HOMO \rightarrow LUMO	98
Bande Ib	306	304	4,08	0,17	HOMO-1 \rightarrow LUMO	95
		259	4,79	0,14	HOMO-3 \rightarrow LUMO	44
Bande II	240	246	5,05	0,11	HOMO \rightarrow LUMO+2	74
		235	5,28	0,13	HOMO-2 \rightarrow LUMO+1	63

3-OHFT	Exp	Calc				
	λ (nm)	λ (nm)	E (eV)	f	O.M.	contribution (%)
Bande Ia	416	463	2,68	0,0017	HOMO-1 \rightarrow LUMO	98
		409	3,02	0,54	HOMO \rightarrow LUMO	96
Bande Ib	348	343	3,62	0,30	HOMO-2 \rightarrow LUMO	93
Bande II	239	240	5,17	0,20	HOMO-2 \rightarrow LUMO+1	68
		234	5,29	0,14	HOMO-3 \rightarrow LUMO+1	48

Tableau 1: Longueurs d'onde d'absorption (en nm) expérimentales et calculées et énergie correspondante (en eV) pour la 3-OHF et 3-OHFT ainsi que contributions des orbitales moléculaires impliquées dans chaque transition. (f est la force d'oscillateur calculée).

On remarque que dans la gamme des grandes longueurs d'onde, une transition avec une très faible force d'oscillateur est calculée à 463 nm pour la 3-OHFT. Elle correspond à la très faible absorption observée sur le spectre expérimental entre 450 à 500 nm. Cette transition interdite a un caractère $n\pi^*$ prononcé et implique essentiellement les orbitales HOMO-1 (orbitale non liante localisée sur S) et LUMO de la 3-OHFT. L'orbitale correspondante à la paire libre de l'atome d'oxygène de la 3-OHF n'est pas représentée sur la Figure 5 en raison d'une énergie plus faible et correspondante à une HOMO-4.

Les autres transitions décrivant les bandes d'absorption I et II ont un caractère $\pi\pi^*$. On trouve des similitudes dans les orbitales HOMO, LUMO et LUMO + 1 de la 3-OHF et de la 3-OHFT. De la même manière, la HOMO-1 de la 3-OHF a une forme proche de la HOMO-2 de la 3-OHFT. Cependant, la nature de l'atome X implique des modifications dans l'attribution du spectre d'absorption électronique. Par exemple, la bande la implique les orbitales HOMO et LUMO pour les deux molécules et consiste-en des transitions très similaires, sauf qu'elles correspondent à deux états excités différents (S_1^N pour la 3-OHF et S_2^N pour la 3-OHFT)

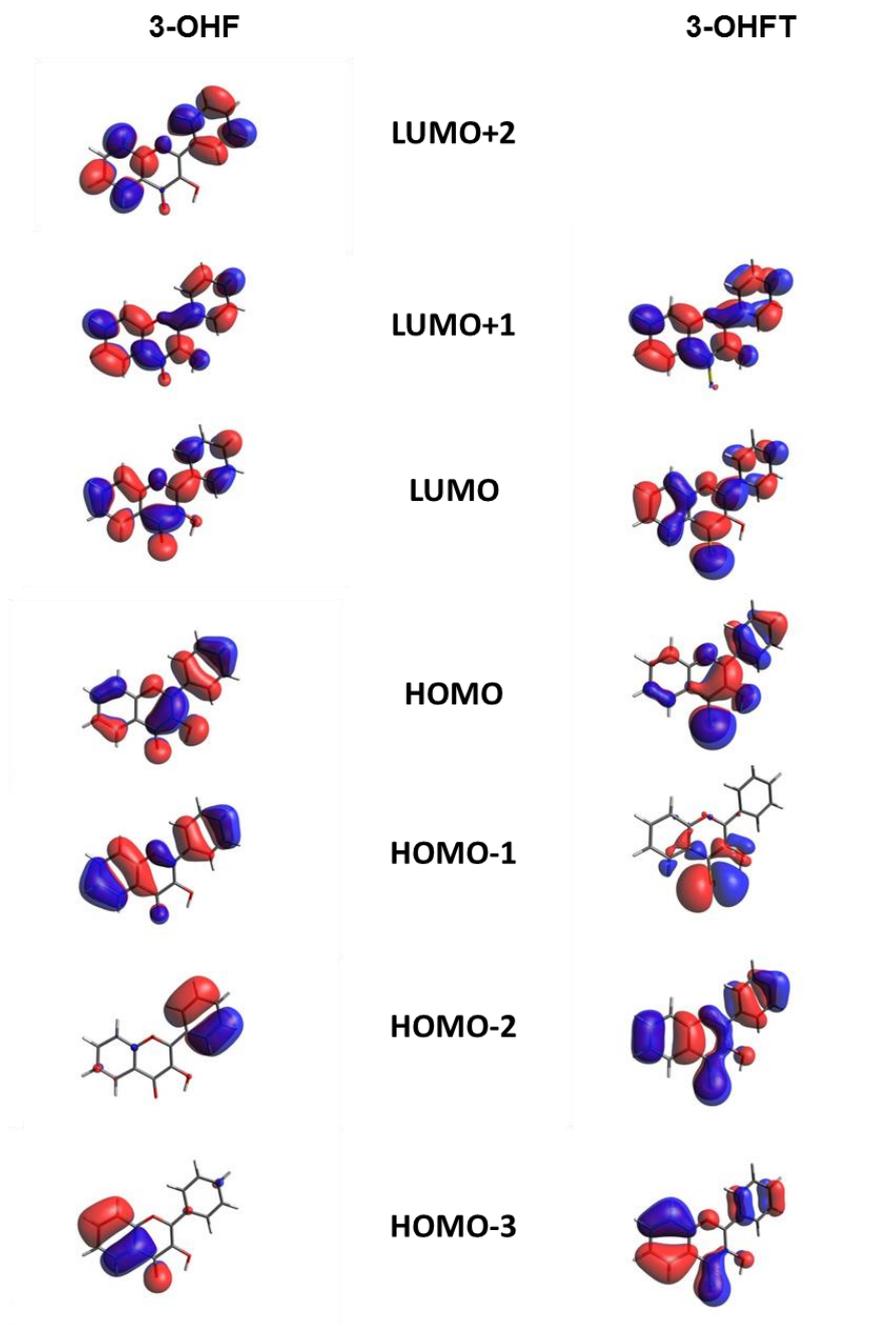


Figure 5 : Représentation des orbitales moléculaires impliqués dans les principales transitions électroniques calculées pour la 3-OHF et la 3-OHFT.

De même, le calcul de la différence de densité électronique entre l'état excité et l'état fondamental, illustré par la Figure 6, montre une autre différence significative : S est un donneur d'électrons alors que O est un accepteur d'électrons lors de la transition correspondant à la bande la.

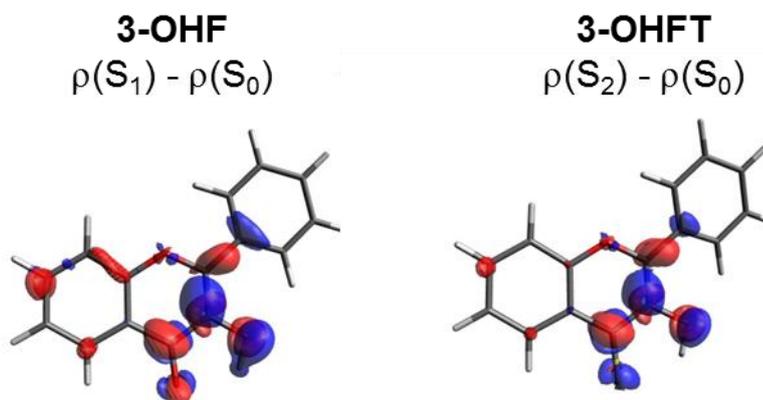


Figure 6 : Densité de transition électronique correspondant à la plus faible transition d'énergie $\pi\pi^*$ pour la 3-OHF et la 3-OHFT.

Comme l'état S_1 est de nature $n\pi^*$, cela explique pourquoi la transition S_1-S_0 est interdite et qu'aucune fluorescence de la molécule est observée. Ainsi, la substitution de l'atome d'oxygène par du soufre modifie de manière sensible l'ordre énergétique des orbitales moléculaires et par conséquent les propriétés spectroscopiques de la 3-OHFT.

II. Complexation des cations métallique Zn(II), Pb(II), Cd(II), Ni(II) et Co(II) par la 3-OHF et 3-OHFT

Dans cette partie, le but est d'identifier la nature des complexes formés entre les deux molécules modèles la 3-OHF et la 3-OHFT et les cations métalliques Zn(II), Pb(II), Cd(II), Ni(II) et Co(II) à pH = 5 et sous atmosphère inerte. L'ensemble des suivis a été réalisé en duplicat. Le processus de complexation de Zn(II) avec les deux molécules modèles sera présenté de manière détaillée, puis un bref descriptif et une comparaison sera faite pour les autres cations étudiés (Pb(II), Ni(II), Co(II) et Cd(II)). Enfin le cas particulier de Cu(II) sera présenté de manière séparée dans un autre paragraphe.

1. Complexation de Zn(II)

Après chaque ajout de la solution métallique, ajustement du pH à 5 par micro ajout de NaOH et un temps de stabilisation de 15 minutes un spectre d'absorption et d'émission a été enregistré. Les faisceaux de spectres d'absorption UV-visible et d'émission de fluorescence des deux molécules modèles de la Figure 7 montrent une modification continue avec l'augmentation de la quantité de cation métallique ajouté.

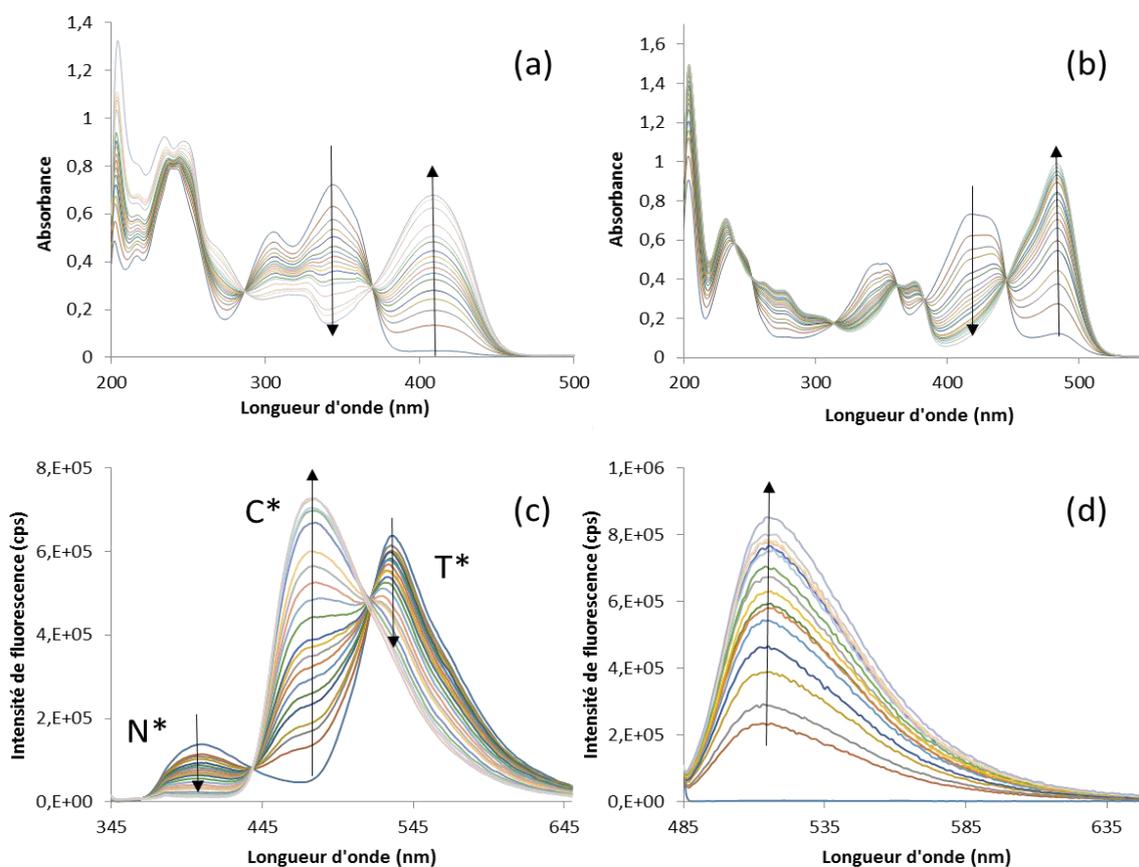


Figure 7 : Evolution des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la 3-OHF (a et c) et de la 3-OHFT (b et d) dans le méthanol à pH=5, lors de la complexation de Zn(II) pour un rapport molaire allant de 0 à 8. (N et T sont relatifs à la forme normale et tautomère du ligand libre, tandis que C correspond à la bande du complexe).

Dans les deux cas pour les faisceaux UV-visible, on observe une diminution des bandes du ligand libre à 345 nm pour la 3-OHF et à 418 nm pour la 3-OHFT ainsi que l'apparition d'une nouvelle bande à 409 nm et 485 nm pour la 3-OHF et la 3-OHFT respectivement, attribuée à la formation d'un complexe. La présence de points isobestiques, observés par exemple à 369 nm pour la 3-OHF et à 445 nm pour la 3-OHFT, indique pour les deux cas l'existence d'un équilibre simple entre les formes libre et complexée de la 3-OHF et de la 3-OHFT. Pour la 3-OHF, le faisceau de spectres de fluorescence a été enregistré en excitant la molécule dans la bande d'absorption du ligand (345 nm).

La 3-OHFT étant non fluorescente, le faisceau de spectres a alors été obtenu en excitant dans la bande d'absorption du complexe (485 nm). Sur la Figure 7c, on observe une diminution de la fluorescence des deux formes, N* et T*, du ligand libre et l'apparition d'une nouvelle bande centrée sur 476 nm, signe de la formation d'un complexe (noté C) lors de l'ajout de Zn(II). L'existence d'un équilibre simple est confirmée avec la présence de points isoémissifs. Dans le cas de la 3-OHFT, on observe sur la Figure 7d, la formation d'un complexe dont l'émission est centrée sur 516 nm, dont l'intensité augmente avec le rapport molaire. De plus, quelle que soit la technique spectroscopique utilisée pour le dosage, une diminution du pH a été observée après chaque addition du cation métallique, pour les deux ligands, ce qui indique une déprotonation du ligand lors de la complexation (le pH a été ajusté par addition de soude). La méthode des rapports molaires appliquée aux faisceaux de spectres enregistrés et présentée sur la Figure 8, montre la formation pour les deux molécules modèles, d'un complexe de stœchiométrie 1:1 .

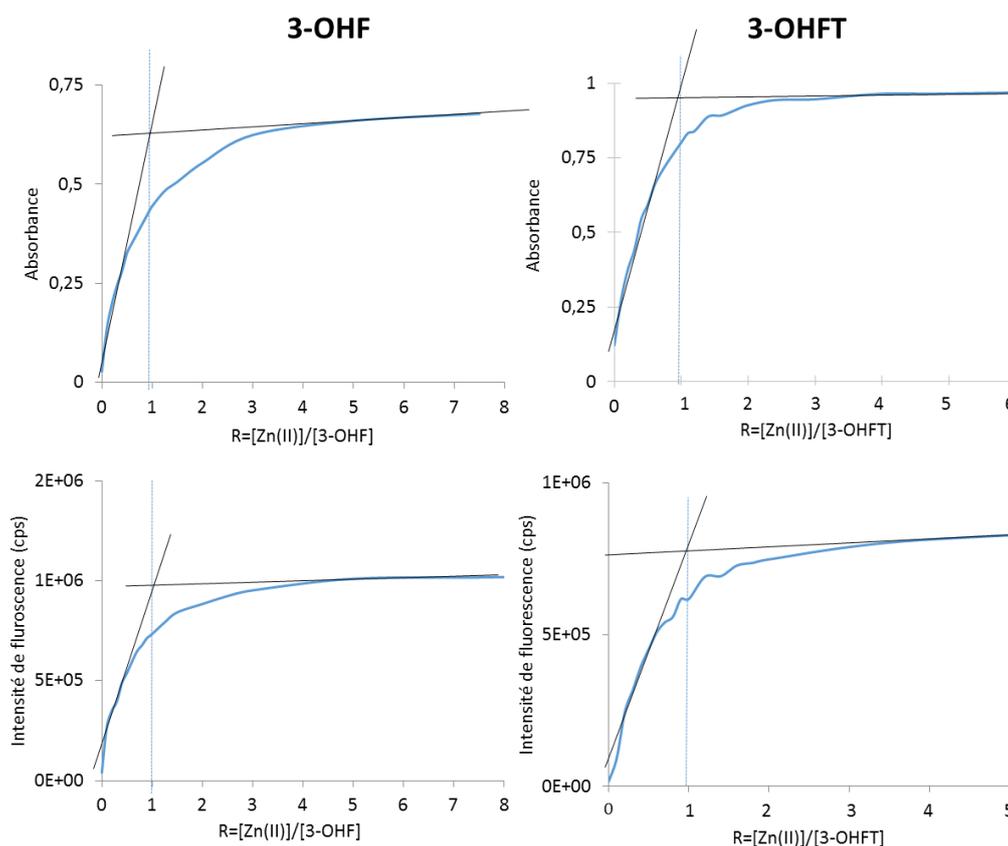


Figure 8: Méthode des rapports molaires pour les deux techniques de dosages dans le cas de la complexation de Zn(II). Avec à gauche la 3-OHF, rapports tracés à 410 nm en absorption et à 475 nm en émission et à droite la 3-OHFT, rapports tracés à 485 nm en absorption et à 516 nm en émission.

Une représentation schématique du complexe 1:1 formé entre les deux molécules modèles étudiées et Zn(II) est représentée sur la figure 9.

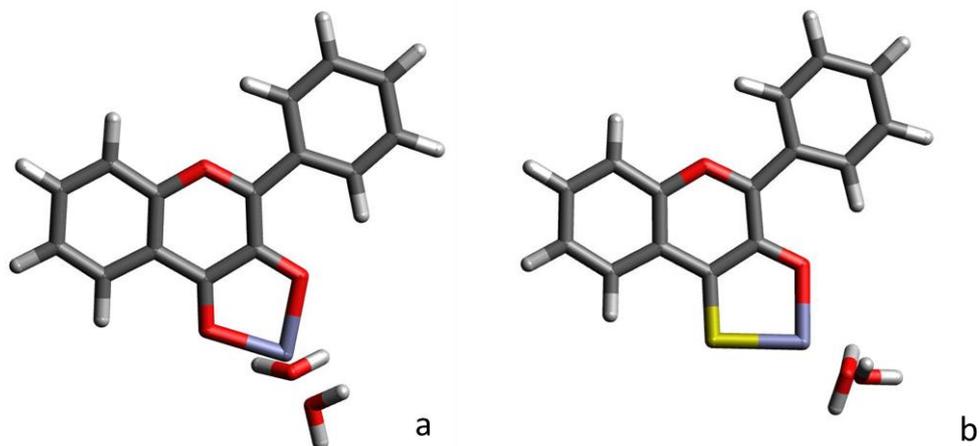


Figure 9 : Structure des complexes formés entre Zn(II) et la 3-OHF (a) ou la 3-OHFT(b).

Les faisceaux ont ensuite été traités avec le logiciel ReactLab de manière à déterminer le nombre d'espèces absorbantes et fluorescentes ainsi que le spectre d'absorption et d'émission de fluorescence de chacune des espèces pures. Les résultats confirment la formation d'un seul complexe dans le cas des deux molécules modèles étudiées. Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des espèces pures (le ligand libre et le complexe formé) ainsi que les profils de concentration obtenus sont présentés sur la Figure 10.

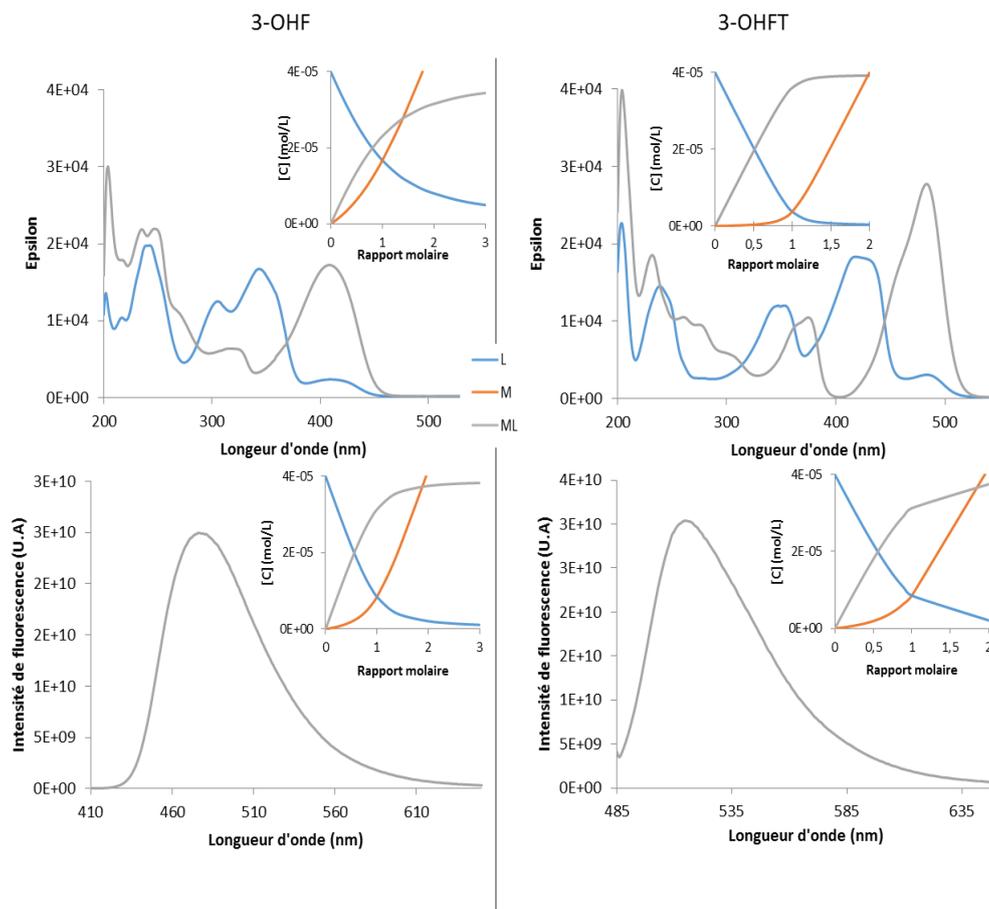


Figure 10: Spectres d'absorption UV-visible (haut) des espèces pures et spectres d'émission de fluorescence des complexes formés (bas) avec pour chaque graphique l'évolution de la concentration en mol.L⁻¹ des différentes espèces présentes en solution en fonction du rapport molaire, lors de la complexation des deux modèles avec Zn(II). (Avec en bleu le ligand libre L, en gris le complexe ML, et en orange le métal libre M).

Les spectres extraits à la fois pour les espèces pures et les complexes formés sont cohérents, en termes de longueurs d'onde, avec les faisceaux de la Figure 7. En comparant les profils de concentration, on remarque que le processus de chélation entre la 3-OHF et Zn(II) est plus faible que lors de la chélation entre la 3-OHFT et Zn(II), puisque pour un rapport molaire de 2, seulement 80% du ligand est complexé pour la 3-OHF alors que la fraction complexée dans le cas de la 3-OHFT atteint 96%. Ces observations sont en accord avec les constantes de formations apparentes obtenues par les traitements chimométriques des spectres d'absorption et de fluorescence. En effet, la constante de formation pour la 3-OHFT ($\log \beta = 5,63$) est supérieure à celle de la 3-OHF ($\log \beta = 4,93$). Les constantes obtenues à partir des mesures de fluorescence ($\log \beta = 5,62$ et $5,14$ pour 3-OHFT et 3-OHF, respectivement) sont en accord avec celles obtenues à partir des spectres d'absorption, ce qui confirme de nouveau la validité des résultats obtenus par les deux méthodes de dosages spectroscopiques. Dans ce premier cas de complexation, il apparaît donc que le groupement fonctionnel hydroxy-thiocétone est plus complexant que le groupement hydroxy-cétone vis-à-vis de Zn(II).

2. Complexation de Pb(II), Ni(II), Co(II), et Cd(II)

Le processus de complexation de Pb(II), Co(II), Ni(II) et Cd(II) avec les deux molécules modèles a également été étudié en utilisant la même méthodologie que celle utilisée pour l'étude de la complexation de Zn(II).

Les observations précédemment effectuées pour la complexation entre les deux molécules modèles et Zn(II) peuvent être généralisées pour Pb(II), Co(II), Ni(II) et Cd(II). En effet pour les faisceaux d'absorption UV-visible, présentés en Figure 11, on observe lors du dosage la diminution de la bande d'absorption I et l'apparition d'une nouvelle bande à de plus grandes longueurs d'onde. Cette bande est attribuée comme précédemment à la formation d'un complexe unique dont la stœchiométrie est 1 :1. Ces stœchiométries sont en accord avec celles trouvées précédemment par Malesev et al. (2007) pour la 3-OHF et par Amaral et al. (2016) pour la 3-OHFT, toutefois dans des conditions différentes des nôtres. Quant aux propriétés de fluorescence des complexes, elles diffèrent en fonction du cation métallique complexé. Alors que les complexes formés avec Zn(II), Pb(II) et Cd(II) et la 3-OHF ou de la 3-OHFT sont tous fluorescents, les complexes formés avec Ni(II) et Co(II) ne le sont pas. L'évolution des spectres d'émission de fluorescence lors de la complexation des deux ligands avec Pb(II) et Cd(II) est présentée sur la Figure 12. Les mêmes observations que précédemment peuvent être faites, pour la complexation avec la 3-OHF on a une diminution de l'émission de fluorescence de la forme N* et T* et l'apparition d'une nouvelle bande de fluorescence correspondant à C* et pour la 3-OHFT on observe l'apparition progressive de la bande de fluorescence du complexe.

Les constantes de formation apparentes, (répertoriées dans le Tableau 2), ainsi que les spectres UV-visible et d'émission de fluorescence des espèces pures (Figure 13) ont été obtenues au moyen de méthodes chimométriques. De nouveau, les valeurs des constantes issues des mesures de spectroscopie d'absorption et de fluorescence sont en bon accord. La conclusion faite lors de la complexation de Zn(II) est généralisable à tous les métaux étudiés : en effet, pour un ion métallique donné, la constante de formation apparente est toujours plus élevée dans le cas de la 3-OHFT que dans celui de la 3-OHF. Ainsi, la fonction hydroxy-thiocétone est plus complexante que la fonction hydroxy-cétone vis-à-vis de l'ensemble des métaux divalents étudiés. La modification des spectres obtenus ainsi que les valeurs des constantes de formation sont discutés dans le paragraphe suivant.

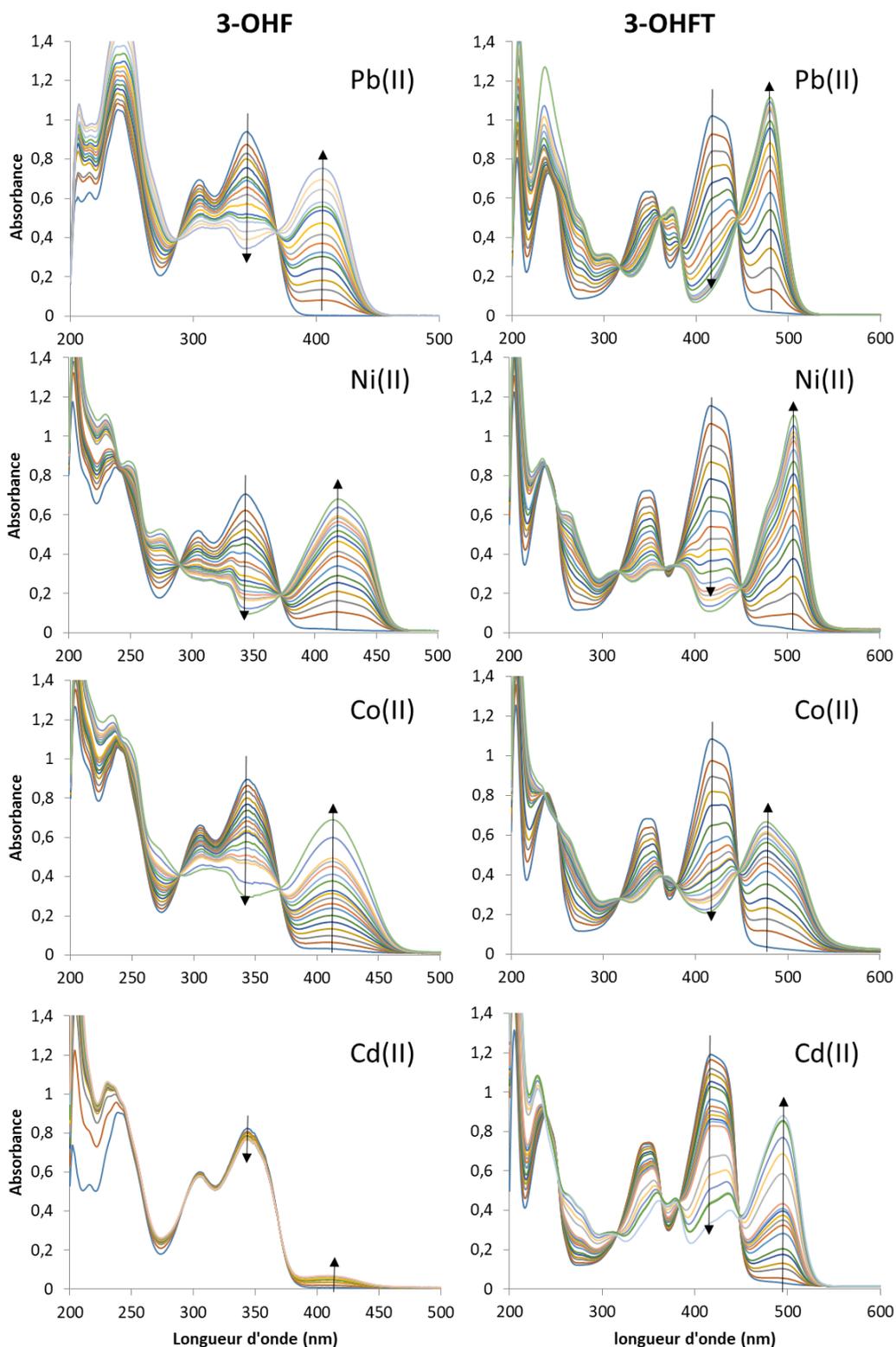


Figure 11 : Evolution des spectres d'absorption UV-visible de la 3-OHF (colonne de gauche) et de la 3-OHFT ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, lors de la complexation de Pb(II), Ni(II), Co(II) et Cd(II), dans le méthanol à pH=5, pour des rapports molaires allant de 0 à 30.

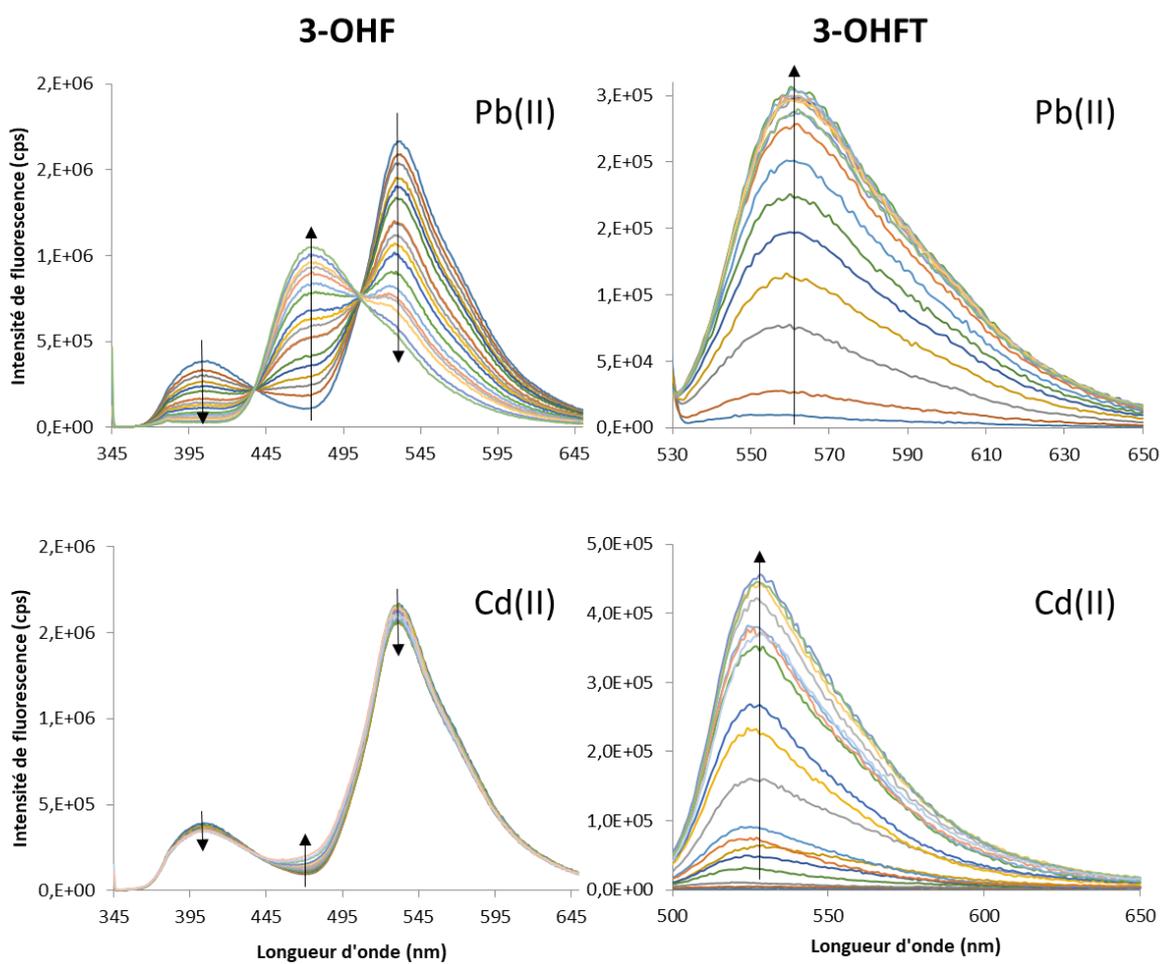


Figure 12 : Evolution des spectres d'émission de fluorescence des complexes formés avec la 3-OHF (colonne de gauche) et la 3-OHFT (colonne de droite) $5.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, lors de la complexation de Pb(II) et le Cd(II) dans le méthanol à pH=5, pour des rapports molaires allant de 0 à 30.

	3-OHF				3-OHFT			
	UV		Fluorescence		UV		Fluorescence	
	λ_{max}	Log β						
Zn(II)	409	4,93 (0,01)	476	5,14(0,01)	483	5,63(0,03)	516	5,62(0,02)
Pb(II)	405	5,15(0,02)	474	5,53(0,03)	480	5,83(0,03)	512	6,03(0,01)
Cd(II)	408	2,14(0,01)	485	2,78(0,01)	496	4,33(0,01)	525	4,99(0,08)
Ni(II)	419	5,26(0,03)	/	/	507	5,54(0,02)	/	/
Co(II)	413	4,54(0,01)	/	/	477	5,67(0,04)	/	/

Tableau 2 : Récapitulatif des longueurs d'onde et des constantes de formation des complexes de stœchiométrie 1:1 formés avec la 3-OHF (à gauche) et la 3-OHFT (à droite) pour les différents métaux étudiés. (Incertitude)

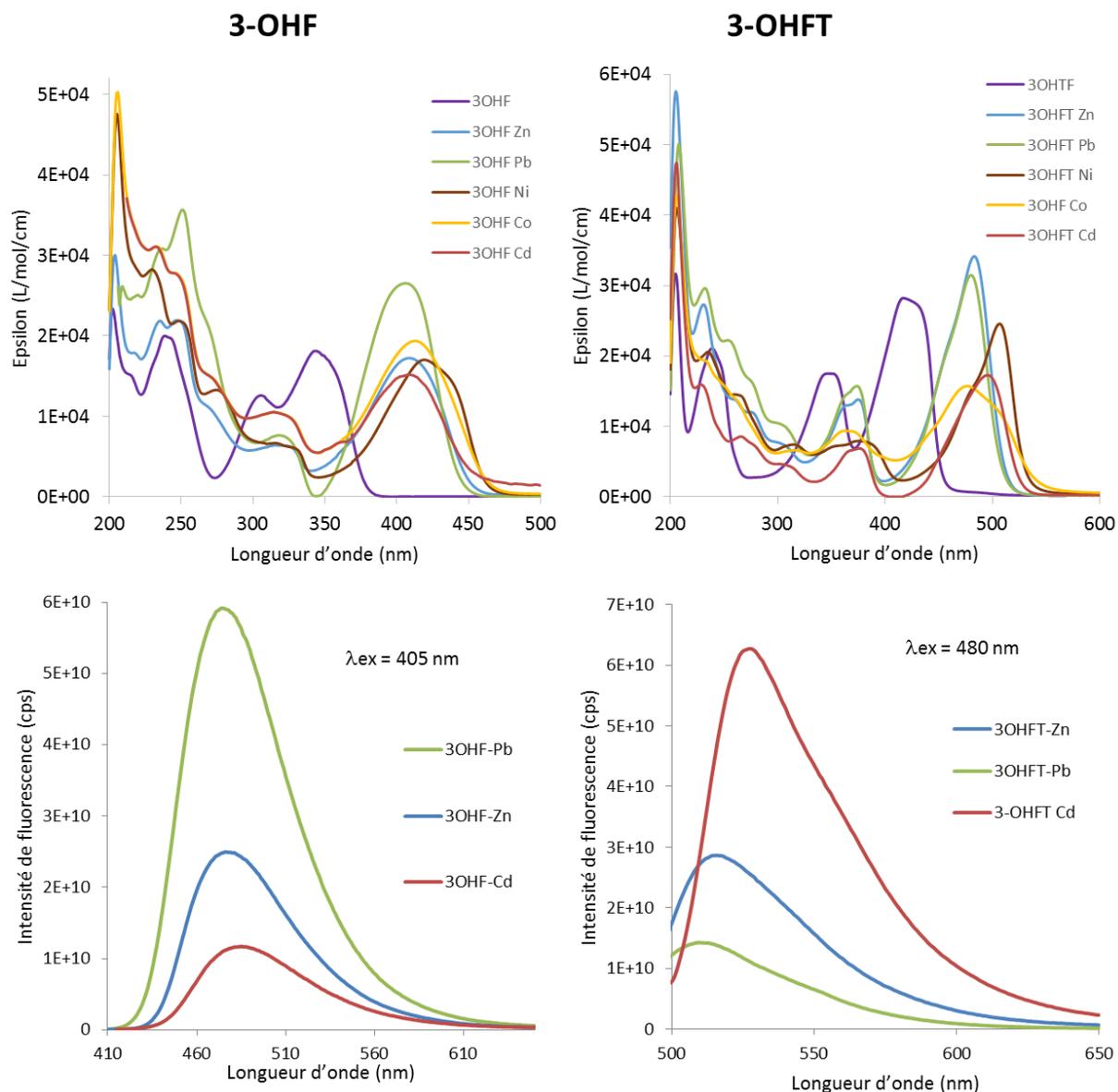


Figure 13 : Spectres d'absorption (en haut) et d'émission de fluorescence (en bas) des espèces pures (ligands et complexes 1:1) extraits par méthode chimiométrique, de la 3-OHF et de la 3-OHFT.

3. Comparaison des propriétés complexantes

Dans le paragraphe précédent, nous avons constaté que pour l'ensemble des cations métalliques divalents étudiés, un seul complexe, de stœchiométrie 1:1, est formé avec les deux molécules modèles et que la fonction hydroxy-thiocétone est plus complexante que la fonction hydroxy-cétone. Dans ce paragraphe, les différentes propriétés des complexes obtenus ainsi que des tentatives de comparaison et d'explication sont présentées.

a) *Constante de formation*

Les constantes de formation obtenues pour les deux molécules modèles ne sont pas du même ordre de grandeur. Dans le cas de la 3-OHF, les différences d'affinité des cations métalliques vis-à-vis du ligand sont très marquées ; en effet les valeurs de $\log \beta$ obtenues varient entre 2,14 et 5,26. Ainsi par exemple, la 3-OHF complexe 1300 fois plus le Ni(II) (cation métallique qui a la plus grande affinité vis-à-vis du ligand) que Cd(II) (cation qui a la plus faible affinité). Dans le cas de la 3-OHFT, les différences sont beaucoup moins marquées, les valeurs du $\log \beta$ étant comprises entre 4,33 et 5,83. Le complexe impliquant Pb(II) (cation métallique qui a la plus grande affinité vis-à-vis de la thioflavone) est seulement 30 fois plus stable que celui obtenu avec Cd(II) (cation métallique avec la plus faible affinité). De plus, la substitution de l'atome d'oxygène par un atome de soufre dans le ligand se traduit, de manière générale, par une plus grande stabilité du complexe formé, mais ce gain de stabilité n'est pas identique pour l'ensemble des cations métalliques étudiés. Par exemple, le complexe $[3\text{-OHFT_Cd}]^+$ a une constante de formation 150 fois supérieure à 3-OHF/Cd(II), tandis que le complexe impliquant Pb(II) ne voit sa constante multipliée que par un facteur 4. Ainsi, si la 3-OHFT est beaucoup plus complexante que la 3-OHF, celle-ci présente une plus grande sélectivité vis-à-vis des cations (au vu des différences plus marquées des constantes de formation des complexes)

Le classement de l'affinité des différents cations métalliques est différent selon le ligand considéré (voir Tableau 3).

	Classement d'affinité
3-OHF	Cd(II) << Co(II) < Zn(II) < Pb(II) < Ni(II)
3-OHFT	Cd(II) < Ni(II) < Zn(II) < Co(II) < Pb(II)

Tableau 3 : Classement de l'affinité des différents cations métalliques étudiés vis à vis des deux molécules modèles.

On remarque que Cd(II) est le cation avec le moins d'affinité pour les deux groupements fonctionnels étudiés et que Zn(II) se retrouve au milieu des deux classements. Par contre, une inversion des positions de Co(II) et Ni(II) est observée dans les classements, Ni(II) est dans la partie des métaux les plus complexés et Co(II) dans la partie avec les moins d'affinité avec la 3-OHF et c'est le contraire avec la 3-OHFT.

De nombreuses hypothèses ont été proposées pour prévoir l'association des métaux à des ligands. Une première classification se réfère à la nature dure ou molle des espèces (métaux et des ligands) et à la théorie de Lewis. Il existe trois groupes de métaux : le groupe A ou métaux durs, le groupe B ou métaux mous et les métaux dis intermédiaires. Selon la classification de Pearson (Théorie HSBA) (1973) Zn(II), Ni(II) et Co(II) sont considérés comme des métaux intermédiaires et Pb(II) et Cd(II) comme des métaux appartenant au groupe B.

Prenons comme exemple le cas de la 3-OHFT, qui est considéré comme une base faible, elle devrait selon la théorie de Lewis former les complexes les plus stables avec les deux métaux mous que sont Pb(II) et Cd(II), ce qui n'est pas le cas ici, puisqu'ils se retrouvent aux extrémités du classement. On remarque donc ici que la nature dure ou molle du métal n'est pas la seule propriété qui intervient dans le processus de complexation.

Une seconde règle veut classer l'affinité des métaux intermédiaires et du groupe B pour un groupe de ligand donné sur la base de leur électronégativité. Le classement suivant est établie par Stumm and Morgan 1966 : Ni(II) ~ Co(II) < Cd(II) < Cu(II) < Pb(II). Là encore, l'électronégativité des cations métalliques étudiés n'est pas le seul critère de sélectivité pour nos deux molécules modèles.

Une dernière règle est évoquée dans la littérature avec la série d'Irving-Williams. Cette règle établie que la constante de formation augmente selon l'ordre suivant : Co(II) < Ni(II) < Cu(II) < Zn(II) (Mantoura et al 1978). Une fois encore les classements obtenus ne suivent pas cette règle. Les évolutions des constantes de formation obtenues en fonction de la nature du ligand sont donc dues à une combinaison de plusieurs facteurs tels que le caractère de Lewis (dur ou mou) du ligand et du métal mais aussi de l'électronégativité, des variations stériques et des énergies de solvation du cation métallique. Il faut souligner également que ces différentes théories sont basées sur des critères cinétiques et ne prennent pas en compte le critère thermodynamique.

b) Propriétés spectrales

Il est intéressant de comparer la signature spectrale des différents complexes obtenus. Cette comparaison peut se faire à deux niveaux : d'une part en regardant comment évolue pour un ligand donné, la bande du complexe lorsque l'on fait varier le cation et d'autre part en observant les positions relatives des bandes pour les complexes impliquant le même cation.

- Absorption UV-Visible

La Figure 14 illustre la bande d'absorption, de plus faible énergie, normalisée pour les complexes 1:1 de la 3-OHF et 3-OHFT.

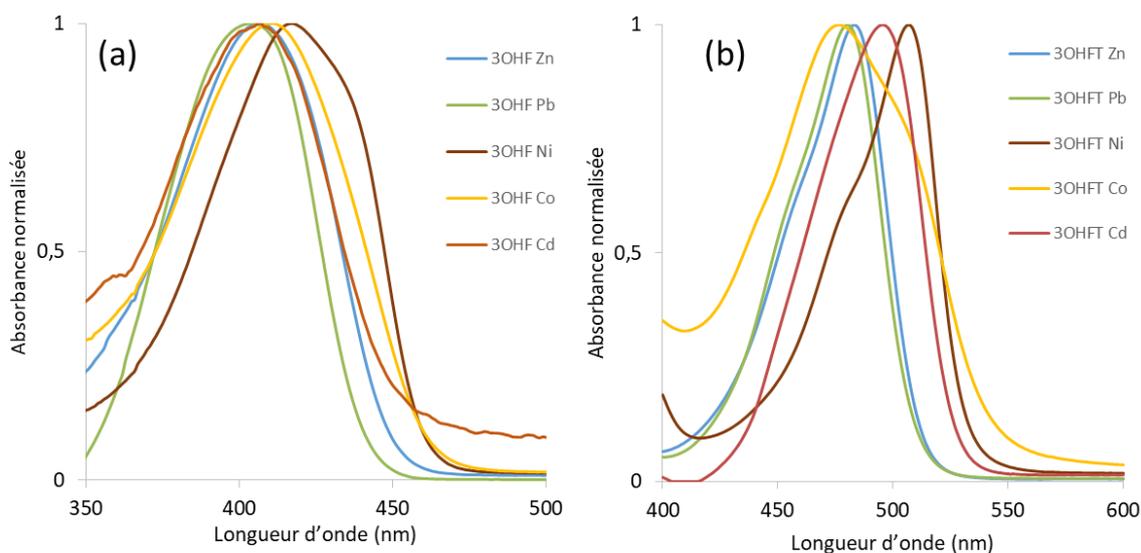


Figure 14 : bande d'absorption normalisée des complexes formés avec la 3-OHF (a) et la 3-OHFT (b) pour les différents cations métalliques étudiés.

Pour la 3-OHF, la bande dans les grandes longueurs du complexe présente un maximum qui varie entre 405 et 419 nm. En ce qui concerne la 3-OHFT, la gamme spectrale du maximum d'absorption est un peu plus large et s'étend de 477 à 507 nm. Sans toutefois être majeure, la nature du cation métallique a une plus grande influence sur la bande des complexes de 3-OHFT que celle des complexes de 3-OHF. Ces variations peuvent notamment s'expliquer par la taille du cation qui modifie de manière sensible la géométrie au niveau du site de fixation (notamment les longueurs de liaison métal-ligand comme le montre le Tableau 4). Ces modifications engendrent alors des changements faibles de la répartition de la densité électronique sur l'ensemble de la structure du ligand, ce qui induit de légers déplacements du maximum d'absorption. L'ensemble des coordonnées cartésiennes des complexes calculées est regroupé en Annexe. Le calcul des spectres d'absorption par TD-DFT reproduit bien les tendances observées expérimentalement. Ainsi par exemple, la transition de plus basse énergie calculée pour les complexes de la 3-OHF passe de 404 nm pour Pb(II) à 425 nm pour Ni(II) ; ce résultat est très cohérent avec ce qui est observé expérimentalement.

	3-OHF		3OHFT	
	O3-M	X-M	O3-M	X-M
Cd(II)	2,209	2,313	2,248	2,555
Co(II)	1,994	2,094	1,991	2,411
Ni(II)	1,992	2,032	1,981	2,378
Pb(II)	2,247	2,344	2,280	2,702
Zn(II)	1,997	2,076	2,002	2,383

Tableau 4 : Longueurs de liaison (en Å) au niveau du site de fixation de l'ion métallique (M) calculées pour les différents complexes. X = O pour 3-OHF et X = S pour 3-OHFT.

Il est également intéressant de noter l'allure générale de cette bande d'absorption. En effet, la forme des bandes d'absorption dans la gamme spectrale présentée semble résulter de différentes contributions. Cette observation est fortement marquée pour les complexes de Ni(II) et Co(II) dont les bandes d'absorption semblent être composées de deux contributions. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces deux contributions. La première hypothèse envisagée est la présence en solution de deux espèces différentes de stœchiométrie 1:1. La différence réside alors dans la sphère de coordination du métal ; une espèce ne comporterait que des molécules de solvant, tandis qu'une fonction hydroxyle coordonnée au cation métallique pourrait être présente dans la seconde espèce. La présence d'un hydroxyle modifie la charge du complexe et par conséquent peut induire des modifications spectrales facilement détectables. Pour vérifier cette hypothèse, les spectres d'absorption du complexe $[3\text{-OHFT_Co}]^+$ pour un rapport molaire constant de 5 ont été enregistrés en faisant varier le pH entre 3 et 8,2. Le faisceau de spectres est présenté sur la Figure 15.

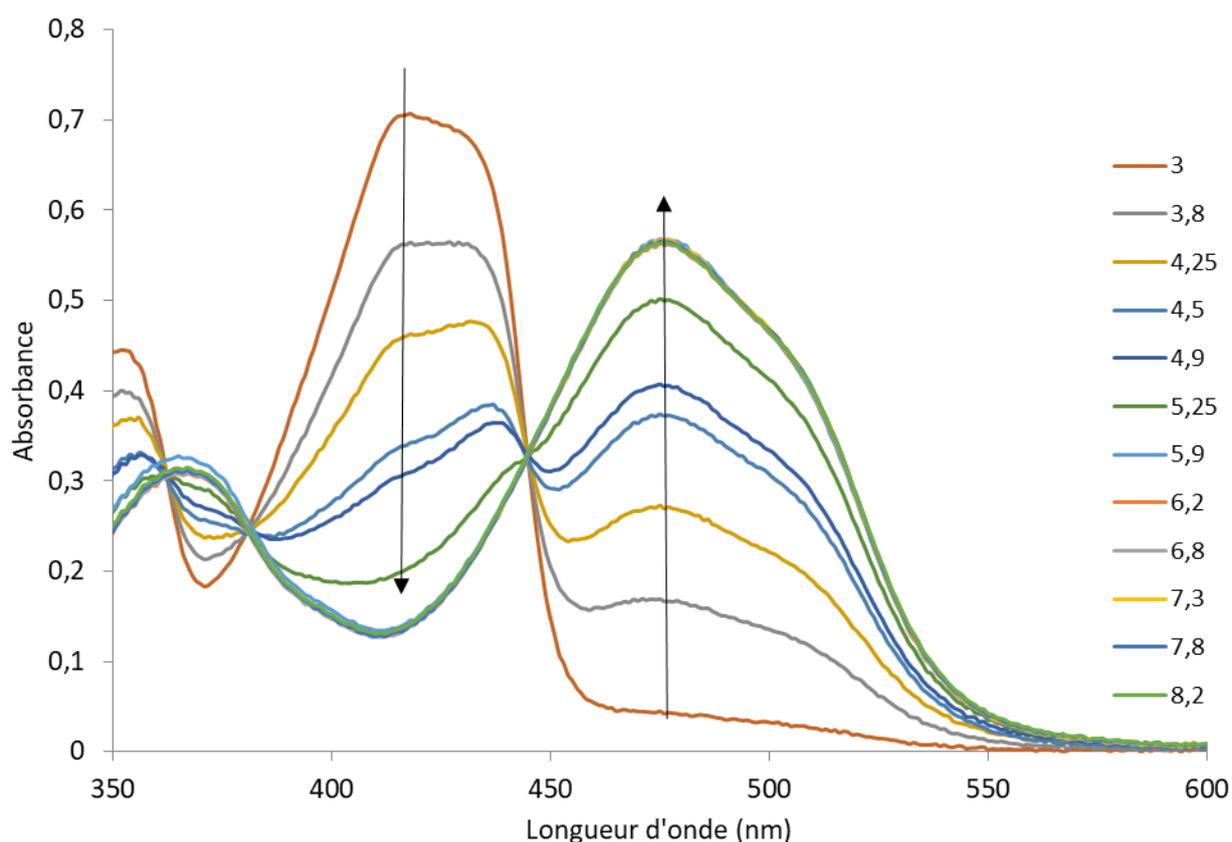


Figure 15 : Evolution des spectres d'absorption en fonction du pH (de 3 à 8,2) d'une solution de 3-OHFT et de Co(II) pour R=5.

La bande d'absorption entre 450 et 550 nm, due à la formation du complexe, reste inchangée en termes de longueurs d'onde et des intensités relatives des maxima mesurées à 476 et 505 nm. Les variations d'absorbances sont quant à elles dues à l'augmentation de la formation du complexe du fait d'une déprotonation plus aisée lors de l'augmentation du pH. On peut d'ailleurs observer qu'à partir d'une valeur de 5,9, l'élévation du pH n'a plus aucune influence sur l'intensité de la bande d'absorption et donc dans la formation du complexe, ce qui tend à confirmer qu'à ce pH le ligand est totalement déprotoné. Ainsi, on peut conclure que les deux maxima mesurés pour le spectre du complexe $[3\text{-OHFT_Co}]^+$ ne peuvent pas être le résultat de deux espèces qui diffèrent par la présence d'une fonction hydroxyle dans la sphère de coordination du métal. Si cela était le cas, la formation du complexe présentant un hydroxyle dans la sphère de coordination serait favorisée par l'augmentation du pH et les intensités relatives des deux contributions n'évolueraient pas de la même manière.

Ce résultat a également été vérifié pour l'ensemble des complexes par des calculs de chimie quantique. Les structures des complexes avec et sans OH^- dans la sphère de coordination du métal ont été optimisées et les spectres d'absorption électronique ont ensuite été calculés par TD-DFT. Les transitions calculées pour les deux hypothèses structurales sont trop proches en termes de longueurs d'onde pour expliquer la forme asymétrique de la bande d'absorption des complexes 1:1. Ainsi, l'hypothèse de la coexistence de deux formes complexées différentes peut être exclue. Cette conclusion est valable pour les deux ligands et l'ensemble des ions métalliques étudiés. Si nous nous concentrons plus attentivement sur la bande d'absorption située dans les grandes longueurs d'onde et qui est caractéristique du complexe, on constate que celle-ci est décrite par plusieurs transitions pour Ni(II) et Co(II). On observe sur la Figure 16, qui représente le spectre expérimental ainsi que les différentes longueurs d'onde calculées pour le complexe formé entre les ions Co(II) et la 3-OHFT, au moins quatre transitions électroniques sont calculées pour décrire la bande de faible énergie.

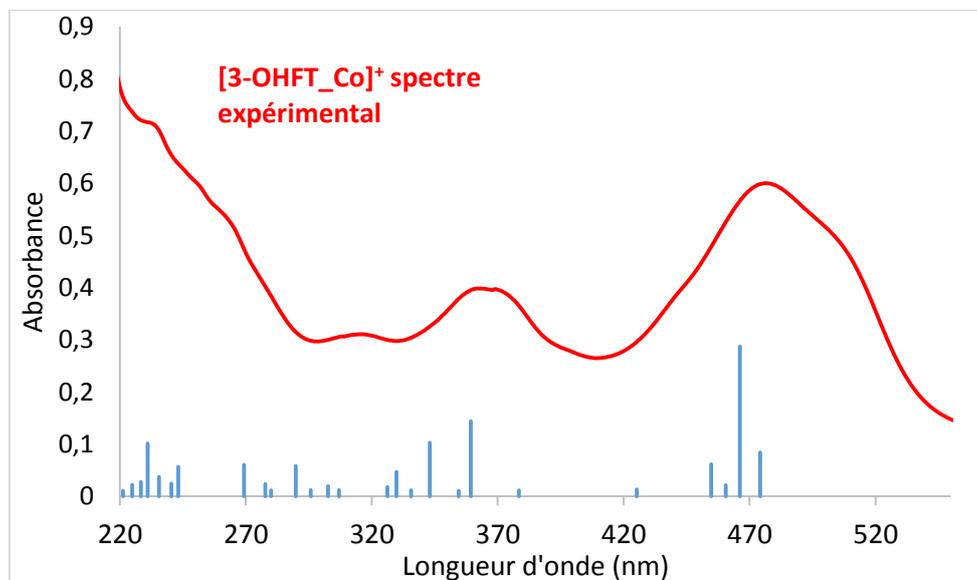


Figure 16 : Comparaison du spectre expérimental du complexe 1:1 de $[3\text{-OHFT_Co}]^+$ obtenu à partir de méthodes chimiométriques et des transitions électroniques calculées pour le complexe.

Ce phénomène s'explique par l'implication des orbitales d du métal dans les différentes transitions calculées. Cette observation est également valable pour les complexes obtenus avec Ni(II), mais dans ce cas les forces d'oscillateur sont plus faibles. Le nickel et le cobalt sont des éléments de transition et sont naturellement différents des autres métaux étudiés qui ne présentent pas de sous-couche d partiellement occupée. En effet, par exemple le spectre expérimental et les transitions calculées pour le complexe $[3\text{-OHFT_Zn}]^+$ sont présentés sur la Figure 17.

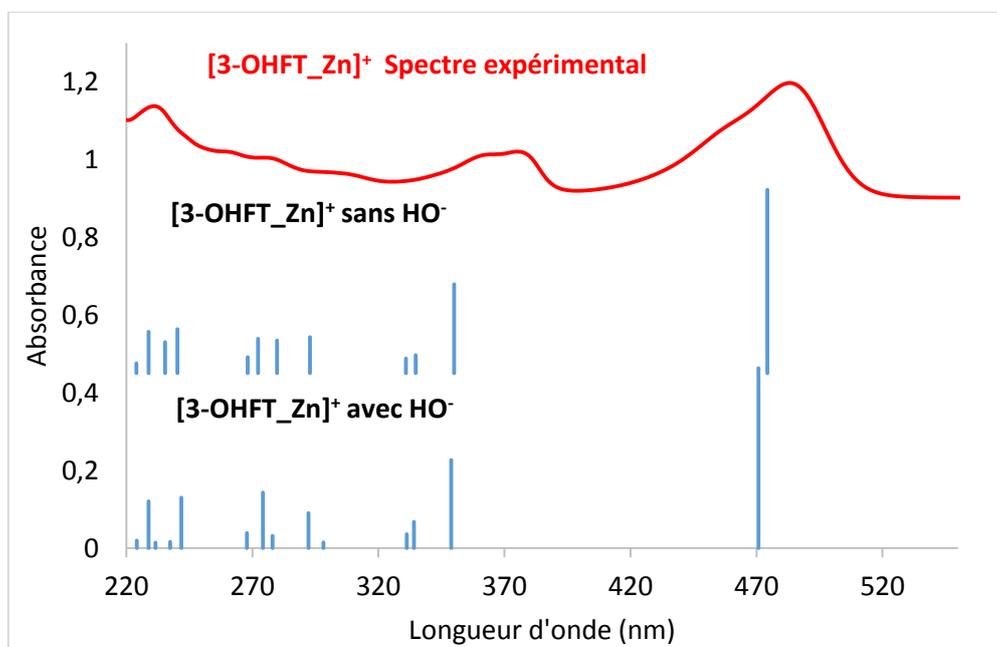


Figure 17 : Comparaison du spectre expérimental du complexe 1:1 de 3-OHFT/Zn(II) obtenu à partir de méthodes chimiométriques et des transitions électroniques calculées pour le complexe sans hydroxyle et avec hydroxyle coordonné au métal.

On observe qu'une seule transition est calculée pour caractériser la bande d'absorption située dans les grandes longueurs d'onde (le spectre calculé du complexe comportant un OH⁻ fixé au zinc est également reporté sur la Figure 17 pour montrer la très faible influence spectrale de la présence de cet anion dans la sphère de coordination). Les spectres calculés pour les autres complexes impliquant Cd(II) et Pb(II) conduisent au même résultat.

Ainsi, si l'allure générale des bandes des complexes obtenus avec Ni(II) et Co(II) peut s'expliquer avec l'implication de plusieurs transitions électroniques, il n'en est pas de même pour les autres cations. Dans ces autres cas, seule une structure vibronique permet d'expliquer les épaulements visibles sur les spectres (des calculs de chimie quantique sont en cours pour confirmer cette dernière hypothèse).

- Emission de fluorescence

En ce qui concerne les spectres de fluorescence, on a déjà noté que les seuls complexes fluorescents sont obtenus avec les ions Zn(II), Pb(II) et Cd(II), indépendamment du ligand considéré (Figure 13). On peut observer que dans ces cas, le déplacement de Stokes est beaucoup plus important pour les complexes formés à partir de la 3-OHF (67 à 77 nm) que celui enregistré pour les complexes de la 3-OHFT (29 à 33 nm). Pour les complexes de la 3-OHF, la valeur est proche de celle du ligand libre (60 nm) ce qui signifie que l'influence du métal est faible sur ce paramètre. Le déplacement de Stokes calculé pour les complexes de la 3-OHFT ne peut pas être comparé à celui du ligand libre (car non fluorescent), mais la faible valeur laisse supposer que le réarrangement structural à l'état excité est faible en comparaison de celui de la 3-OHF.

En ce qui concerne les complexes obtenus avec Ni(II) et Co(II), il a été montré que ces éléments de transition provoquent, quel que soit le ligand, un quenching de fluorescence. Ce phénomène peut s'expliquer par la participation des orbitales d du métal aux orbitales moléculaires qui vont être mises en jeu dans la désexcitation non radiative.

III. Complexation du Cu(II) par la 3-OHF et la 3-OHFT

Une étude similaire a été réalisée en étudiant la complexation des deux molécules modèles et le cation Cu(II). Dès le début de l'étude, un problème est apparu. En effet au pH utilisé précédemment (pH=5), une précipitation est observée pour les deux ligands étudiés. Ce précipité est constitué d'un mélange d'hydroxyde de cuivre et des possibles complexes formés. Cette précipitation empêchant toute étude par spectroscopie électronique, il a été décidé de faire varier le pH et la quantité de métal ajouté afin de trouver les conditions expérimentales optimales pour étudier la réaction de complexation.

Dans le cas de la 3-OHFT, quel que soit le pH et même à très faible concentration en Cu(II), il y a formation d'un précipité rouge brique, la solution initialement jaune devient rouge (voir Figure 18), laissant ainsi supposer la formation d'un complexe insoluble. Ce précipité rend l'étude du ou des complexes formés impossible en spectroscopie électronique.

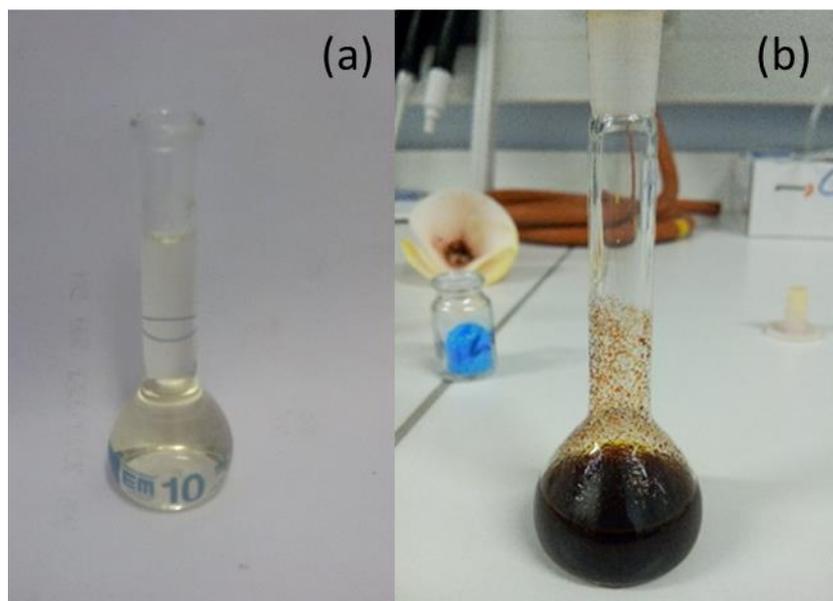


Figure 18 : Solution de 3-OHFT ($4 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹) dans du méthanol (a) et solution de 3-OHFT contenant du Cu(II) (b).

Dans le cas de la 3-OHF, une précipitation d'hydroxyde de cuivre est observée pour des rapports molaires d'environ 3 pour des pH supérieurs à 4,5. Il a donc été choisi pour le reste de l'étude de travailler à un pH = 4.

Même si aucune comparaison qualitative ou quantitative ne pourra être faite entre la 3-OHF et la 3-OHFT concernant la complexation de Cu(II). Il nous a semblé intéressant de poursuivre l'étude sur le système 3OHF-Cu(II) dans la mesure où la littérature ne comporte aucune étude sur cette complexation, alors que tous les métaux ou métalloïdes sont passés en revue.

1. Suivi de complexation par spectroscopie UV-Visible

a) Méthode des rapports molaires

Dans une première étape, la méthode des rapports molaires, appliquée lors des précédents suivis de complexation, a été utilisée pour évaluer les stœchiométries des complexes formés. La Figure 19 montre l'évolution des spectres UV-visible du système 3-OHF-Cu(II) pour des rapports molaires variant de 0 à 5. Pour plus de clarté, un nombre limité de spectres a été inclus dans le graphique.

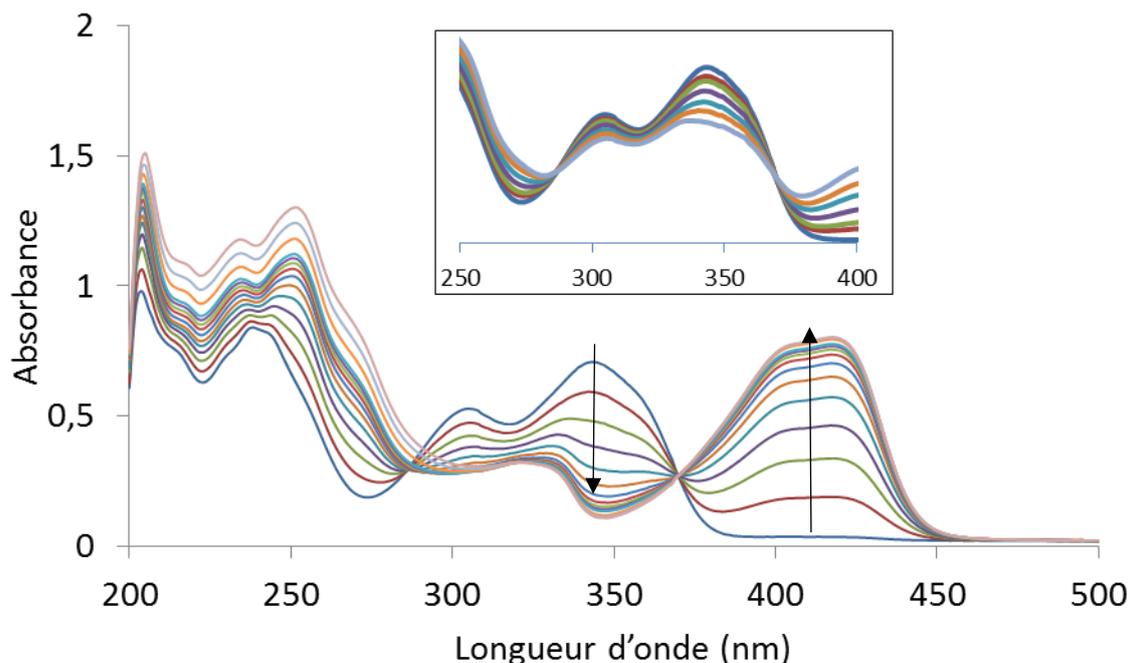


Figure 19 : Evolution des spectres d'absorption UV-visible de la 3-OHF ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), lors de la complexation avec Cu(II), dans le méthanol à pH=4, pour des rapports molaires allant de 0 à 5. Encart : faisceau de spectres pour un rapport compris entre 0 et 0,4.

Comme pour les autres cations métalliques étudiés, l'intensité des bandes la et lb diminue avec la quantité de sel métallique ajouté, alors qu'une bande double à 404 et 418 nm apparaît. Pour de faibles rapports molaires, jusqu'à $R = 0,4$, deux points isobestiques sont observés respectivement à 288 et 370 nm. Ensuite, ces points caractéristiques d'un équilibre simple entre les ligands libre et

complexé disparaissent avec l'addition d'une plus grande quantité d'ions métalliques. Cette observation, beaucoup plus marquée pour le point à 288 nm, suggère l'existence d'équilibres multiples entre les espèces en solution. Cependant la méthode des rapports molaires à 343 nm (Figure 20) montre une inflexion à $R = 1$, ce qui indique une stœchiométrie 1:1 pour le complexe formé.

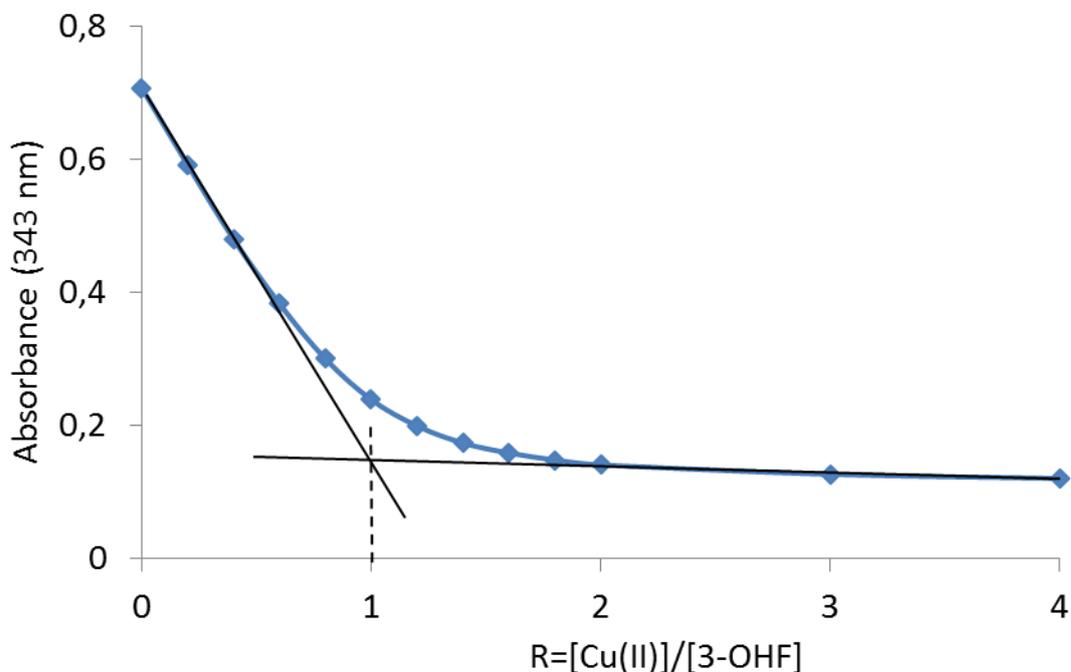


Figure 20 : Méthode des rapports molaires pour le système 3-OHF_Cu(II).

L'application des méthodes chimiométriques n'a pas permis l'obtention du spectre du complexe ainsi que la constante apparente de formation. L'application de la méthode EFA (cf chapitre 2) suggère la présence d'au moins deux complexes en solution, comme le suggérait l'analyse du faisceau de spectres. Une seconde méthode de détermination des stœchiométries a donc été envisagée pour valider ces hypothèses.

b) Méthode des variations continues

La seconde étape consiste donc en l'application de la méthode de Job ou dites des variations continues. Cette méthode a été développée par Job (1928) pour des cas simples où il n'y a qu'un complexe en équilibre avec le ligand et généralisée par la suite à des cas plus complexes (Vosburgh et al. 1941). Cette méthode consiste à étudier la variation de l'absorbance au maximum de longueur d'onde de la molécule ou du complexe en fonction de la fraction molaire de ligand X_L :

$$X_L = \frac{[L]_{totale}}{[L]_{totale} + [M]_{totale}} = \frac{[L]_{totale}}{C_{totale}}$$

Dans cette méthode, pour un volume constant, on mélange dans des proportions différentes des solutions équimolaires de ligand et d'ions métalliques. La somme des concentrations reste constante, tandis que la fraction molaire du ligand varie. La courbe $A=f(X_L)$ permet ensuite de déterminer aisément la stœchiométrie du complexe formé.

La série des spectres d'absorption UV-vis obtenus par la méthode des variations continues dans le cas de l'étude du système 3-OHF-Cu est représentée sur la Figure 21.

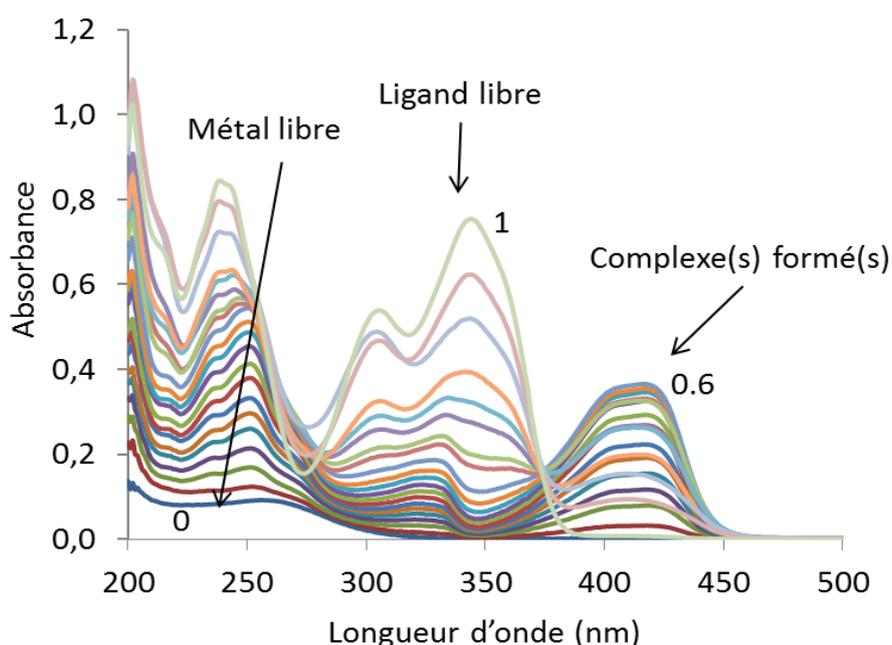


Figure 21 : Spectres UV-visible obtenus avec la méthode des variations continues pour le suivi de complexation de la 3-OHF et de Cu(II). Les nombres sur les spectres se rapportent à la fraction molaire X_{3-OHF} .

On constate que les caractéristiques spectrales des espèces libres et complexés sont très différentes et qu'il est donc relativement facile de travailler à des longueurs d'onde où seules les espèces complexées absorbent. L'absorption du cuivre se produit pour de courtes longueurs d'onde (<320 nm) et celle du ligand libre est inférieure à 380 nm. En conséquence, pour les longueurs d'ondes supérieures à celles-ci, il est possible d'observer les variations des concentrations des espèces formées, ce qui représente le cas idéal de la méthode de Job. Le graphique de la méthode de Job est représenté sur la Figure 22 (absorbance à 390 nm en fonction de la fraction molaire X_{3-OHF}).

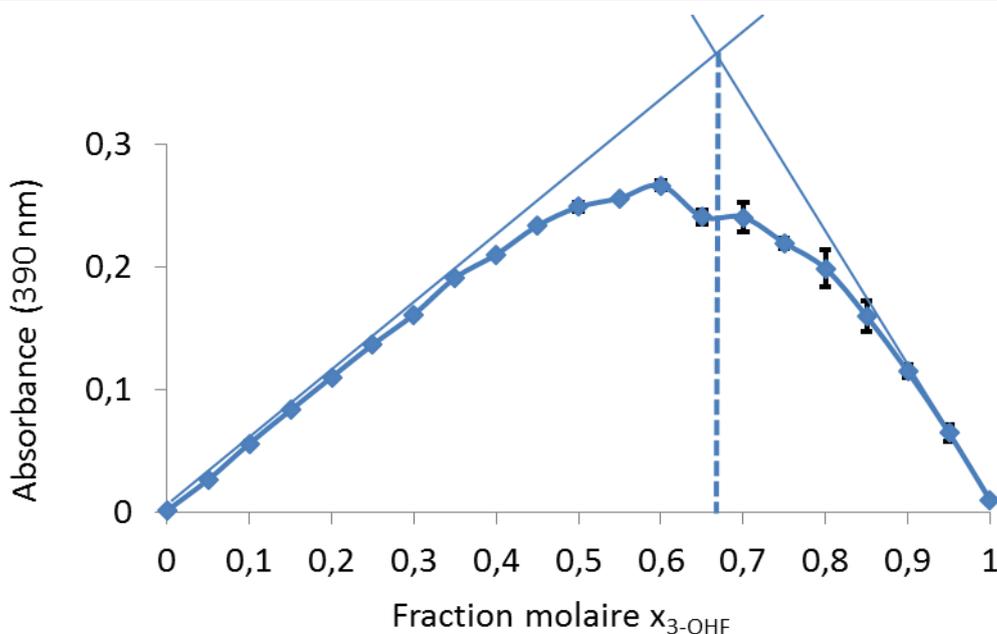


Figure 22 : Méthode de Job qui montre la stœchiométrie 1:2 pour le complexe 3-OHF_Cu(II). Les barres d'erreur sont relatives à l'écart type calculé à partir des expériences effectuées en triplicat en utilisant différentes solutions de 3-OHF et de CuSO_4 .

L'intersection des tangentes à la courbe de Job correspond à une fraction molaire $x_{3\text{HF}} = 0,66$, ce qui correspond à la formation d'un complexe de stœchiométrie 1:2. Cependant, certains changements subtils de la courbure observés sur le graphique préfigurent d'une plus grande complexité du système étudié et confirme la présence d'autres complexes avec une stœchiométrie différente et formés simultanément avec des concentrations plus faibles. Nous constatons ici une des limitations de la méthode de Job, qui réside dans la présence simultanée de plus d'un complexe en solution à des concentrations significatives et ayant des bandes d'absorption communes.

Par exemple, avec la méthode de la variation continue, (Bukhari et al. 2009) ont mis en évidence la formation d'un unique complexe 2:1 pour le système quercétine-cuivre. La quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) est un ligand de la même famille que la 3-OHF et présente trois sites de complexation en compétition. Cependant, il apparaît évident que ces sites présentent différentes affinités vis à vis du cation métallique, ce qui conduit nécessairement à la formation initiale d'un complexe 1:1 pour de faibles quantités de métal ajoutées. Cette étape est antérieure à la chélation d'un second ion métallique conduisant au complexe 2:1. Dans le cas de notre étude, le complexe 1:2 doit être prédominant et très stable car il est détecté pour de grandes quantités de Cu(II) ajoutées à la solution de 3-OHF.

Ainsi, selon la méthode utilisée pour déterminer la stœchiométrie des complexes, celle-ci est différente. On peut estimer que les deux complexes sont simultanément présents en solution et qu'ils ont des spectres d'absorption très proches à la vue des données spectrales de la Figure 19.

Le complexe de stœchiométrie 1:2 doit être formé principalement pour de petites quantités de métal ajoutées. Et c'est pour cette raison, qu'un traitement chimométrique des données a été réalisé avec les spectres enregistrés pour un rapport molaire inférieur à 0,4. Cette analyse a permis de déterminer une constante de formation apparente de $8,7 \pm 0,2$ pour le complexe 1:2. Cette valeur, qui peut sembler relativement faible pour un complexe de stœchiométrie élevée, doit être relativisée dans la mesure où la complexation a été effectuée dans un milieu acide. Il est impossible de discriminer les spectres d'absorption des complexes 1:1 et 1:2 par un traitement mathématique (programme Reactlab par exemple) et, par conséquent, la constante de formation apparente du complexe 1:1 n'a pas pu être déterminée. Néanmoins, cette seconde constante est moins intéressante puisque le complexe 1:1 est formé pour des quantités relativement importantes de métal par rapport à la concentration du ligand.

c) Interprétation des spectres d'absorption du complexe 1:2

Dans ce paragraphe, nous nous sommes focalisés sur le complexe 1:2. Après optimisation de sa géométrie, les transitions électroniques ont été calculées pour ce complexe. Dans la littérature, de nombreux exemples montrent que la fixation d'un cation métallique avec la 3-OHF se fait par chélation accompagnée par une totale déprotonation de la fonction hydroxyle. Pour cette raison, seule cette configuration a été envisagée. D'un point de vue structural, le cuivre adopte un environnement plan et les stéréo-isomères cis et trans ont été envisagés. Dans tous les cas, les ligands sont coplanaires et aucune rotation du cycle B n'est observée lors de la complexation. Les isomères cis et trans sont respectivement de symétrie C_{2v} et C_{2h} . L'isomère trans est calculé seulement $0,13 \text{ kcal.mol}^{-1}$ plus stable que le cis, par conséquent on peut estimer que ces deux formes coexistent en solution. Les structures cis et trans, quoique très proches, donnent lieu à des transitions électroniques calculées très différentes tant en longueurs d'onde que forces d'oscillateur. Cela s'explique en grande partie par la différence de symétrie entre les deux complexes. Cependant, comme l'illustre Figure 23a et 23b, les transitions calculées pour les deux complexes permettent de reproduire très bien le spectre expérimental résultant des données acquises pour des rapports molaires très faibles.

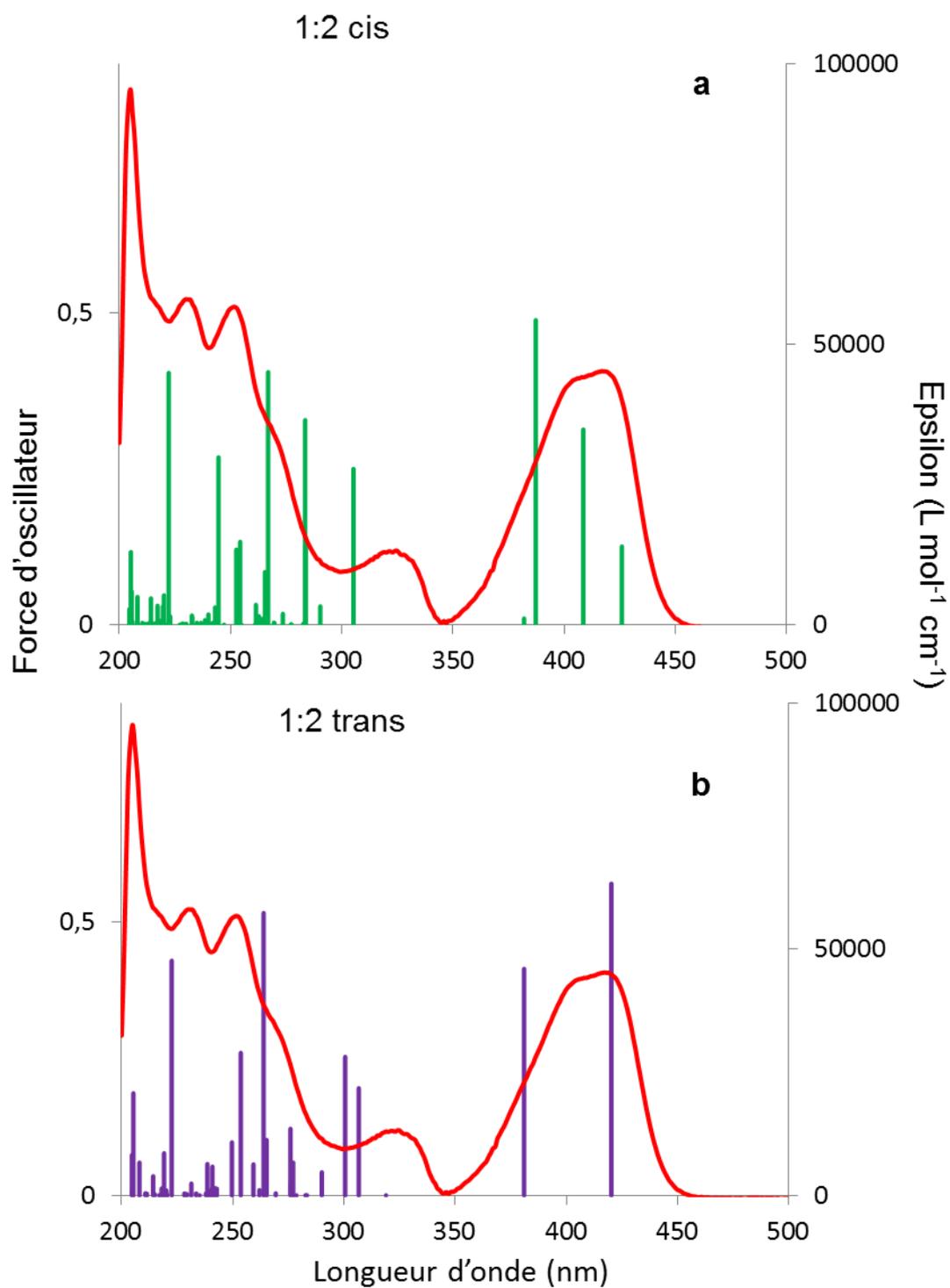


Figure 23 : Comparaison du spectre expérimental du complexe 1:2 de 3-OHF/Cu(II) obtenu à partir de méthodes chimiométriques et des transitions électroniques calculées pour le complexe cis (a) et trans (b).

Indépendamment du domaine des courtes longueurs d'onde, où le nombre de transitions calculées est très important et garantit dans tous les cas une description correcte du spectre expérimental, il est intéressant de se concentrer sur la double bande centrée autour de 410 nm. Pour ce type de composé, cette bande d'absorption correspond à une transition impliquant principalement les orbitales HOMO et LUMO situés sur le ligand (Boudet et al. 2000). Dans le cas d'un complexe biligand, les orbitales HOMO des deux ligands sont couplées en phase et en opposition de phase et il en va de même pour les orbitales LUMO. Cela donne lieu à quatre orbitales frontalières entre lesquelles il sera possible de faire quatre transitions électroniques. Cette situation est illustrée sur la Figure 24 qui représente les niveaux d'énergie des différentes orbitales moléculaires (OM) impliquées dans les excitations électroniques verticales calculées.

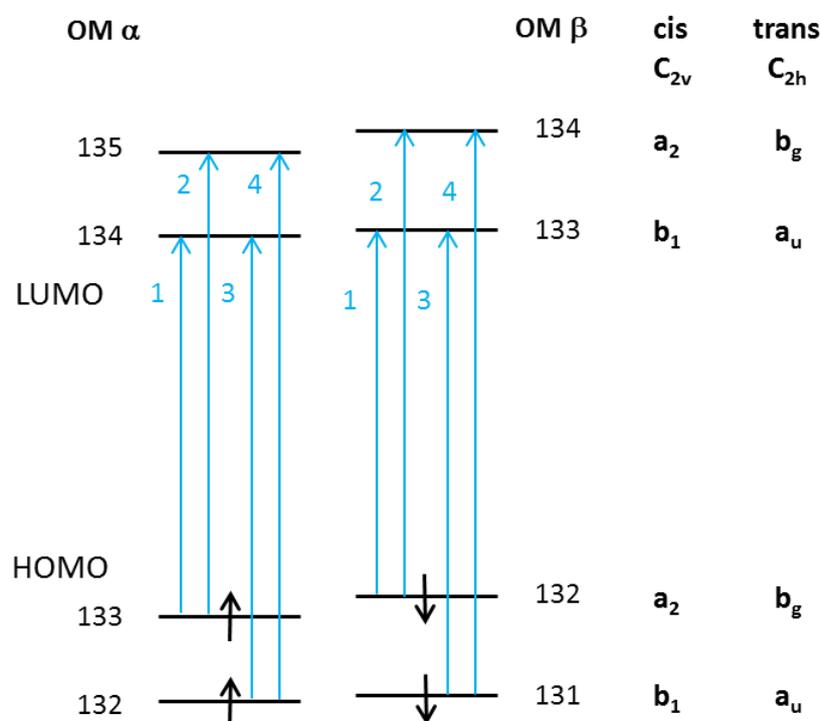


Figure 24 : Diagramme d'énergie des O.M. mises en jeu dans les transitions de plus faibles énergies du complexe 1:2 et symétrie de ces orbitales.

Les orbitales moléculaires α et β sont décalées en énergie l'une par rapport à l'autre en raison de la présence d'une orbital α occupée, impliquant principalement une orbitale d du cuivre (OM 127 α) et l'orbitale β correspondante plus élevée en énergie (OM 135 β). Le diagramme illustre également les quatre transitions possibles entre les orbitales frontalières pour les complexes cis ou trans. En fonction des espèces de symétrie des orbitales moléculaires, les règles de sélection montrent que les quatre transitions sont autorisées pour le complexe cis, alors que seules deux sont permises pour le complexe trans. En effet les transitions $b_g \leftarrow b_g$ et $a_u \leftarrow a_u$ sont interdites.

Cela explique la présence de quatre composantes avec des forces d'oscillateur plus ou moins importantes pour décrire la bande du complexe cis, tandis que seules deux composantes sont calculées pour le complexe trans. Il est donc envisageable que la bande de faible énergie du complexe 1:2 résulte de la somme de 6 composantes relatives aux formes cis et trans.

2. Spectroscopie de fluorescence

La complexation de Cu(II) par la 3-OHF a également été suivie par spectroscopie de fluorescence. Dans un premier temps le spectre d'émission a été enregistré après chaque ajout de sel métallique dans la solution en conservant le pH constant (pH = 4). La longueur d'onde d'excitation correspond au maximum d'absorption du complexe (418 nm). Le faisceau de spectres obtenu pour des rapports molaires variant de 0 à 10 est représenté sur la Figure 25. Pour un rapport molaire de 0, sans addition de Cu(II), une bande de fluorescence apparaît avec une émission maximale à 477 nm. Ce spectre est caractéristique de la forme déprotonée de la 3-OHF. Cette forme présente un rendement quantique important qui fait qu'elle est détectable même pour de très faibles concentrations, notamment à pH = 4. Dans un premier temps, lors des premiers ajouts, cette bande diminue en intensité sans que l'on puisse détecter un autre signal de fluorescence. Concrètement, cela signifie qu'un complexe se forme et qu'il ne présente aucune fluorescence. A partir d'un rapport molaire de 0,5, on voit apparaître une bande d'émission de faible intensité centrée sur 455 nm. L'intensité de cette bande croît puis décroît avec l'ajout de sel de cuivre. On a donc l'apparition d'un second complexe fluorescent qui disparaît ensuite au profit d'un autre complexe non fluorescent. Pour illustrer ces variations, les intensités de fluorescence mesurées à 455 nm en fonction du rapport molaire ont été tracées sur la Figure 26. On peut voir que le maximum d'émission est obtenu pour un rapport molaire de 1,5. Cette valeur signifie, selon la méthode des rapports molaires, que le complexe fluorescent disparaît en faveur de la formation d'un autre complexe de stœchiométrie 3:2. On peut émettre l'hypothèse d'une formation initiale d'un complexe 1:2 non fluorescent, suivi d'un complexe 1:1 fluorescent qui disparaîtrait au profit de la formation d'un complexe 3:2. Ce mécanisme permettrait d'expliquer les stœchiométries différentes observées avec les deux méthodes utilisées en absorption, l'absence de point isobestique sur l'ensemble du faisceau et l'impossibilité de fitter les données au moyen de méthodes chimométriques. Cependant, au vu de l'allure du faisceau de spectres d'absorption, le spectre du complexe 1:2 semble prédominant jusqu'à la fin du dosage.

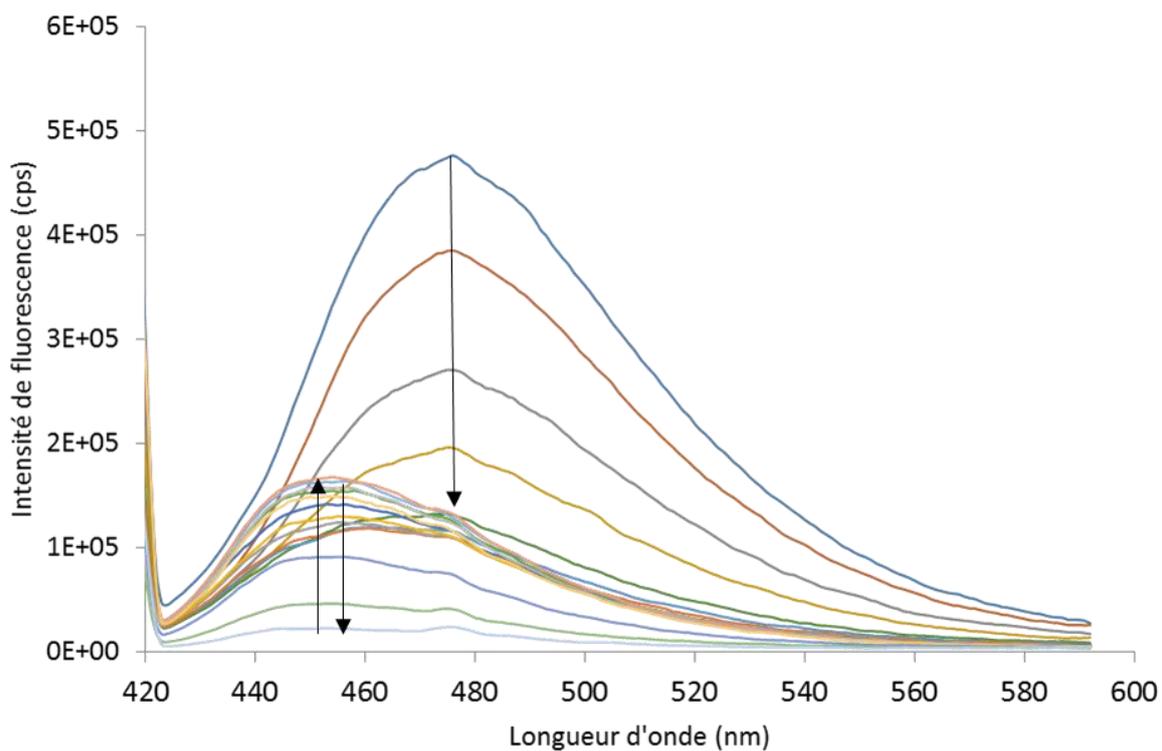


Figure 25: Evolution des spectres d'émission de fluorescence excités à 418 nm de la 3-OHF ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), lors de la complexation avec Cu(II), à pH=4, pour des rapports molaires allant de 0 à 10.

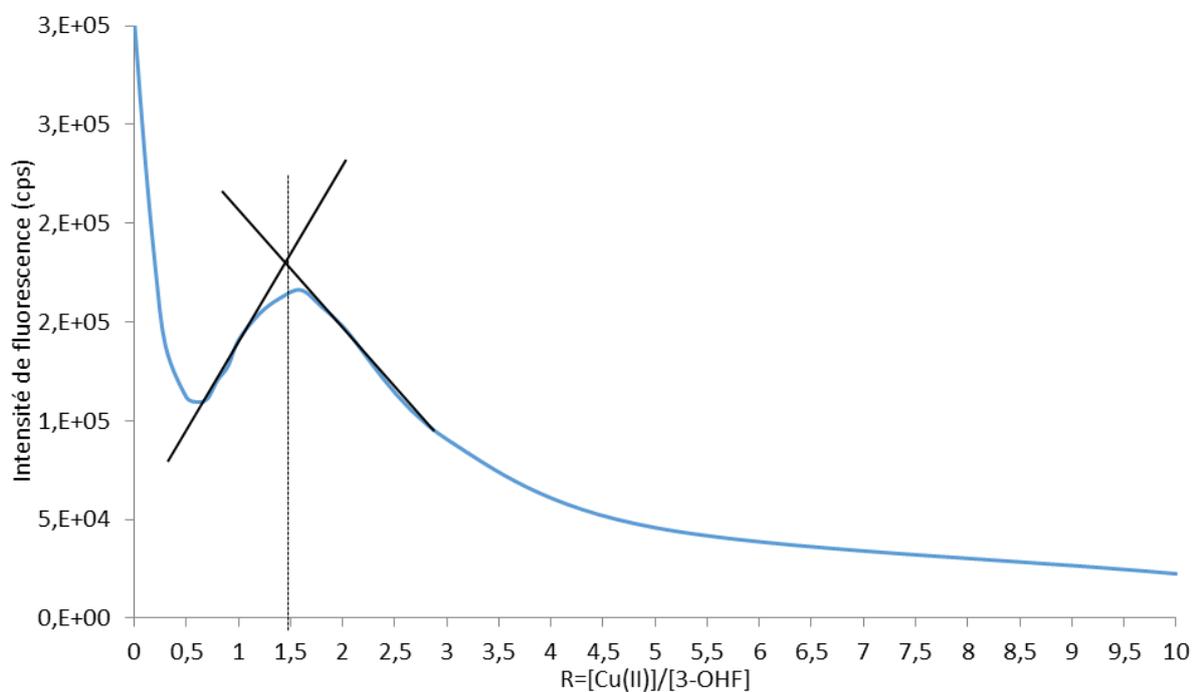


Figure 26 : Variation de l'intensité de fluorescence à 477 nm des spectres d'émission de fluorescence pour le système 3-OHF_Cu(II) pour des rapports molaires allant de 0 à 10.

Dans un second temps, le spectre d'excitation de fluorescence d'une solution de rapport molaire $R = 1$ a été enregistré en observant le signal au maximum d'émission du complexe intermédiaire, soit 455 nm. Ce spectre est représenté sur la Figure 27 (spectre a) ainsi que le spectre d'absorption enregistré pour un même rapport molaire (spectre b). On observe très nettement un décalage en longueurs d'onde entre les spectres a et b, surtout pour la bande de faible énergie dont le maximum se trouve à 393 nm. Ce décalage confirme nos hypothèses précédentes, le spectre b correspond majoritairement au complexe 1:2, tandis que le spectre a correspondrait au complexe 1:1. Ce dernier serait en très faible concentration et présenterait ainsi une contribution très faible au spectre a. De plus, la faible concentration du complexe 1:1 peut se comparer à la faible concentration du ligand déprotoné, deux espèces qui présentent des signaux de fluorescence du même ordre de grandeur.

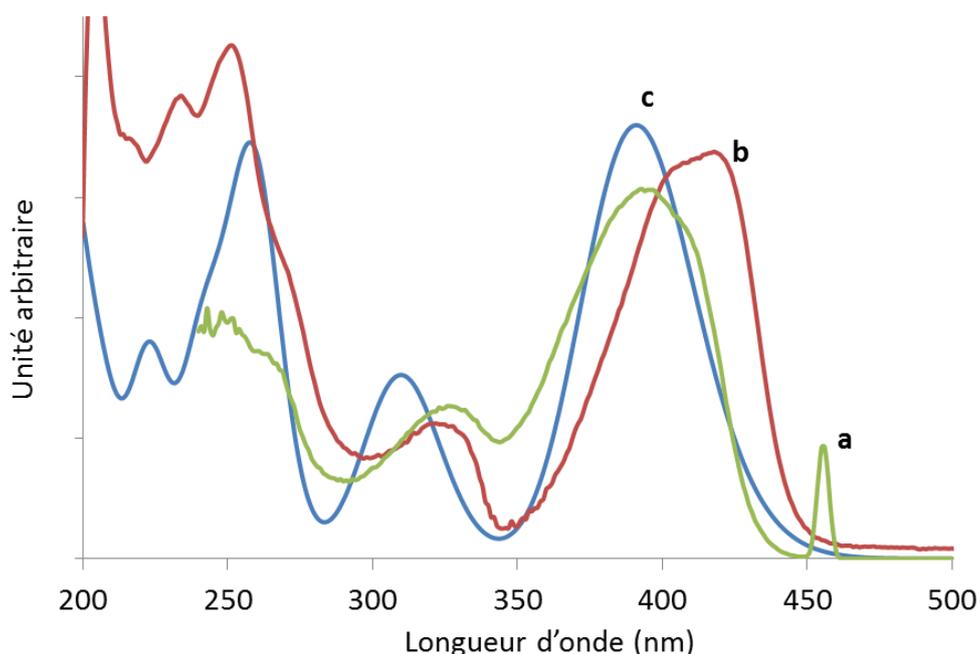


Figure 27 : Spectre d'excitation de fluorescence pour $\lambda_{em}=455$ nm (a) et spectre d'absorption (b) pour le système 3-OHF/Cu(II) pour $R=1$ et spectre calculé par TD-DFT du complexe 1:1 (c).

Afin de confirmer de manière définitive la stœchiométrie du complexe fluorescent, un troisième spectre (spectre c) a été ajouté sur la Figure 27. Ce spectre correspond au spectre d'absorption calculé par TD-DFT à partir de la structure du complexe 1:1 (ce spectre a été représenté en prenant une largeur à mi-hauteur arbitraire des bandes de 3000 cm^{-1}). On observe une parfaite adéquation entre spectre d'absorption calculé et le spectre d'excitation expérimental, notamment dans la bande de grandes longueurs d'onde calculée à 391 nm (force d'oscillateur 0,49). Même si la transition calculée à 313 nm reproduit un peu moins bien la bande observée dans le spectre d'excitation à 325 nm, on peut néanmoins conclure quant à la stœchiométrie de l'espèce fluorescente qui correspond bien au complexe 1:1.

Conclusion

Dans ce chapitre, l'utilisation conjointe des techniques de spectroscopies électroniques et de calculs de chimie quantique a permis de discuter l'influence de la substitution d'un atome d'oxygène de la 3-OHF par un atome de soufre. De plus, l'interaction entre ces deux molécules modèles de MOD avec des cations métalliques d'intérêt environnemental a été étudiée et nous avons pu déterminer quantitativement l'influence de cet atome de soufre par l'obtention des constantes de formation apparente.

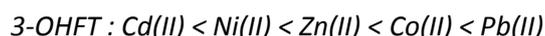
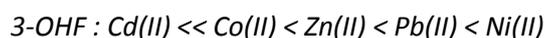
Dans un premier temps, une étude sur les différences engendrées par cette substitution sur les propriétés spectroscopiques de la molécule a été réalisée. D'un point de vue structurale il a été démontré que la 3-OHFT comme la 3-OHF présente une liaison hydrogène intramoléculaire très forte. Ce résultat assez surprenant montre en effet que la liaison O-H...S est aussi forte que la liaison O-H...O. Concernant les propriétés spectroscopiques, la forme générale des spectres d'absorption est similaire pour les deux molécules cependant un important effet bathochrome de la bande I est observé lors de la substitution de l'oxygène par le soufre. De plus une sous structure est observée pour les bandes d'absorption de la 3-OHFT. Les calculs TD-DFT ont montré que les transitions impliquent des orbitales moléculaires assez similaires dans les deux cas, mais les densités électroniques sont très différentes autour du chalcogène pour les deux flavonoïdes. Une seule transition majeure est calculée pour la bande I de la 3-OHFT, ceci laisse donc supposer que la forme de la bande I de la 3-OHFT est due à une structure vibronique. Une émission de fluorescence duale a été enregistrée pour la 3-OHF, alors qu'aucune fluorescence n'a été observée pour la 3-OHFT. Les calculs de chimie quantique ont également permis d'expliquer cette différence. L'absence totale d'émission de la 3-OHFT s'explique par la nature interdite de la transition du premier état excité qui a un caractère $n\pi^*$.

Ces différences spectrales entre la 3-OHF et la 3-OHFT sont toujours présentes lors de la complexation avec les cations métalliques étudiés. La position de la bande d'adsorption du complexe se décale vers les plus basses énergies dans le cas de la complexation avec la 3-OHFT comme observé pour les ligands libres. Cependant, nous avons pu constater que l'allure de la bande d'absorption du complexe diffère légèrement selon le cation métallique complexé. Cet effet peu marqué dans le cas de la 3-OHF se résume en un déplacement de la longueur d'onde maximale qui est attribué à la géométrie et la distance entre la molécule et les cations considérés. En ce qui concerne les spectres obtenus avec la 3-OHFT, non seulement il existe un déplacement qui s'avère être plus important mais en plus une structuration des bandes du complexe apparaît. Différents épaulements sont observés. Les calculs de chimie quantique ont permis d'expliquer cette allure pour les complexes formés avec Ni(II) et Co(II) : plusieurs transitions électroniques, qui sont dues à l'implication des orbitales d de ces

métaux, sont calculées pour décrire la bande I du complexe. Pour les autres cations complexés, la présence d'une structure vibronique pourrait être à l'origine de ces épaulements mais cette hypothèse reste encore à vérifier.

Le cas du Cu(II) est particulier, une précipitation immédiate a rendu impossible le suivi de la complexation avec la 3-OHFT. Par contre pour la 3-OHF, le suivi a été possible en ajustant le pH de la solution (pH = 4). Dans ce cas, le spectre UV-visible est notablement différent de ceux enregistrés avec les cations précédents. En effet, la bande I du complexe est caractérisée par une double bande. Les calculs de chimie théorique ont permis d'expliquer cette double bande. En effet, le complexe formé correspond essentiellement à un complexe 1:2 présentant une géométrie plane. De plus les ligands étant di-symétriques, ce complexe est donc caractérisé par des isomères *cis* et *trans* possédant des transitions électroniques différentes. Il ressort donc que cette double bande correspond à la contribution de ces deux isomères. La formation d'un complexe 1:1 a également été mise en évidence par spectroscopie de fluorescence d'émission et d'excitation. L'étude de ce système qui présente une grande « complexité » est originale et fait à elle seule l'objet d'une publication en cours de rédaction.

L'étude de la complexation des deux flavonoïdes a permis aussi de mettre en évidence de nombreux résultats quantitatifs. Dans un premier temps, les stœchiométries et les constantes de formation ont été trouvées pour la chélation des deux ligands avec les cations métalliques Zn(II), Pb(II), Ni(II), Co(II) et Cd(II). Quelle que soit la nature du ligand et du cation, une stœchiométrie 1:1 est déterminée pour le complexe formé. De plus, la constante apparente de formation obtenue pour la 3-OHFT est toujours supérieure à celle obtenue pour la 3-OHF d'un facteur 2 à 150. Il apparaît que nous obtenons des résultats similaires avec les deux techniques spectroscopiques étudiées. La fonction hydroxy-thiocétone est donc plus complexante que la fonction hydroxy-cétone. Toutefois, on peut noter que la 3-OHF montre une plus grande sélectivité vis-à-vis des cations métalliques étudiés que la 3-OHFT. Grace à ces résultats, il est possible de proposer un classement d'affinité des cations métalliques pour les deux fonctions étudiées :



Il est important de noter que le pouvoir complexant de la hydroxy-thiocétone est toujours supérieure à celle de l'hydroxy-cétone et cela quel que soit le métal. Ces deux molécules modèles ont donc une affinité moindre pour le Cd(II), modérée pour le Zn(II) et plus forte pour le Pb(II). Cu(II) n'apparaît pas dans ce classement pour les raisons évoquées précédemment et de plus lorsqu'il est complexé avec la 3-OHF, il donne un complexe de stœchiométrie 1:2.

Il apparaît donc dans ce chapitre que le soufre engendre des différences notables d'un point de vue réactivité lors de la complexation des ions métalliques. Ce résultat confirme aussi le pouvoir complexant plus important des fonctions soufrées et explique indirectement que les sites soufrés de la MOD vont avoir tendance à complexer de manière préférentielle les ions métalliques dissous en solution. Il est bon de rappeler que les deux modèles sont des molécules chélatantes qui présentent toutes deux une fonction hydroxyle. Il serait donc intéressant d'étudier aussi des molécules présentant d'autres fonctions oxygénées ainsi que des molécules totalement soufrées correspondantes pour voir si ces tendances observées se confirment ou sont spécifiques à la fonction thiocétone.

Références bibliographiques :

Amaral, V., D. Graeber, D. Calliari and C. Alonso (2016). "Strong linkages between DOM optical properties and main clades of aquatic bacteria." Limnology and Oceanography **61**(3): 906-918.

Boudet, A. C., J. P. Cornard and J. C. Merlin (2000). "Conformational and spectroscopic investigation of 3-hydroxyflavone-aluminum chelates." Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **56**(4): 829-839.

Bukhari, S. B., S. Memon, M. Mahroof-Tahir and M. I. Bhangar (2009). "Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-queracetin complex." Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **71**(5): 1901-1906.

Cornard, J. P., L. Dangleterre and C. Lapouge (2006). "DFT and TD-DFT investigation and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Zn(II)-3-hydroxyflavone complex." Chemical Physics Letters **419**(1-3): 304-308.

Davila, Y. A., M. I. Sancho, M. C. Almandoz and S. E. Blanco (2012). "Structural and spectroscopic study of Al(III)-3-hydroxyflavone complex: Determination of the stability constants in water-methanol mixtures." Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **95**: 1-7.

Falantin, C., A. Moncomble, A. Le Person and J. P. Cornard (2017). "Chalcogen substitution: Effect of oxygen-by-sulfur exchange on structural and spectroscopic properties of flavonols." Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc **187**: 49-60.

Harborne, J. B. (1964). "Biochemistry of Phenolic Compounds." Academic Press, New York.

K. R. Markham, T. J. M. (1975). "The Flavonoids." Chapman & Hall, London.

Kasha, M. (1986). "Proton-transfer spectroscopy. Perturbation of the tautomerization potential." Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics **82**(12): 2379-2392.

Klymchenko, A. S. and A. P. Demchenko (2002). "Electrochromic modulation of excited-state intramolecular proton transfer: The new principle in design of fluorescence sensors." Journal of the American Chemical Society **124**(41): 12372-12379.

Klymchenko, A. S. and A. P. Demchenko (2003). "Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer." Physical Chemistry Chemical Physics **5**(3): 461-468.

Lapouge, C. and J. P. Cornard (2005). "Time dependent density functional theory study of electronic absorption properties of lead(II) complexes with a series of hydroxyflavones." Journal of Physical Chemistry A **109**(30): 6752-6761.

Malesev, D. and V. Kuntic (2007). "Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions." Journal of the Serbian Chemical Society **72**(10): 921-939.

Mondal, S., S. Basu and D. Mandal (2009). "Ground- and excited-state proton-transfer reaction of 3-Hydroxyflavone in aqueous micelles." Chemical Physics Letters **479**(4-6): 218-223.

P, J. (1928). "Formation and stability of inorganic complexes in solution." Annali di Chimica Applicata **9**: 113-203.

Protti, S., A. Mezzetti, J. P. Cornard, C. Lapouge and M. Fagnoni (2008). "Hydrogen bonding properties of DMSO in ground-state formation and optical spectra of 3-hydroxyflavone anion." Chemical Physics Letters **467**(1-3): 88-93.

Sancho, M. I., M. C. Almandoz, S. E. Blanco and E. A. Castro (2011). "Spectroscopic study of solvent effects on the electronic absorption spectra of flavone and 7-hydroxyflavone in neat and binary solvent mixtures." International Journal of Molecular Sciences **12**(12): 8895-8912.

Sengupta, P. K. and M. Kasha (1979). "Excited state proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxyflavone and quercetin." Chemical Physics Letters **68**(2-3): 382-385.

Swinney, T. C. and D. F. Kelley (1993). "Proton transfer dynamics in substituted 3-hydroxyflavones: Solvent polarization effects." The Journal of Chemical Physics **99**(1): 211-221.

T. J. Mabry, K. R. M., M. B. Thomas (1970). "The Systematic Identification of Flavonoids." Springer-Verlag: New York, NY, USA.

Tomin, V. I. (2011). "Spectral properties of anionic form of 3-hydroxyflavone." Optics and Spectroscopy (English translation of Optika i Spektroskopiya) **110**(4): 550-556.

Voicescu, M., S. Ionescu and F. Gatea (2014). "Photophysical properties of some flavones probes in homogeneous media." Journal of Fluorescence **24**(1): 75-83.

Voirin, B. (1983). "UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B rings." Phytochemistry **22**(10): 2107-2145.

Vosburgh, W. C. and G. R. Cooper (1941). "Complex Ions. I. The Identification of Complex Ions in Solution by Spectrophotometric Measurements." Journal of the American Chemical Society **63**(2): 437-442.

Chapitre VI : Complexation de cations métalliques par des
molécules modèles oxygénées et soufrées de la famille des
polyphénols : Etude du benzènediol et du benzènedithiol

Chapitre VI : Complexation de cations métalliques par des molécules modèles oxygénées et soufrées de la famille des polyphénols : Etude du benzènediol et du benzènedithiol

I. Structure et propriétés	175
1. Structure et états de protonation	175
2. Propriétés spectroscopiques	177
II. Suivi de la complexation des cations métalliques	179
1. Etude du benzènediol	179
2. Etude du Benzènedithiol	180
3. Discussion	187
Conclusion	189
Références bibliographiques :	191

Dans le chapitre précédent, l'étude de la complexation de deux flavonoïdes a mis en évidence les capacités complexantes supérieures de la fonction hydroxy-thiocétone par rapport à la fonction hydroxy-cétone. Afin de voir si ce résultat est extrapolable à d'autres fonctions soufrées, dans ce chapitre, nous étudions la complexation des mêmes cations métalliques Cu(II), Zn(II), Pb(II), Ni(II) et Co(II) par le benzènediol et le benzènedithiol. Ces deux molécules modèles sont également issues de la famille des polyphénols et représentent les plus simples des composés organiques. Les propriétés de complexation de la fonction dithiol seront cette fois comparées à celles de la fonction diol.

Les premiers résultats obtenus pour cette étude sont exposés dans ce chapitre. La première partie détaille la structure, l'état de protonation, ainsi que les propriétés spectroscopiques des deux modèles. La seconde partie est quant à elle dédiée au suivi de complexation des différents cations métalliques étudiés. Les stœchiométries, les spectres d'absorption et les constantes apparentes de formation de chaque complexe formé seront estimés. Enfin une comparaison des propriétés de complexation sera faite entre les deux ligands benzéniques, ainsi que pour les flavonoïdes.

I. Structure et propriétés

1. Structure et états de protonation

Le benzènediol, ou plus communément appelé catéchol (BDO), et le benzènedithiol (BDT) font partie de la famille des polyphénols simples. Leur structure est composée d'un noyau benzénique et de deux fonctions alcool ou thiol. Ils existent sous la forme de trois isomères, en fonction de la position relative des deux groupements sur le noyau benzénique. Nous étudierons dans ce chapitre la forme benzène-1,2 (Figure 1).

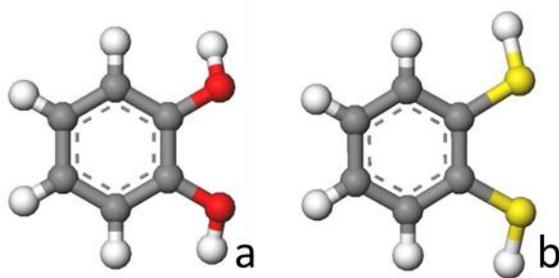


Figure 1: Structure du benzène-1,2-diol (a) et du benzène-1,2-dithiol (b).

Ces deux molécules sont planes et BDO présente une liaison hydrogène intramoléculaire importante. Des calculs de chimie quantique ont montré que l'énergie de cette liaison est de l'ordre de $4,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$. De la même manière, une liaison hydrogène intramoléculaire s'établit pour la molécule de BDT. Toutefois, le soufre étant beaucoup moins électro-négatif que l'oxygène, celle-ci présente une énergie estimée à $1,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Les pKa successifs du BDO et BDT ont été déterminés à partir des spectres UV-Visible enregistrés en fonction du pH. Ces spectres présentés en Figure 2 pour des variations de pH s'étendant de 3 à 11. Aucun point isobestique n'est observé sur la gamme complète de pH étudiée, ce qui tend à montrer qu'une double déprotonation a eu lieu. La variation de l'absorbance à des maxima d'absorption tracée en fonction du pH permet de déterminer les valeurs des pKa apparent (dans le méthanol) pour les deux ligands. Les valeurs des différents pKa obtenus sont répertoriées dans le Tableau 1.

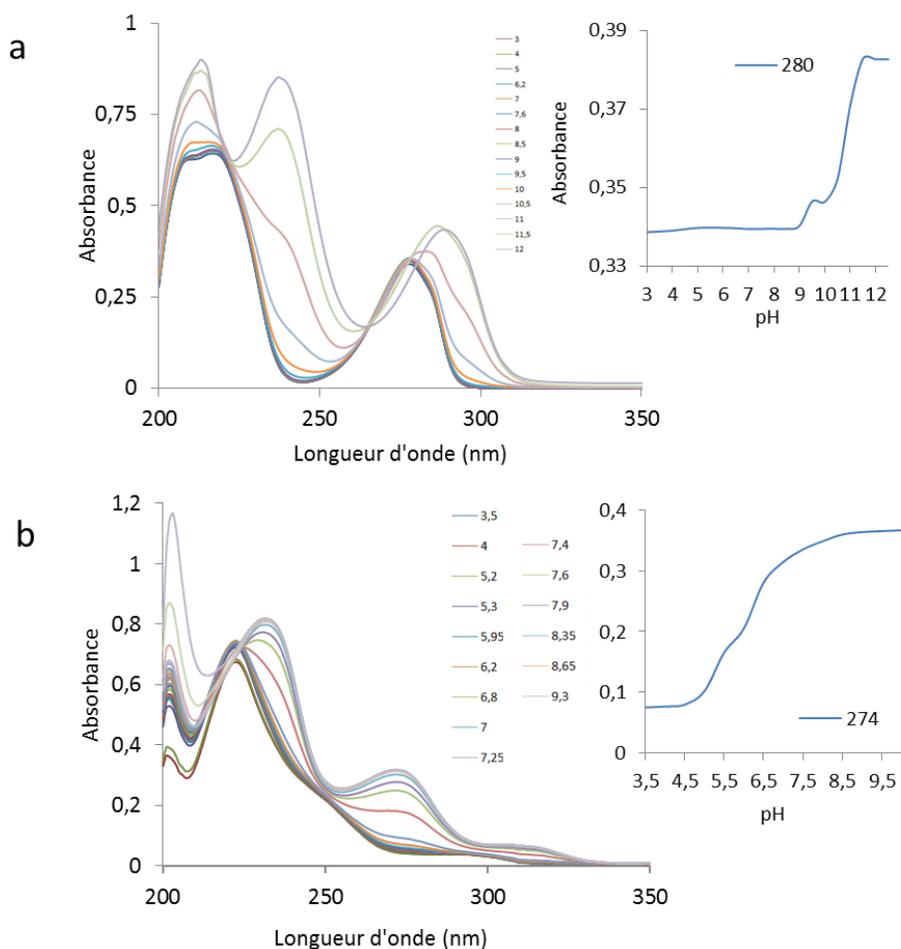


Figure 2 : Faisceaux de spectres UV-Visible du BDO $2.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (a) et BDT $3,2.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (b) enregistrés en faisant varier le pH apparent dans le méthanol.

	BDO	BDT
pKa ₁	9,5 (9,5*)	5,5
pKa ₂	11,0 (12,1*)	6,5

Tableau 1 : Valeurs des pKa du BDO et BDT, dans le méthanol, déterminées expérimentalement.
*(Rappoport et al. 1967)

Les valeurs de pKa obtenues pour le BDO (9,5 et 11,0) dans le méthanol sont proches de celles trouvées dans la littérature (Hanai et al. 1997). Par contre, celles du BDT n'ont, à notre connaissance, jamais été déterminées. Les valeurs obtenues par spectroscopie d'absorption électronique (5,5 et 6,5) montrent une grande différence avec celles du BDO. Lors de la complexation, les cations métalliques sont en compétition avec les protons du ligand. Il sera donc beaucoup plus facile de déprotomer la molécule de BDT que celle de BDO.

2. Propriétés spectroscopiques

Le BDO totalement protoné en solution dans le méthanol présente une bande d'absorption située à 275 nm, ainsi qu'une double bande centrée vers 212 nm. Le BDT totalement protoné présente une structure beaucoup plus complexe avec des bandes dont l'absorbance est relativement faible vers 300 et 250 nm et une double bande intense se situant à 224 nm. Les deux spectres d'absorption sont présentés sur la Figure 3.

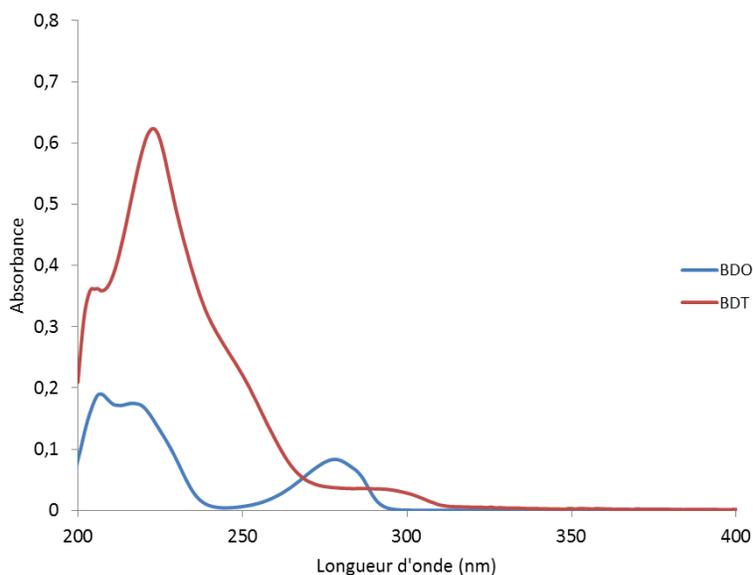


Figure 3 : Spectre UV-Visible du BDO et du BDT à $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ et à $\text{pH} = 5$ dans du méthanol.

La substitution des groupements hydroxyles par des groupements thiols provoque une modification de l'allure du spectre très importante. Ce résultat suggère que les orbitales non liantes des atomes d'oxygène et de soufre jouent un rôle non négligeable à la contribution des transitions électroniques, notamment dans les grandes longueurs d'onde, alors que les transitions $\pi-\pi^*$ apparaissent plus haute en énergie.

La Figure 4 montre les MEEF des deux composés modèles. Le BDO présente un unique massif de fluorescence centré sur le couple de longueur d'ondes d'excitation et d'émission 275/310 nm. Pour le BDT, comme dans le cas des composés flavonoïdes, la substitution des groupements fonctionnels oxygénés par des groupements soufrés entraîne une extinction totale de fluorescence. Quel que soit le pH, l'état de protonation et la longueur d'onde d'excitation de la molécule de BDT, aucun signal de fluorescence n'est détecté. Comme dans le cas de la flavothione, la participation des orbitales n à l'état fondamental peut expliquer une transition interdite ($n\pi^*$).

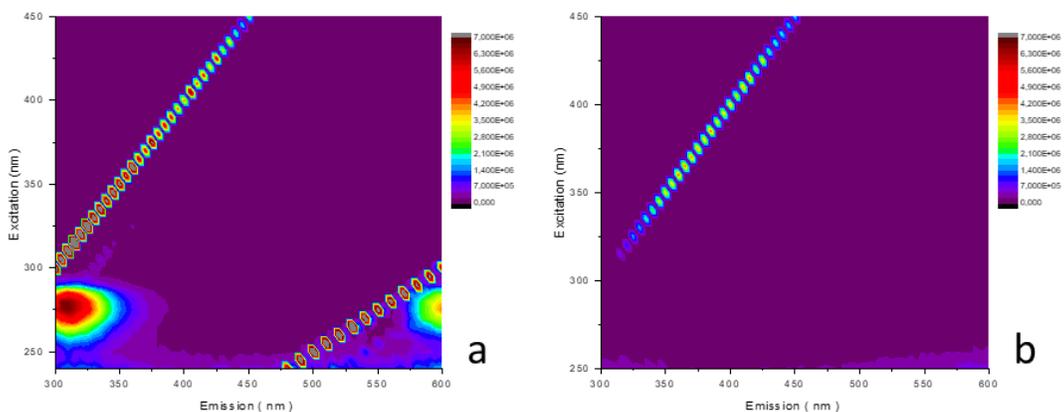


Figure 4 : Matrice d'excitation émission de fluorescence du BDO (a) ($3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ – fente 2 nm) et du BDT (b) ($3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ – fente 5 nm) dans le méthanol à pH = 5.

II. Suivi de la complexation des cations métalliques

1. Etude du benzènediol

L'addition, même en grande quantité ($R > 10$), des différents cations métalliques à une solution de BDO à pH = 5, n'engendre pas de manière générale de modification significative du spectre d'absorption. On notera toutefois dans le cas de Cu(II) et de Pb(II) une augmentation de la bande d'absorption et l'apparition d'un épaulement respectivement dues à l'absorption des ions Cu(II) et Pb(II) (Figure 5).

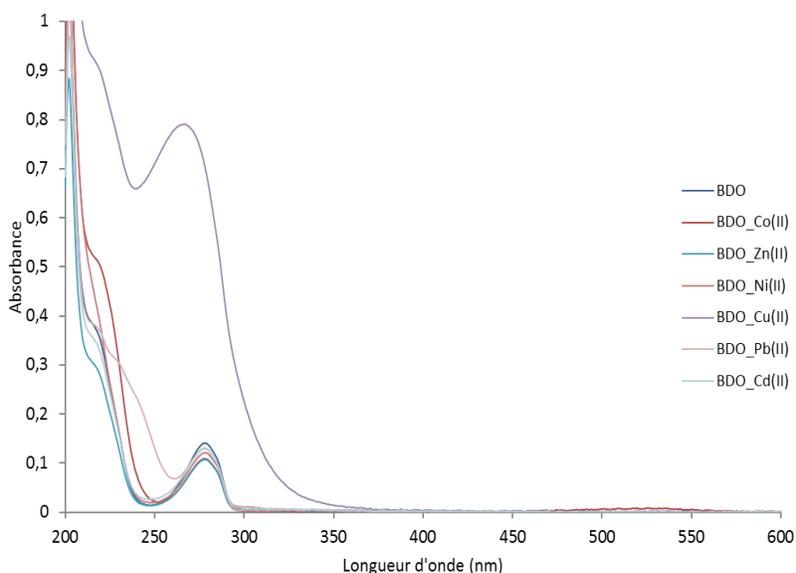


Figure 5 : Spectres UV-visible du BDO sans et avec ajouts de différents cations métalliques dans du méthanol à pH=5.

La même observation a été obtenue en spectroscopie d'émission de fluorescence. On peut donc conclure que le groupement catéchol seul n'a aucune affinité vis-à-vis des cations métalliques étudiés. Cependant, il a été montré que la molécule de BDO était capable de complexer l'ion Al(III) dans certaines conditions (Sikora et al. 1989, Nurchi et al. 2009). Il est également possible d'obtenir des complexes à conditions d'augmenter le pH de manière significative (Sancho et al. 2006, Xu 2013). Toutefois, dans le cadre de notre étude, il n'a pas semblé judicieux de modifier le pH, et notamment de travailler en milieu basique, dans la mesure où aucune comparaison ne pourrait être faite avec les études précédentes. Néanmoins, il faut noter que la fonction catéchol peut se comporter comme un bon agent complexant quand elle est associée à une structure plus complexe, comme par exemple la molécule de 4-nitrocatéchol (Cornard et al. 2005) ou des acides polyphénoliques (acides chlorogénique, gallique ou protocatéchuique) (André et al. 2007, Cornard et al. 2008, Masoud et al. 2012, Cornard et al. 2013). Ainsi, il semble que la complexation soit plus aisée lorsque la délocalisation électronique sur le cycle benzénique est plus importante.

2. Etude du Benzènedithiol

Contrairement à son homologue oxygéné, le BDT présente des modifications spectrales très importantes lors de l'ajout des cations métalliques étudiés. Nous présenterons les différents cas successivement avec leur spécificité.

- Cas du Plomb (II)

De très faibles ajouts du cation métallique Pb(II) à la solution de BDT entraînent la formation d'un précipité. Une complexation est donc observée mais ne peut malheureusement pas être étudiée par les techniques utilisées.

- Cas du Nickel (II)

La complexation de Ni(II) par le benzènedithiol (Figure 6) se traduit par un décalage vers les grandes longueurs d'onde et une augmentation de l'intensité de la bande d'absorption du ligand libre à 224 nm et par l'apparition de bandes dans les grandes longueurs d'ondes, à 308 et 360 nm, attribuées au complexe formé.

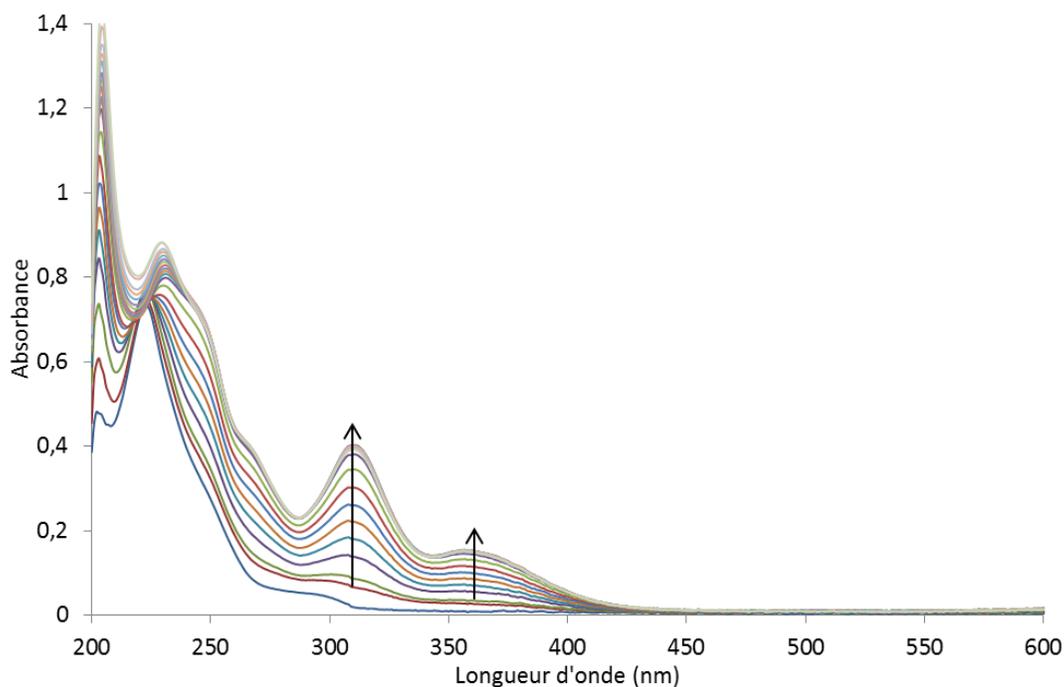


Figure 6 : Evolution des spectres d'absorption UV-visible du BDT dans le méthanol à pH=5, lors de la complexation de Ni(II) pour un rapport molaire allant de 0 à 10.

L'application de la méthode des rapports molaires indique clairement la formation d'un unique complexe de stœchiométrie 1:2 (Figure 7). Les analyses chimiométriques ont permis d'extraire le spectre du complexe (Figure 7) et d'obtenir la constante apparente de formation $\log \beta_{1:2} = 12,14 (+/- 0,03)$.

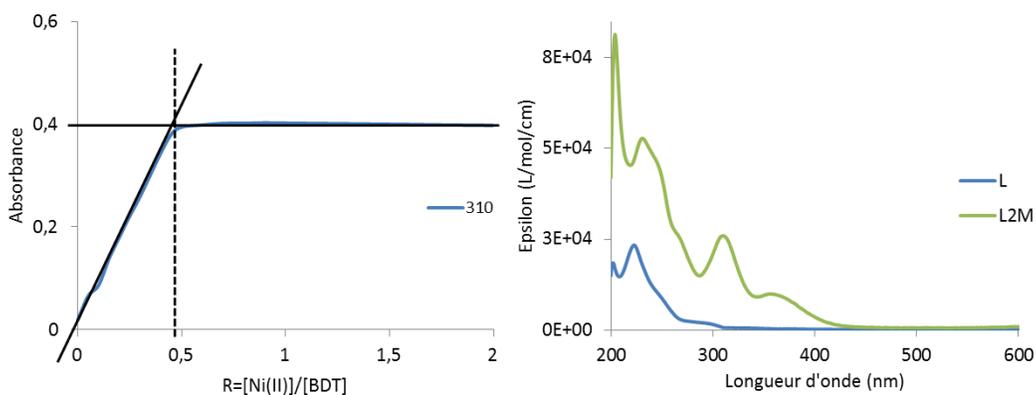


Figure 7 : Méthode des rapports molaires appliquée à 310 nm et spectre d'absorption des espèces pures BDT(L) et du complexe formé (L2M) pour le système BDT_Ni(II).

- Cas du Cobalt (II)

Dans le cas du cobalt(II), la réaction de complexation présente les mêmes tendances en absorption UV-visible que celles observées lors de la complexation avec Ni(II). On observe sur la Figure 8, lors de l'ajout de Co(II), que la bande d'absorption du ligand se déplace vers les grandes longueurs d'onde puis augmente tandis qu'apparaît une double bande à 317 et 360 nm ainsi qu'une large bande dont le maximum se situe à plus de 600 nm.

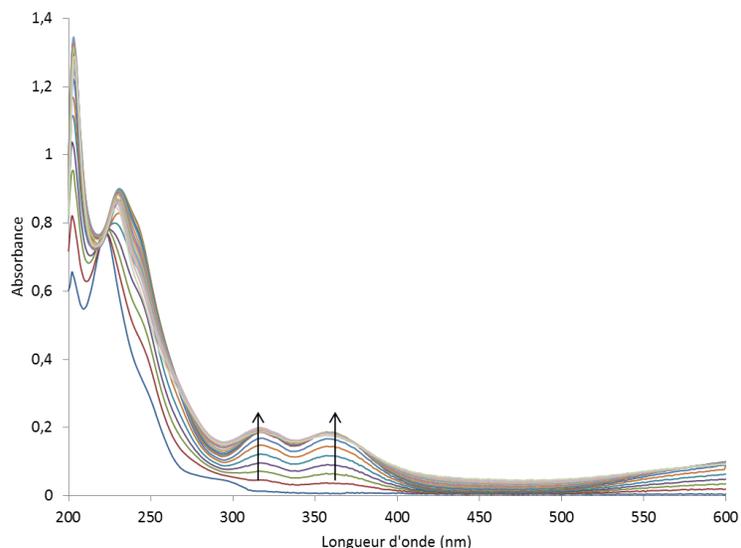


Figure 8: Evolution des spectres d'absorption UV-visible du BDT dans le méthanol à pH=5, lors de la complexation avec Co(II) pour un rapport molaire allant de 0 à 10.

L'application de la méthode des rapports (Figure 9) met en évidence la formation d'un unique complexe de stœchiométrie 1:3. L'utilisation des outils de chimiométrie confirme cette stœchiométrie et a permis d'obtenir le spectre d'absorption UV-visible du complexe (Figure 9) ainsi que la constante apparente de formation qui vaut 17,1 (+/- 0,09). La bande observée dans les très grandes longueurs d'onde dans le domaine du visible est due à des transitions entre les orbitales d du cobalt dans le complexe. En effet, Co(II) seul en solution ne présente aucune absorption dans ce domaine de longueurs d'onde.

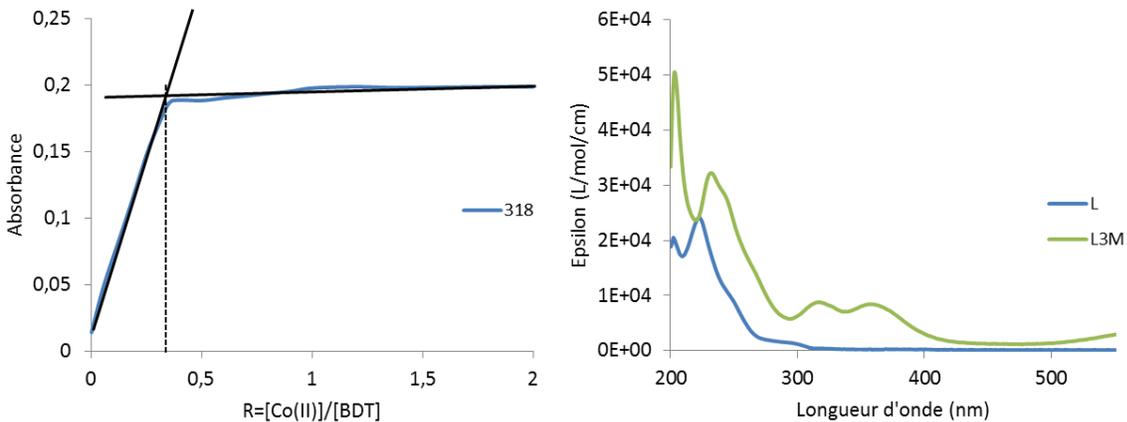


Figure 9 : Méthode des rapports molaires appliquée à 318 nm et spectre d'absorption des espèces pures BDT(L) et du complexe formé (L3M) pour le système BDT_Co(II).

- Cas du Cuivre (II)

Dans le cas du Cu(II), la série de spectres réalisée pour les différents rapports molaires (Figure 10) montre une augmentation puis un décalage vers les grandes longueurs d'onde de la bande à 224 nm, ainsi que l'apparition d'un épaulement à 248 nm et de deux nouvelles bandes à 320 nm et 395 nm (bande très intense) pour des rapports molaires allant jusqu'à 0,5. Puis pour des rapports plus importants, ces deux bandes disparaissent, l'épaulement se décale à 265 nm et un précipité se forme (observé par une augmentation de la ligne de base). Ces variations laissent supposer la présence d'au moins deux complexes en solution. La méthode des rapports molaires (Figure 10) confirme cette hypothèse, il y a formation de deux complexes de stœchiométrie 1:2 et 1:1.

A cause de la formation du précipité, le traitement chimométrique des données a été réalisé que sur les premiers ajouts (jusqu'à $R=0,5$) ne permettant ainsi que la détermination du spectre pur du premier complexe de stœchiométrie 1:2 (Figure 11), ainsi que de sa constante apparente de formation qui vaut $\log\beta_{1:2}= 9,31$.

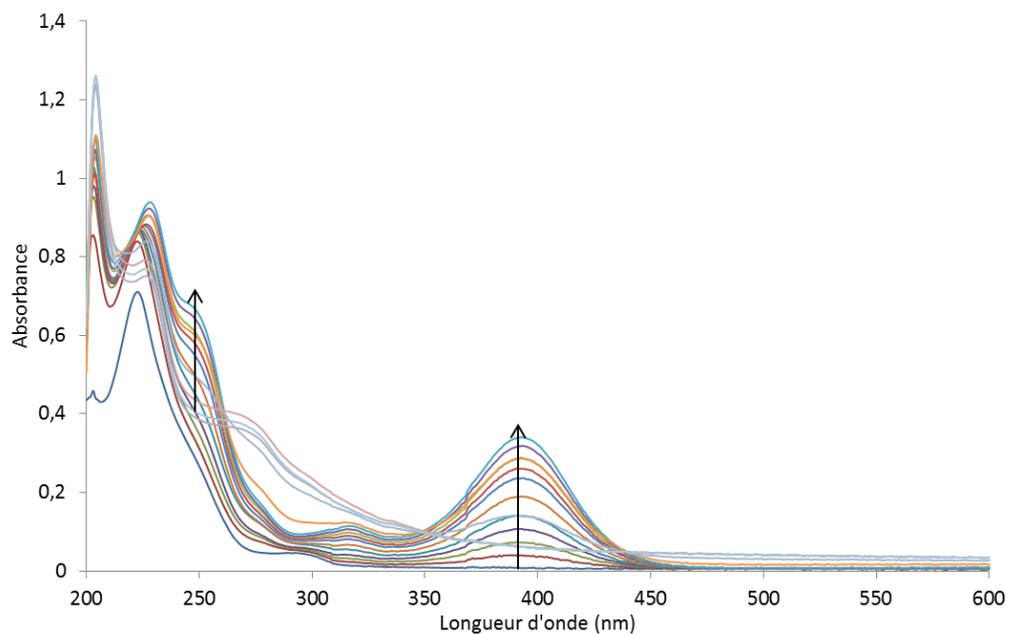


Figure 10: Evolution des spectres d'absorption UV-visible du BDT dans le méthanol à pH=5, lors de la complexation de Cu(II) pour un rapport molaire allant de 0 à 1,5.

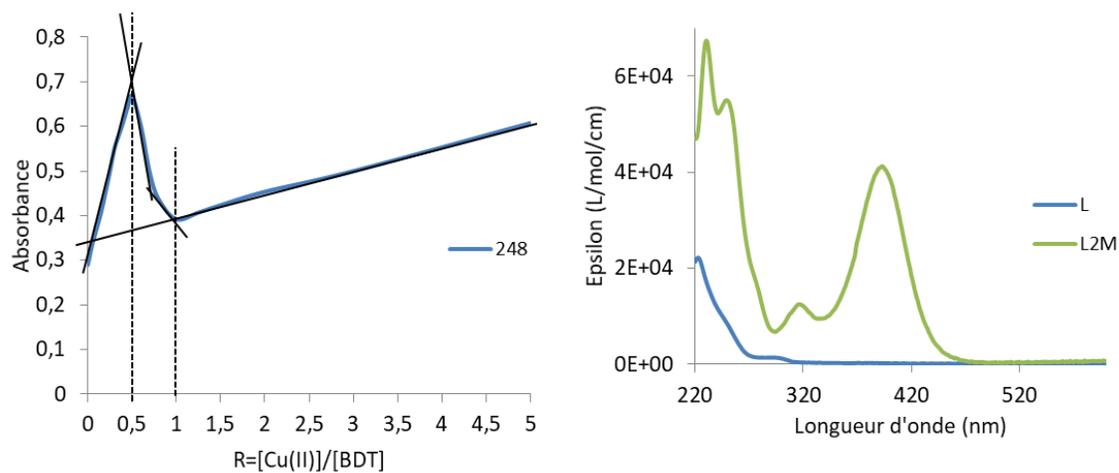


Figure 11 : Méthode des rapports molaires appliquée à 248 nm et spectre d'absorption des espèces pures BDT(L) et du complexe formé (L_2M) pour le système BDT_Cu(II).

- Cas du Zinc (II) et du Cadmium (II)

Le suivi de complexation de Zn(II) et de Cd(II) avec le BDT est assez complexe. De nombreux changements sont observables sur les faisceaux de spectres UV-Visible (Figure 12). Pour le dosage avec le Zn(II), on peut distinguer trois étapes. La première pour un rapport molaire allant de 0 à 0,3, la bande du ligand libre à 222 nm diminue jusqu'à disparaître et deux nouvelles bandes apparaissent à 240 et 270 nm. De plus, on observe un point isobestique à 228 nm qui disparaît par la suite, laissant ainsi présager des équilibres multiples. Ensuite une deuxième étape pour R= 0,3 à 0,5, où l'on observe une nouvelle bande à 310 nm, ainsi que l'augmentation de la bande à 270 nm et l'augmentation et le déplacement vers les plus courtes longueurs d'onde de la bande à 240 nm. Enfin pour un rapport molaire compris entre 0,5 et 1, les deux bandes à 270 et 310 nm se sont stabilisées mais la bande à 240 nm continue de croître et de se déplacer vers les plus courtes longueurs d'onde. Pour le dosage de Cd(II), le même comportement en trois étapes est observé mais les bandes observées diffèrent. Pour R allant de 0 à 0,3, une série de trois bandes apparaît à 247, 270 et 320 nm. Puis pour R compris entre 0,35 et 0,5, les deux bandes à 270 et 320 nm se stabilisent et la bande à 247 nm décroît au profit d'une nouvelle bande à 230 nm. Enfin pour R > 0,6 un précipité se forme (les spectres enregistrés ne sont pas représentés sur la Figure).

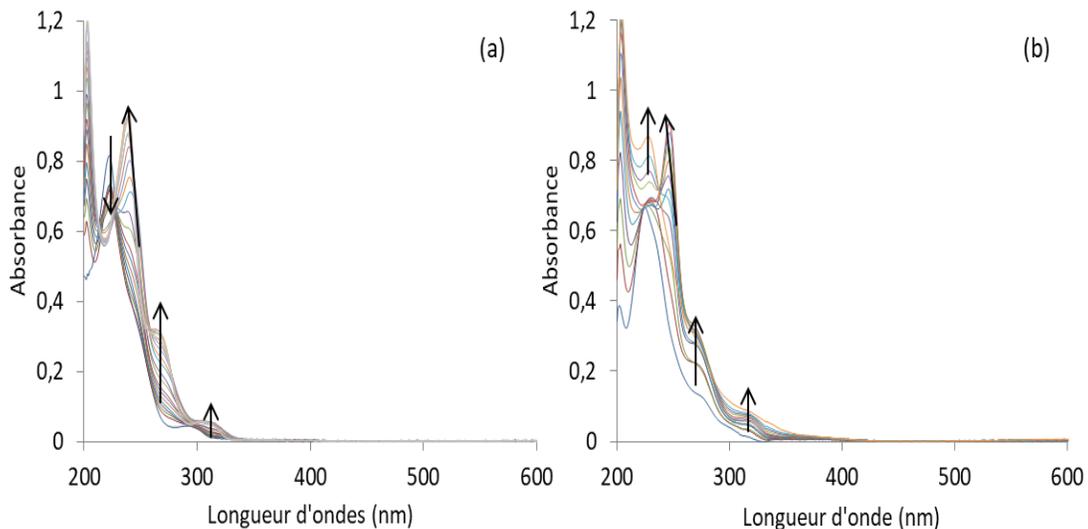


Figure 12 : Evolution des spectres d'absorption UV-visible du BDT dans le méthanol à pH=5, lors de la complexation du (a) Zn(II) pour un rapport molaire allant de 0 à 1 et (b) Cd(II) pour un rapport molaire allant de 0 à 0,6.

Cette complexation en trois étapes pour ces deux cations métalliques laisse supposer la formation successive d'au moins trois complexes en solution. La méthode des rapports molaires (Figure 13a) a dû être appliquée à deux longueurs d'onde (222 et 270 nm) pour le système Zn(II)-BDT. On observe ainsi la formation de deux complexes de stœchiométrie 1:3 et 1:2.

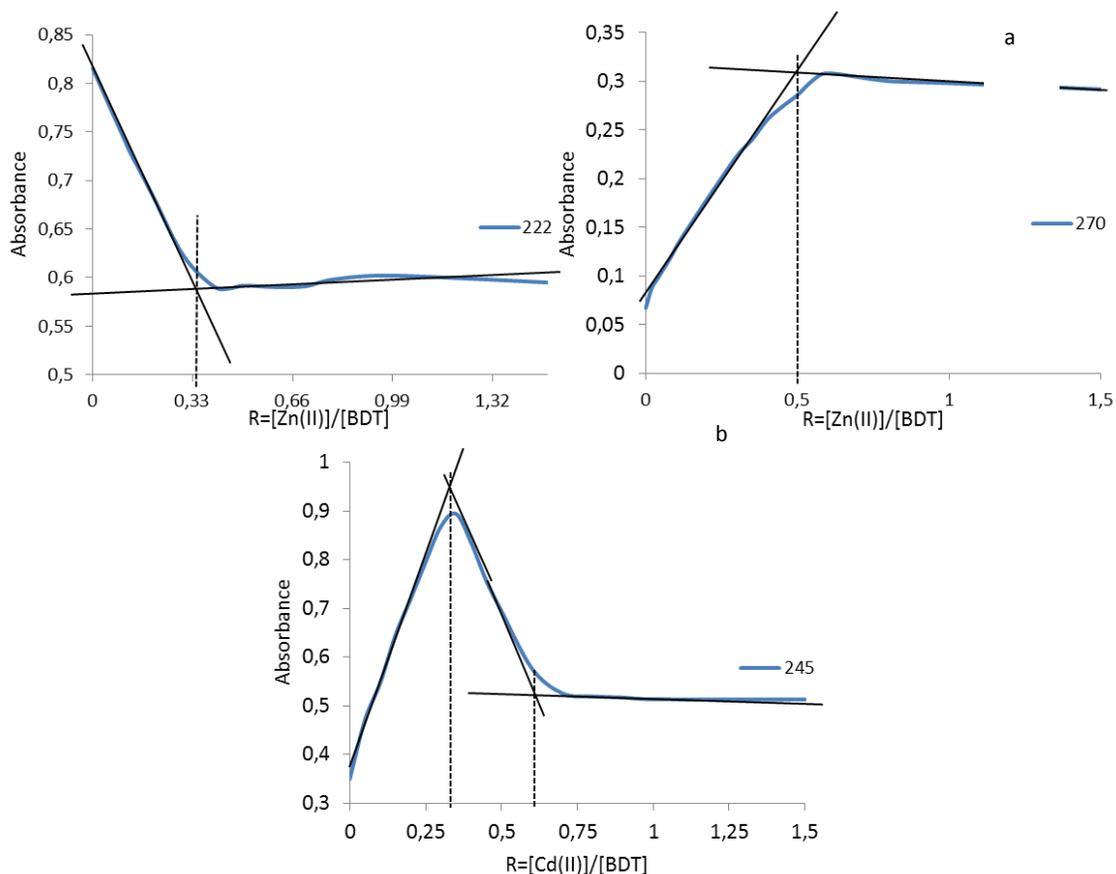


Figure 13 : Méthode des rapports molaires appliquée pour (a) le système Zn(II)-BDT à 222 et 270 nm et (b) au système Cd(II)-BDT à 245 nm.

Pour le système Cd(II)-BDT, l'application de la méthode des rapports molaires à la longueur d'onde de 245 nm (Figure 13b) montre deux inflexions à $R=0,33$ et $0,5$, ce qui indique comme pour le cas Zn(II)-BDT, la présence de deux complexes de stœchiométrie 1:3 et 1:2.

L'évolution du faisceau pour le système Zn(II)-BDT laisse supposer la formation d'un troisième complexe dont le spectre n'a pas pu être obtenu par les méthodes chimiométriques. Cependant, il est envisageable de supposer la présence d'un complexe de stœchiométrie 1:1 (suite logique après la formation des complexes 1:3 et 1:2).

Il en est de même pour le système Cd(II)-BDT, pour des rapports molaires supérieurs à 0,5 la formation d'un précipité laisse envisager la formation d'un complexe 1:1 non soluble. Seuls les spectres des complexes 1:3 ont été obtenus ainsi que leurs constantes apparentes de formation. Ces constantes valent pour le complexe avec Zn(II) : $\log_{1:3} = 14,36$ et pour le complexe avec Cd(II) : $\log_{1:3} = 13,25$.

3. Discussion

Tout comme le ligand libre, aucun des complexes formés avec les cations métalliques étudiés ne présente d'émission de fluorescence. Cette technique n'a donc pas permis de compléter les informations obtenues en spectroscopie d'absorption.

Contrairement au groupement catéchol, le groupement dithiol est un bon complexant des cations métalliques étudiés, ce qui se traduit par l'obtention de complexes de haute stœchiométrie. En effet, si l'on compare ce groupement à la fonction hydroxy-thiocétone, on observe des stœchiométries très différentes. Pour cette dernière, seuls des complexes 1:1 ont été mis en évidence. La fonction thiocatéchol est impliquée dans des complexes de stœchiométrie 1:3 ou 1:2. Une représentation schématique des complexes 1:2 et 1:3 est reproduite sur la figure 14.

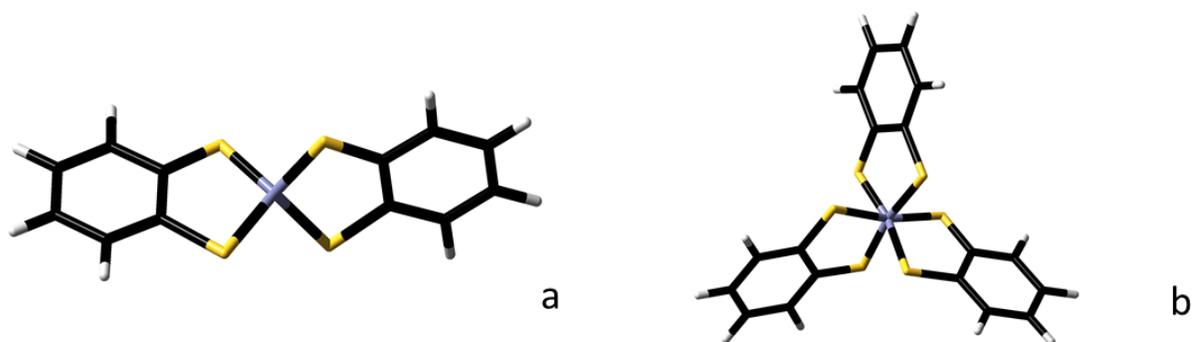


Figure 14 : Représentation de la structure des complexes 1:2 (a) et 1:3 (b) formé entre le BDT et un cation métallique.

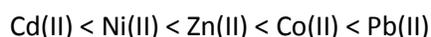
Les stœchiométries étant différentes, il est impossible de comparer de manière quantitative les pouvoirs complexants des deux fonctions. Mais il est indéniable, que la fonction thiocatéchol est plus complexante que le groupement hydroxy-thiocétone.

Il est intéressant de comparer l'affinité de la BDT avec les différents cations mis en jeu dans cette étude. L'obtention d'un classement du pouvoir complexant vis-à-vis des différents cations consiste à comparer d'une part la stœchiométrie obtenue pour les complexes, et d'autre part les constantes de formation (à stœchiométrie égale). Co(II), Zn(II) et Cd(II) sont les trois cations qui forment un complexe 1:3 avec BDT, tandis qu'un complexe 1:2 est obtenu avec Ni(II) et Cu(II). En observant les constantes répertoriées dans le Tableau 2, on peut classer les cations par ordre croissant d'affinité vis-à-vis de la fonction thiocatéchol : Cu(II) < Ni(II) < Cd(II) < Zn (II) < Co(II)

Métal	Stœchiométrie	log β
Ni(II)	1:2	12,14 (+/- 0,03)
Co(II)	1:3	17,10 (+/- 0,09)
Cu(II)	1:2	9,31 (+/- 0,03)
Zn(II)	1:3	14,36 (+/- 0,05)
Cd(II)	1:3	13,25 (+/- 0,06)

Tableau 2 : Récapitulatif des premiers complexes formés avec les différents cations étudiés ainsi que leur constante de formation apparente. (Incertitude)

A titre de comparaison, le classement d'affinité des différents cations vis-à-vis de la fonction hydroxy-thiocétone était le suivant :



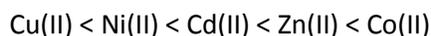
Il est évident que l'on ne peut pas comparer directement dans la mesure où Pb(II) avec le BDT et Cu(II) avec la 3-OHFT forment des complexes insolubles. Toutefois, on peut voir que pour les deux fonctions, Co(II) et Zn(II) sont les cations ayant le plus d'affinité avec les fonctions soufrées.

Conclusion

Les premiers résultats de l'étude de la complexation de cations métalliques par le BDT et le BDO ont mis en évidence des processus moins évidents que ceux observés dans l'étude précédente. Une comparaison des propriétés spectroscopiques s'est révélée délicate. Les spectres UV-Visible des deux molécules ont une allure complètement différente. Ceci suggère que les transitions électroniques mises en jeu dépendent fortement des orbitales non liantes des atomes de soufre et d'oxygène. Comme dans l'étude précédente, la substitution des groupements oxygénés par des groupements soufrés provoque une extinction de la fluorescence de la molécule. Là encore, la nature des orbitales impliquées dans les transitions pourrait expliquer ce quenching. Des calculs de chimie quantique sont en cours pour valider ces hypothèses.

La complexation des différents cations n'a pu être observée seulement pour le BDT. En effet aucun changement spectral pour le BDO n'a été observé lors de l'ajout des cations. Le BDO et le BDT, qui ont une structure très proche, ont pourtant des comportements très différents vis-à-vis des cations étudiés. Une des raisons qui pourrait partiellement expliquer ces différences est la déprotonation plus aisée du BDT dont le pKa (5,5 et 6,5) est beaucoup plus faible que celui du BDO (pKa= 9,5 et 11). L'absence de complexation avec le BDO rend toute comparaison quantitative des propriétés de complexation impossible avec le BDT. Cependant, on peut noter que le pouvoir complexant de la fonction dithiol est très supérieur à celui de la fonction diol.

L'étude de la chélation des cations par le BDT est délicate ; en effet différents complexes sont formés pour des petites quantités d'ion métallique ajoutées, démontrant ainsi un pouvoir complexant très élevé de ce ligand et une stabilité thermodynamique importante. Trois types de complexes sont formés avec des stœchiométries 1:3, 1:2 et 1:1. De plus, cette complexité a rendu le traitement chimométrique délicat, et seuls les spectres purs et les constantes de formation du premier complexe formé pour chaque système ont pu être déterminées. Au regard des stœchiométries et des constantes obtenues, le classement d'affinité des cations métalliques pour le BDT a pu être obtenu :



Pb(II) n'a pas pu être classé, car un précipité s'est formé dès les premiers ajouts du sel métallique rendant l'étude spectroscopique impossible.

Nous sommes dans l'impossibilité d'effectuer une comparaison directe avec les résultats obtenus pour les flavonoïdes puisque les complexes formés n'ont pas les mêmes stœchiométries. Cependant, ces deux études ont mis en évidence le caractère complexant supérieur des deux fonctions soufrées comparé à celles oxygénées. En outre, les deux classements d'affinité obtenus mettent en évidence que Co(II) et Zn(II) sont parmi les cations ayant le plus d'affinité avec les fonctions soufrées.

Nous avons vu que le catéchol voit ses propriétés de complexation augmenter lorsque celui-ci est associé à des structures plus complexes où la délocalisation électronique est importante. Il serait donc intéressant de vérifier si l'association du groupement dithiol à ce même type de molécule accroît davantage le pouvoir complexant de cette fonction.

Références bibliographiques :

André, E., C. Lapouge and J. P. Cornard (2007). "Metal complexation of protocatechuic acid and its derivatives: Determination of the optimal computational conditions for the simulation of electronic spectra." Journal of Molecular Structure: THEOCHEM **806**(1-3): 131-140.

Cornard, J. P., C. Lapouge and E. André (2013). "PH influence on the complexation site of Al(III) with protocatechuic acid. A spectroscopic and theoretical approach." Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **108**: 280-287.

Cornard, J. P., C. Lapouge, L. Dangleterre and C. Allet-Bodelot (2008). "Complexation of lead(II) by chlorogenic acid: Experimental and theoretical study." Journal of Physical Chemistry A **112**(48): 12475-12484.

Cornard, J. P., Rasmiwetti and J. C. Merlin (2005). "Molecular structure and spectroscopic properties of 4-nitrocatechol at different pH: UV-visible, Raman, DFT and TD-DFT calculations." Chemical Physics **309**(2-3): 239-249.

Hanai, T., K. Koizumi, T. Kinoshita, R. Arora and F. Ahmed (1997). "Prediction of pK(a) values of phenolic and nitrogen-containing compounds by computational chemical analysis compared to those measured by liquid chromatography." Journal of Chromatography A **762**(1-2): 55-61.

Masoud, M. S., S. S. Hagagg, A. E. Ali and N. M. Nasr (2012). "Synthesis and spectroscopic characterization of gallic acid and some of its azo complexes." Journal of Molecular Structure **1014**(Supplement C): 17-25.

Nurchi, V. M., T. Pivetta, J. I. Lachowicz and G. Crisponi (2009). "Effect of substituents on complex stability aimed at designing new iron(III) and aluminum(III) chelators." Journal of Inorganic Biochemistry **103**(2): 227-236.

Rappoport, Z. and M. Frankel (1967). CRC handbook of tables for organic compound identification, CRC Press. Inc.

Sancho, M., S. Blanco, F. Ferretti, A. Jubert and E. Castro (2006). Complexation of Zn (II) by catechol in hydroxylic solvents. Anales de la Asociación Química Argentina, SciELO Argentina.

Sikora, F. J. and M. B. McBride (1989). "Aluminum complexation by catechol as determined by ultraviolet spectrophotometry." Environmental Science & Technology **23**(3): 349-356.

Xu, Z. (2013). "Mechanics of metal-catecholate complexes: The roles of coordination state and metal types." **3**: 2914.

Conclusions générales et perspectives

Les différentes études menées au cours de cette thèse ont toutes été axées sur l'analyse des interactions entre la MO et des cations métalliques, et plus précisément sur l'influence de la nature chimique du groupement chélatant. L'objectif premier de cette étude était d'évaluer l'influence des fonctions soufrées sur la complexation des cations métalliques par la MO. Pour ce faire le problème a été abordé par le biais de l'étude de trois catégories de MO :

- La MOD issue de deux sites de la région : la rivière la Marque et les mares de Germignies
- Quatre extraits de MOD, dont deux de références SR_HPOA et PL_FA provenant de l'IHSS
- Deux familles de molécules modèles appartenant au groupe des polyphénols.

Avant d'étudier la complexation des cations métalliques par la MOD, il a été nécessaire dans un premier temps de caractériser celle-ci. Cette caractérisation s'est faite majoritairement par le biais de l'enregistrement de matrices excitation- émission de fluorescence puis par une modélisation des principales composantes à l'aide de l'outil PARAFAC. Les composantes de fluorescence ainsi que les constantes obtenues pour les deux extraits de références lors de la complexation de Cu(II) sont semblables à celles reportées dans la littérature, ce qui permet de valider l'étude et notamment l'exploitation des résultats. La signature spectrale de l'ensemble des échantillons de MOD étudié s'est avérée être globalement très proche. En effet, toutes les MOD sont composées d'un mélange de substances humiques et protéiniques et il est impossible avec ces outils de quantifier la proportion exacte de chacune de ces substances. Néanmoins dans le cadre de l'étude faite sur la Marque il a été possible d'observer l'évolution dans le temps de la composition de la MOD, ainsi que de mettre en évidence un apport de MO anthropique provenant des ouvrages d'assainissement se déversant dans la rivière. Des analyses complémentaires ont été effectuées sur les extraits de MO, et elles ont mis en évidence la composition très hétérogène de ces différents extraits, avec de grandes différences de concentrations en soufre et en azote. La spectroscopie de fluorescence donne une information partielle et ne permet pas une caractérisation quantitative complète de la MOD. Cependant elle s'avère être une bonne technique pour l'étude de la complexation puisque pour l'ensemble des MO choisis, des comportements de complexation très disparates ont été observés. L'ensemble des fluorophores des composantes ne réagit pas de manière identique ; une augmentation, une diminution et/ou une stabilité de l'intensité des composantes est observée après l'ajout des différents cations métalliques. Cette modification met en jeu une ou deux catégories de sites, dont les valeurs des constantes de formation varient de plusieurs ordres de grandeur. La comparaison des MO provenant d'une même « catégorie d'eau » met en évidence que la fraction PL_FA apparaît plus complexante que SR_HPOA et que l'extrait JWW_HPO est quant à lui globalement plus complexant que JWW_TPH vis-à-vis des métaux étudiés. De plus il apparaît que la MO anthropique a une affinité pour les métaux supérieure à la MO naturelle.

Ainsi, nous avons pu constater que pour les échantillons JWW et de la Marque, le rejet de MOA dans le milieu naturel a un impact sur la spéciation des métaux.

Une comparaison de l'ensemble des résultats obtenus sur les différentes MO étudiées est très délicate. En effet, suivant l'échantillon étudié, trois ou quatre composantes de fluorescence ont été modélisées et une ou deux constantes de formation ont été calculées pour chacune d'elles avec les différents cations métalliques étudiés. Ce qui donne une quantité de données très importante, qui malheureusement ne permet pas de dégager une tendance générale concernant la complexation métallique. Il faut, toutefois, souligner que les composantes correspondent à un grand nombre de fluorophores différents et que l'hétérogénéité des échantillons étudiés conduit à avoir des groupements différents qui ont des signatures spectrales assez proches. Les composantes identifiées correspondent à une représentation assez « grossière » d'un ensemble de fonctions ayant des concentrations et des environnements différents qui provoquent des modifications de comportement vis-à-vis des cations métalliques. Ainsi, on a pu observer que, pour une même composante de deux échantillons, le classement de l'affinité pour plusieurs cations métalliques, obtenu par comparaison des constantes de formation, était différent.

Cependant, nous avons montré que la MOD de l'extrait de SR_HPOA était moins complexante que celle de l'extrait de PL_FA d'une part ; que la MOD de la Marque était moins complexante que celle de Germignies d'autre part, quel que soit le cation métallique étudié. Donc, pour les MO de référence ou les MON, on remarque que le pouvoir complexant varie de la même manière que la concentration en soufre (mesurée par la présence des groupements thiols). Par contre pour les échantillons de Jeddah, la comparaison est plus délicate d'une part par l'apparition d'une composante de fluorescence supplémentaire et d'autre part la composante C_3 a un comportement spécifique. Néanmoins, d'une manière générale la complexation globale de ces extraits est plus importante que celle des MOD de référence. Le soufre semble avoir un effet sur le pouvoir complexant de la MOD, mais malheureusement aucune information spectrale n'a pu mettre en évidence la présence de complexes obtenus à partir de fonctions soufrées. Cela peut être dû à une trop faible concentration de ces fonctions ou tout simplement une absence de fluorescence de celles-ci.

La complexité de la MOD la rend particulièrement délicate à étudier et à comprendre dans son ensemble. Si l'étude directe de MOD prélevée ou de MOD préalablement fractionnée peut s'avérer préférable dans le cadre de projets à vocation très appliquée, l'utilisation de molécules modèles trouve un intérêt indéniable pour des travaux à caractère plus fondamental. Notamment

pour comprendre les mécanismes de fixation des métaux au niveau des sites complexants et comparer les capacités chélatantes des fonctions oxygénées et soufrées.

Dans ce travail, des sites particuliers ont été explorés : le site hydroxy-cétone, catéchol et leurs analogues soufrés. Pour cela la complexation d'un grand nombre de métaux avec les molécules modèles de BDO et BDT d'une part et 3-OHF et 3-OHFT d'autre part a été étudiée. Comme pour les échantillons de MOD, les molécules modèles ont été caractérisées avant d'effectuer l'étude de la complexation. Une attention particulière a été portée pour les molécules soufrées dans la mesure où celles-ci ont très peu été étudiées. L'étude de la 3-OHFT a été largement développée car cette molécule présente des singularités, notamment par la présence d'une liaison hydrogène très forte impliquant l'atome de soufre. La substitution de l'oxygène par le soufre provoque des modifications spectrales importantes à la fois dans la forme du spectre d'absorption et en longueurs d'onde. Pour les deux molécules soufrées, une absence totale de fluorescence a été observée. Celle-ci est due à un premier état excité de type $n\pi^*$ qui conduit à une transition électronique interdite. On a pu montrer que, pour un grand nombre de cations divalents et pour les deux familles de molécules, la fonction soufrée est plus complexante que la fonction oxygénée. De même, la comparaison des fonctions soufrées montre que le dithiol a un pouvoir de fixation des métaux plus important que celui de l'hydroxy-thiocétone. Les classements obtenus pour les différents métaux étudiés sont reportés dans le Tableau ci-dessous. Si on compare les deux flavonoïdes, le classement de l'affinité des fonctions vis-à-vis des cations est différent mais n'est pas inversé. Cd(II) reste le métal le moins complexé et Zn(II) conserve une position intermédiaire. En ce qui concerne BDO et BDT, aucune comparaison n'est possible comme BDO ne complexe pas du tout les cations choisis. En fonction de la nature du site soufré, les cations métalliques ont des comportements différents (notamment Pb(II) et Cu(II)), mais on peut observer que Co(II) et Zn(II) présentent une grande affinité pour les groupements soufrés.

	O	S
Flavonoïdes	<i>Cd(II) << Co(II) < Zn(II) < Pb(II) < Ni(II)</i>	<i>Cd(II) < Ni(II) < Zn(II) < Co(II) < Pb(II)</i>
Benzène	-	<i>Cu(II) < Ni(II) < Cd(II) < Zn(II) < Co(II)</i>

S'il est indéniable que la présence de fonctions soufrées provoque une augmentation de la complexation des métaux, comme nous l'a montré l'étude des molécules modèles, on peut s'interroger sur l'utilisation de la spectroscopie de fluorescence pour évaluer la capacité de ces fonctions au sein de la MOD. En effet, l'absence totale de fluorescence de BDT et 3-OHFT soulève un questionnement sur l'émission des fonctions soufrées présentes dans la MOD. Une fonction soufrée liée à une structure supramoléculaire a-t-elle le même comportement de fluorescence que

lorsqu'elle est associée à une petite molécule ? On peut imaginer qu'une délocalisation électronique plus importante dans une macromolécule modifie la nature de l'état excité (pour devenir $\pi\pi^*$) qui serait alors susceptible de donner lieu à une transition électronique permise. Il serait ainsi intéressant, dans un avenir proche, de tester des structures moléculaires de taille plus importante possédant un groupement soufré participant à la délocalisation électronique, afin d'observer une éventuelle émission de fluorescence.

On peut noter aussi que l'ensemble de ces études a été réalisé à pH constant, or il est bien connu que le pH a une influence significative sur les propriétés de complexation. Il serait intéressant également de comparer le pouvoir complexant des fonctions soufrées et oxygénées à un pH plus élevé, où la déprotonation de ces dernières serait plus aisée.

Annexe

Annexe

Coordonnées cartésiennes du complexe $3\text{OHF}(\text{Cu})(\text{H}_2\text{O})_2^+$

C	-0.187238	-0.346615	-0.123479
C	0.010506	-0.011767	1.224148
C	1.325673	-0.054368	1.741006
C	2.381325	-0.421024	0.933134
C	2.155787	-0.753158	-0.418713
C	0.881272	-0.716902	-0.951330
H	1.478483	0.201083	2.781803
H	3.387003	-0.457478	1.334000
H	2.988893	-1.041918	-1.048578
H	0.686876	-0.968956	-1.986410
O	-1.416437	-0.323498	-0.677780
C	-1.136551	0.343919	2.025969
C	-2.457055	0.297098	1.397566
C	-2.539568	-0.012031	0.040530
O	-1.021218	0.677338	3.240086
C	-3.746351	-0.049884	-0.790643
C	-3.662568	-0.471504	-2.135412
C	-4.791207	-0.500645	-2.945898
C	-6.033744	-0.107677	-2.444838
C	-6.131573	0.312666	-1.119445
C	-5.008506	0.341330	-0.296733
H	-2.708826	-0.776743	-2.542999
H	-4.700189	-0.830373	-3.974728
H	-6.911989	-0.129159	-3.079937
H	-7.090069	0.622685	-0.717985
H	-5.091176	0.664582	0.729251
O	-3.506661	0.563991	2.127513
Cd	-3.085552	0.985203	4.256829
O	-3.866123	2.879042	5.434963
H	-3.952773	2.626806	6.364054
H	-3.333071	3.683807	5.414625
O	-3.859255	0.223086	6.380157
H	-4.648209	-0.334102	6.350941
H	-3.207178	-0.270407	6.894898

Coordonnées cartésiennes du complexe $3\text{OHF}(\text{Co})(\text{H}_2\text{O})_3^+$

C	-0.364320	-0.015910	0.441342
C	-0.319792	0.283316	1.811734
C	0.939055	0.338158	2.451998
C	2.091824	0.100983	1.734245
C	2.021194	-0.197391	0.357477
C	0.803328	-0.257794	-0.293123
H	0.972217	0.569024	3.508995
H	3.056618	0.143179	2.224760
H	2.932095	-0.381769	-0.199458
H	0.729799	-0.484991	-1.349164
O	-1.538504	-0.080481	-0.223292
C	-1.564031	0.521177	2.488644
C	-2.801065	0.440615	1.735899
C	-2.743487	0.138446	0.377987
O	-1.624739	0.807424	3.730474
C	-3.859507	0.018430	-0.562966
C	-3.605638	-0.274682	-1.919776
C	-4.649133	-0.389417	-2.829739
C	-5.970981	-0.216553	-2.415082
C	-6.235881	0.072364	-1.077285
C	-5.198462	0.189905	-0.156344
H	-2.587959	-0.411149	-2.258276

Annexe

H	-4.429816	-0.614343	-3.867265
H	-6.783146	-0.306379	-3.127323
H	-7.258686	0.207952	-0.744130
H	-5.409089	0.413896	0.877927
O	-3.918288	0.668036	2.395773
Co	-3.576456	1.086916	4.296671
O	-2.834429	1.339113	6.334427
H	-1.903143	1.103752	6.436732
H	-2.921403	2.248260	6.649467
O	-3.958721	3.194582	4.578935
O	-4.731583	-0.359174	5.313311
H	-4.831893	3.512568	4.313340
H	-3.320281	3.787942	4.161048
H	-4.810209	-0.262429	6.270976
H	-5.581470	-0.667676	4.975571

Coordonnées cartésiennes du complexe $3\text{OH}^-(\text{Ni})(\text{H}_2\text{O})_4^+$

C	-0.323807	-0.101956	0.390665
C	-0.227753	0.225507	1.752081
C	1.047081	0.214580	2.362943
C	2.165920	-0.112064	1.626967
C	2.044218	-0.437135	0.259682
C	0.810096	-0.434400	-0.362210
H	1.119172	0.466632	3.413253
H	3.142468	-0.120599	2.095492
H	2.928228	-0.692881	-0.312277
H	0.697696	-0.681519	-1.410404
O	-1.513186	-0.109164	-0.245986
C	-1.438059	0.553695	2.454411
C	-2.700020	0.532384	1.733048
C	-2.690609	0.195568	0.381313
O	-1.449108	0.861867	3.689399
C	-3.835632	0.114092	-0.526910
C	-3.642996	-0.255890	-1.875248
C	-4.718581	-0.337974	-2.751015
C	-6.013127	-0.054809	-2.310810
C	-6.217644	0.311871	-0.981524
C	-5.147718	0.397521	-0.094712
H	-2.647453	-0.478825	-2.233064
H	-4.545923	-0.624508	-3.782246
H	-6.850114	-0.119914	-2.996563
H	-7.218495	0.533876	-0.628387
H	-5.310113	0.680549	0.933871
O	-3.778127	0.837094	2.417805
Ni	-3.341686	1.256268	4.315944
O	-5.377474	1.493230	4.806527
O	-2.917354	1.725951	6.327958
H	-5.586597	2.147795	5.485136
H	-5.969331	1.664584	4.062794
H	-2.678311	0.939876	6.836462
H	-2.258090	2.400160	6.534688
O	-3.175775	3.337467	3.885906
O	-3.584701	-0.706237	5.116922
H	-3.616015	3.531334	3.047224
H	-2.268438	3.654067	3.782835
H	-4.508192	-0.990238	5.131645
H	-3.084829	-1.422916	4.705938

Annexe

Coordonnées cartésiennes du complexe 3OHF(Pb) (H₂O)₂⁺

C	-0.333280	0.001064	0.448853
C	-0.221794	0.271738	1.820696
C	1.064972	0.287822	2.404828
C	2.178406	0.040942	1.630699
C	2.039948	-0.228710	0.253282
C	0.793380	-0.250499	-0.343085
H	1.150463	0.496714	3.463343
H	3.164818	0.053123	2.077790
H	2.920813	-0.421594	-0.347239
H	0.667127	-0.455517	-1.398573
O	-1.538710	-0.026676	-0.160539
C	-1.427956	0.518980	2.560234
C	-2.694714	0.478403	1.864046
C	-2.706916	0.201250	0.499247
O	-1.406840	0.772503	3.812222
C	-3.868693	0.113079	-0.389630
C	-3.680424	-0.180456	-1.757065
C	-4.764911	-0.269570	-2.620273
C	-6.063026	-0.069408	-2.146879
C	-6.263151	0.221184	-0.798536
C	-5.184027	0.313061	0.076109
H	-2.682113	-0.338329	-2.140471
H	-4.596558	-0.496153	-3.666790
H	-6.907445	-0.139580	-2.822860
H	-7.266958	0.378389	-0.420563
H	-5.346238	0.538296	1.118356
O	-3.791131	0.709291	2.566833
Pb	-3.521860	1.134370	4.757404
O	-3.428852	3.620298	3.771081
H	-3.756544	3.754827	2.872774
H	-3.719559	4.386695	4.281071
O	-3.841602	-1.521643	4.818937
H	-4.230619	-1.975275	5.577125
H	-4.213311	-1.942875	4.033550

Coordonnées cartésiennes du complexe 3OHF(Zn) (H₂O)₂⁺

C	-0.228485	-0.146580	0.212715
C	-0.121540	0.139103	1.583160
C	1.162211	0.138097	2.175557
C	2.276480	-0.140856	1.413726
C	2.142817	-0.424960	0.038441
C	0.900483	-0.429295	-0.566436
H	1.244755	0.356864	3.232376
H	3.259529	-0.143909	1.868417
H	3.023807	-0.643326	-0.553216
H	0.777608	-0.644861	-1.620364
O	-1.426516	-0.157757	-0.409276
C	-1.328390	0.412065	2.311495
C	-2.597671	0.361799	1.607422
C	-2.599666	0.088891	0.242601
O	-1.323637	0.696625	3.555219
C	-3.755058	0.036727	-0.656472
C	-3.564475	-0.217477	-2.031480
C	-4.645463	-0.260639	-2.903183
C	-5.943172	-0.053782	-2.431484
C	-6.145923	0.195925	-1.075216
C	-5.070579	0.242048	-0.192250
H	-2.566206	-0.378676	-2.413923

Annexe

H	-4.474585	-0.455610	-3.955735
H	-6.784568	-0.086848	-3.114105
H	-7.149285	0.357633	-0.697487
H	-5.233601	0.437164	0.856097
O	-3.687273	0.596724	2.306743
Zn	-3.232532	0.983315	4.189227
O	-3.345741	3.066794	4.420942
O	-3.850345	-0.326607	5.648554
H	-4.104222	3.502129	4.009936
H	-2.559312	3.554902	4.142656
H	-4.024335	0.023171	6.533095
H	-4.599259	-0.892363	5.416233

Coordonnées cartésiennes du complexe 3OHFT(Cd) (H₂O)₂⁺

C	-0.094695	-0.389177	-0.180233
C	0.154805	-0.159169	1.184049
C	1.510389	-0.205592	1.602894
C	2.520931	-0.465514	0.704230
C	2.230144	-0.691412	-0.657712
C	0.925227	-0.654659	-1.103011
H	1.737342	-0.032766	2.646289
H	3.548816	-0.496890	1.044799
H	3.032410	-0.894035	-1.356756
H	0.666204	-0.822891	-2.140782
O	-1.353164	-0.361342	-0.661507
C	-0.957770	0.106886	2.054416
C	-2.294895	0.107038	1.503978
C	-2.432153	-0.122956	0.113612
S	-0.684226	0.424236	3.728262
C	-3.671123	-0.112537	-0.666519
C	-3.599037	-0.074122	-2.077345
C	-4.752481	-0.065627	-2.849555
C	-6.009450	-0.105874	-2.241916
C	-6.096485	-0.151556	-0.851749
C	-4.946993	-0.150451	-0.066431
H	-2.634453	-0.041814	-2.564687
H	-4.671401	-0.026207	-3.929748
H	-6.908771	-0.100435	-2.847042
H	-7.067135	-0.187135	-0.370210
H	-5.020019	-0.178780	1.008860
O	-3.349317	0.324255	2.224306
Cd	-3.099869	0.913850	4.360653
O	-4.075852	2.999438	5.056299
H	-4.364059	2.853881	5.967539
H	-3.515482	3.785140	5.064323
O	-4.402408	0.589482	6.371195
H	-5.208173	0.067830	6.258218
H	-3.914127	0.163334	7.087849

Coordonnées cartésiennes du complexe 3OHFT(Co) (H₂O)₃⁺

C	-0.051267	-0.190170	0.125714
C	0.173274	0.132583	1.475090
C	1.512979	0.093093	1.936840
C	2.540232	-0.249264	1.085527
C	2.277482	-0.567730	-0.263419
C	0.985417	-0.539628	-0.747858
H	1.713555	0.337606	2.971539
H	3.558850	-0.274658	1.453086
H	3.092962	-0.836013	-0.923964

Annexe

H	0.752210	-0.779061	-1.777600
O	-1.300765	-0.175609	-0.385736
C	-0.959072	0.476058	2.285501
C	-2.269233	0.488018	1.697630
C	-2.395836	0.142889	0.336114
S	-0.789041	0.871066	3.955198
C	-3.620707	0.065412	-0.461574
C	-3.545102	-0.367088	-1.804854
C	-4.686573	-0.454703	-2.589274
C	-5.933725	-0.112462	-2.061902
C	-6.023720	0.317677	-0.739441
C	-4.886589	0.407414	0.058306
H	-2.588426	-0.636689	-2.229575
H	-4.603751	-0.791355	-3.616182
H	-6.823589	-0.181479	-2.676895
H	-6.986931	0.586407	-0.321056
H	-4.962831	0.738684	1.081395
O	-3.319679	0.802349	2.409017
Co	-3.094695	1.254421	4.318181
O	-2.810117	1.793435	6.466991
H	-3.154734	1.097965	7.042521
H	-1.938188	2.026565	6.809060
O	-4.267989	2.988754	4.511220
O	-4.504939	-0.037315	5.324689
H	-4.307682	3.648347	3.807523
H	-4.128766	3.456109	5.345644
H	-5.429962	0.242051	5.298738
H	-4.498685	-0.966475	5.059764

Coordonnées cartésiennes du complexe 3OHFT(Ni) (H₂O)₄⁺

C	-0.205026	-0.170502	0.290831
C	-0.028304	0.136405	1.651750
C	1.295996	0.095230	2.157448
C	2.353293	-0.233276	1.338168
C	2.138292	-0.535288	-0.023230
C	0.863478	-0.505392	-0.550460
H	1.460083	0.327505	3.201448
H	3.358835	-0.260365	1.740153
H	2.976894	-0.792090	-0.659015
H	0.666134	-0.732265	-1.590585
O	-1.433571	-0.153711	-0.264324
C	-1.186869	0.469297	2.429686
C	-2.481808	0.469705	1.800644
C	-2.555504	0.149133	0.428143
S	-1.074647	0.872719	4.100841
C	-3.748742	0.104631	-0.417740
C	-3.607502	-0.093257	-1.809987
C	-4.720148	-0.142853	-2.638448
C	-6.004273	-0.003695	-2.106837
C	-6.159727	0.187414	-0.735195
C	-5.051317	0.244417	0.104943
H	-2.621490	-0.202938	-2.239294
H	-4.585919	-0.290684	-3.703821
H	-6.871334	-0.044066	-2.756066
H	-7.151950	0.293780	-0.311512
H	-5.175880	0.394595	1.164871
O	-3.554784	0.763715	2.478116
Ni	-3.400628	1.278223	4.385262
O	-5.518569	1.504030	4.486204
O	-3.471844	1.873910	6.420808

Annexe

H	-5.851702	2.094029	5.174295
H	-5.995439	1.719562	3.675262
H	-3.251930	1.171944	7.046712
H	-2.949976	2.646644	6.671347
O	-3.197705	3.384383	3.989714
O	-3.827012	-0.654519	5.203616
H	-3.806861	3.739138	3.328854
H	-2.309640	3.586006	3.665369
H	-4.735863	-0.927333	5.020002
H	-3.257423	-1.369242	4.891582

Coordonnées cartésiennes du complexe 3OHFT (Pb) (H₂O)₂⁺

C	-0.210201	-0.229245	0.302449
C	-0.086468	-0.070194	1.693550
C	1.220491	-0.145612	2.237927
C	2.309323	-0.367055	1.424116
C	2.145779	-0.522603	0.031834
C	0.888996	-0.454680	-0.533797
H	1.348730	-0.027124	3.305481
H	3.300990	-0.422950	1.856057
H	3.009706	-0.696807	-0.597769
H	0.729298	-0.570603	-1.598200
O	-1.422864	-0.171852	-0.289387
C	-1.279946	0.154396	2.459269
C	-2.544561	0.196115	1.789818
C	-2.567492	0.033403	0.385920
S	-1.187368	0.381486	4.171427
C	-3.731566	0.074213	-0.499646
C	-3.530341	0.114622	-1.897719
C	-4.609435	0.148358	-2.769208
C	-5.915805	0.134193	-2.275136
C	-6.129540	0.088097	-0.898782
C	-5.055592	0.061693	-0.014336
H	-2.525625	0.126504	-2.296464
H	-4.432159	0.186321	-3.837650
H	-6.756902	0.158974	-2.958324
H	-7.139807	0.072307	-0.506582
H	-5.227928	0.028202	1.049048
O	-3.662164	0.384210	2.443085
Pb	-3.817817	0.711024	4.695003
O	-2.783178	2.396468	6.721462
H	-1.928687	2.298877	7.158492
H	-2.725302	3.208429	6.198617
O	-3.637766	3.339356	4.169485
H	-4.466026	3.821487	4.043126
H	-3.073145	3.588405	3.425428

Coordonnées cartésiennes du complexe 3OHFT (Zn) (H₂O)₂⁺

C	-2.222927	1.637671	0.025560
C	-0.945960	2.224211	0.012260
C	-0.884693	3.641240	0.004648
C	-2.037157	4.394752	0.010357
C	-3.302442	3.770608	0.023519
C	-3.400892	2.394377	0.031262
H	0.084389	4.122071	-0.005579
H	-1.973293	5.476005	0.004567
H	-4.202069	4.373794	0.027178
H	-4.356579	1.885960	0.040825
O	-2.359596	0.296051	0.030664
C	0.196618	1.358570	0.006040

Annexe

C	0.007216	-0.067073	0.025142
C	-1.316572	-0.558776	0.027068
S	1.793119	2.019233	-0.028496
C	-1.755267	-1.955206	0.012494
C	-3.135373	-2.243401	-0.089536
C	-3.588995	-3.554528	-0.108051
C	-2.684854	-4.615567	-0.021556
C	-1.321389	-4.347224	0.082104
C	-0.853361	-3.036343	0.097615
H	-3.849610	-1.435108	-0.158340
H	-4.651802	-3.750262	-0.190661
H	-3.042035	-5.638819	-0.035442
H	-0.611951	-5.163872	0.150904
H	0.202935	-2.835700	0.174669
O	1.019463	-0.893354	0.030096
Zn	2.812732	-0.051149	-0.057052
O	4.074988	-0.907024	1.420357
O	4.209741	-0.896828	-1.358259
H	3.627615	-1.342596	2.158398
H	4.733741	-0.317593	1.811516
H	4.606315	-1.717895	-1.037520
H	3.961352	-1.039118	-2.280973

Résumé :

La matière organique (MO) des systèmes aquatiques est constituée d'un mélange complexe de macromolécules qui a une grande capacité d'interaction avec les métaux modifiant ainsi leur biodisponibilité. Il existe une grande variété de sites complexants susceptibles de fixer les ions métalliques. L'objectif de ce travail est de mieux appréhender le processus de complexation de certains cations par différents sites chélatants oxygénés et soufrés de la MO. Pour atteindre cet objectif, trois catégories de MO ont été étudiées : la MO dissoute (MOD) issue de masse d'eau, la MOD fractionnée et des molécules modèles de la MO. Dans chacune de ces classes, des échantillons soufrés et oxygénés ont été comparés pour permettre d'évaluer l'influence de la présence de sites soufrés sur les propriétés complexantes des métaux par la MO. Les études ont été menées au moyen de méthodes de chimométrie et de chimie quantique combinées à des techniques de spectroscopie électronique. Les résultats obtenus ont montré que la MOD, caractérisée dans un premier temps, voit ses capacités complexantes augmenter avec la concentration en soufre. Le soufre semble avoir un effet sur le pouvoir complexant, mais aucune information spectrale n'a pu prouver la présence de complexes obtenus à partir de sites soufrés. L'utilisation de molécules modèles a quant à elle mis en évidence, pour un grand nombre de cations et pour deux types de fonctions, le pouvoir complexant supérieur des sites soufrés par rapport aux sites oxygénés. Il a également été montré qu'une fonction dithiol a un pouvoir de fixation des métaux plus important qu'une fonction hydroxy-thiocétone.

Mots-Clés : Matière organique, Cation métallique, Complexation, Soufre, Fluorescence, PARAFAC, UV-visible, Molécules modèles.

Abstract :

Organic matter (OM) of aquatic systems is a complex mixture of macromolecules which has a high capacity for interaction with metals and thus modifies their bioavailability. There is a wide variety of complexing sites available to bind metal ions. The objective of this work is to have a better understanding of the process of complexation of certain cations by different oxygenated and sulfur-containing chelating sites of OM. To achieve this objective, three categories of OM were studied: dissolved OM (DOM) from fresh water, fractionated DOM and model compounds of OM. In each of these classes, sulfur and oxygen samples were compared to evaluate the influence of the presence of sulfur-containing sites on the complexing properties of metals by OM. The studies were conducted using chemometric and quantum chemistry methods combined with electronic spectroscopy techniques. The results obtained showed that the DOM, characterized initially, sees its complexing capacities increase with the concentration of sulfur. Sulfur appears to have an effect on the complexing power, but no spectral information has been able to prove the presence of complexes obtained from sulfur-containing sites. The use of model molecules has shown the higher complexing power of the sulfur-containing sites compared to the oxygenated one for numerous cations and for two types of functions. It has also been shown that a dithiol function has a greater binding power of metals than a hydroxy-thioketone function.

Keywords: Organic matter, Metal Cations, Complexation, Sulfur, Fluorescence, PARAFAC, UV-Visible, Model compounds.