

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA MATIERE, DU RAYONNEMENT ET DE L'ENVIRONNEMENT

en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR

MENTION : OPTIQUE & LASERS, PHYSICO-CHIMIE, ATMOSPHERE

par

LAËTITIA DANGLETERRE

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.

soutenue le 12 décembre 2007, devant la commission d'examen :

Mr J.-C. Merlin	Université de Lille 1	Président
Mme C. Richard	Université de Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mr R. Brouillard	Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme C. Dumat	ENSAT - INPT	Examineur
Mr B. Ouddane	Université de Lille 1	Examineur
Mr J.-P. Cornard	Université de Lille 1	Directeur de thèse

A la mémoire de mes parents

*A mes deux frères Laurent et Guillaume et ma sœur Véronique
A l'ensemble de ma famille*

*A mon conjoint Bertrand
Et notre petit rayon de soleil Grégoire*

Merci

REMERCIEMENTS

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR, UMR CNRS 8516). Je tiens à exprimer mes remerciements à Messieurs Daniel BOUGEARD et Guy BUNTINX, directeurs successifs du laboratoire pour m'avoir accueillie au sein du LASIR.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Paul Cornard, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance et aider tout au long de la thèse. Ça n'a pas toujours été un rôle facile et je le remercie pour sa patience et la pertinence de ses conseils.

Je suis reconnaissante à Monsieur Jean-Claude MERLIN, Professeur à l'USTL au LASIR pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury. Je lui souhaite très sincèrement une retraite heureuse.

Je remercie également Madame Claire Richard, chercheur CNRS, directrice du Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire de Clermont-Ferrand et Monsieur Raymond Brouillard, Professeur à l'université de Strasbourg au sein de l'institut de chimie de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse.

Je suis reconnaissante à Madame Camille Dumat, maître de conférence à l'université Paul Sabatier de Toulouse et Monsieur Baghdad Ouddane, Professeur au Laboratoire Processus et Bilans des Domaines Sédimentaires de l'USTL pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

J'exprime toute ma reconnaissance et mon amitié à tous les membres du LASIR, personnels, ingénieurs, techniciens et administratifs sans qui le laboratoire ne pourrait pas fonctionner. Merci Cécile, Brigitte, Emilie, Jean-Pierre (tous les J.-P.), Pascal, Carole, Michèle, Nora, Cyrille & Christian (je n'aurai décidemment pas eu beaucoup de chance avec les ordinateurs, record à battre...).

Je voudrais exprimer toute mon amitié aux ex-colocataires de bureau que j'ai pu avoir : Guillaume, Séverine, Alexandra, Erwan (l'aprérologue !), Tao, Matthieu. Une

dédicace spéciale au bureau le plus bruyant du rez-de-chaussée ! Navrée pour les bureaux des alentours. Je pense également à tous les collègues thésards (mais néanmoins amis !) que j'ai croisé et avec qui j'ai sympathisé : merci à Stéphane L, Gilles, Virginie, Benoît, Vinh, Kasia, Nicolas, Sara, Marion, Juliette. Merci aussi à Sylvia, Odile, Christophe, Nacer, Stéphane A, Julien, Manon et bien d'autres encore. Je repense en écrivant ces mots aux bons moments passés ensemble, merci à tous d'avoir rendu le laboratoire plus qu'un lieu de travail. Je vous souhaite à tous une bonne continuation, et que vous trouviez la vérité ou votre voie, où quelle puisse se trouver !

Enfin, il n'y a pas un instant sans que je ne pense à eux : merci maman et papa de m'avoir éduqué et d'avoir fait de moi en partie ce que je suis maintenant. Les gens partent parfois trop tôt et malheureusement il faut l'accepter. Où que vous puissiez être maintenant, j'espère que vous êtes fière de moi.

Ces dernières lignes s'adressent à mon compagnon depuis bientôt quatre ans (et oui...) : merci Bertrand de m'avoir épaulée, encouragée et soutenue durant ma thèse et toutes les épreuves difficiles auxquelles il faut parfois faire face. C'est avec toi que j'ai réalisé un des plus beau projet qui soit, notre petit bébé. Merci à tous les deux.

Sommaire

Introduction générale	1
-----------------------	---

Partie A : Présentation de la problématique et des techniques utilisées

Chapitre I : Présentation des systèmes étudiés

I. Introduction.....	5
II. Les substances humiques	6
1) <i>Composition</i>	6
2) <i>Formation</i>	8
3) <i>Caractérisation</i>	10
4) <i>Structure</i>	10
5) <i>Cas du système sol</i>	12
III. Les métaux dans les systèmes naturels	14
1) <i>Origines des métaux</i>	14
2) <i>Toxicité des métaux</i>	16
3) <i>Cas des métaux étudiés</i>	17
IV. Utilisation des modèles pour l'étude de la matière organique naturelle (MON).....	25
1) <i>Interaction MON-métaux</i>	25
2) <i>Molécules modèles</i>	27
V. Conclusion	29
VI. Bibliographie.....	30

Chapitre II : Techniques et mises en œuvre expérimentales

I. Spectroscopie UV-visible	35
1) <i>Principe</i>	35
2) <i>Loi de Beer-Lambert, Principe de Franck-Condon</i>	36
3) <i>Appareillage</i>	37
II. Méthodes de détermination des stoechiométries et des constantes de formation de complexes.....	38
1) <i>Méthode des rapports molaires</i>	38
2) <i>Méthode des variations continues</i>	41
3) <i>Détermination des constantes de formation des complexes</i>	43

III. Spectroscopie de fluorescence	44
1) Principe.....	44
2) Mesure.....	46
3) Caractéristiques des spectres de fluorescence.....	49
4) Appareillage.....	53
IV. Spectroscopie Raman et MicroRaman.....	53
1) Principe.....	53
2) Appareillage.....	56
V. Calculs théoriques.....	58
1) Fondements de la théorie.....	59
2) La fonctionnelle d'échange-corrélation.....	62
3) Les fonctionnelles avec correction de gradient.....	62
4) Méthodes hybrides HF / DFT	63
5) Applications	64
VI. Bibliographie.....	66

Partie B : Complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) par des molécules modèles de la famille des polyphénols

Chapitre III : Complexation des flavonoïdes mono-sites

I. Introduction.....	69
II. Structure et propriétés des flavonoïdes	70
1) Les polyphénols.....	70
2) La famille des flavonoïdes.....	72
3) Propriétés complexantes des flavonoïdes.....	77
4) Propriétés spectroscopiques	77
III. Complexation de l'aluminium (III).....	81
1) La 3-hydroxyflavone	81
2) La 5-hydroxyflavone	85
3) La 3',4'-dihydroxyflavone.....	87
4) Comparaison avec la complexation des hydroxyflavones dans le méthanol.....	89
IV. Complexation du plomb (II)	90
1) La 3-hydroxyflavone	90
2) La 5-hydroxyflavone	93

3) <i>La 3',4'-dihydroxyflavone</i>	96
V. Complexation du zinc (II).....	100
1) <i>La 3-hydroxyflavone</i>	100
2) <i>La 5-hydroxyflavone</i>	102
3) <i>La 3',4'-dihydroxyflavone</i>	104
VI. Conclusion	107
VII. Bibliographie.....	111

Chapitre IV : Complexation par une flavone multi-site : la quercétine
--

I. Introduction.....	115
II. Complexation par la quercétine dans le méthanol	116
1) <i>Complexation du plomb (II)</i>	116
2) <i>Complexation du zinc (II)</i>	123
3) <i>Comparaison des capacités complexantes des métaux Al(III), Pb(II) et Zn(II) envers la quercétine dans le méthanol</i>	126
III. Complexation de la quercétine à pH=6.....	127
1) <i>Suivi de la complexation de Al(III) par la quercétine</i>	127
2) <i>Suivi de la complexation de Pb(II) par la quercétine</i>	129
3) <i>Suivi de la complexation de Zn(II) par la quercétine</i>	131
IV. Conclusion	133
V. Bibliographie.....	135

Chapitre V : Complexation des acides chlorogénique et gallique

I. Introduction.....	137
II. Complexation de l'acide chlorogénique	138
1) <i>Complexation de Al(III)</i>	141
2) <i>Complexation de Pb(II)</i>	144
3) <i>Complexation de Zn (II)</i>	148
4) <i>Détermination du site impliqué dans la complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) de l'acide chlorogénique</i>	151
III. Complexation de l'acide gallique	157
1) <i>Complexation de Al(III)</i>	158
2) <i>Complexation de Pb(II)</i>	164
3) <i>Complexation de Zn (II)</i>	167

4) <i>Spectroscopie Raman des complexes de l'acide gallique</i>	168
IV. Conclusion	170
V. Bibliographie.....	172

Partie C : Etude des interactions métallo-humiques

Chapitre VI : Etude d'un acide humique et de ses interactions avec les ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II)

I. Introduction.....	175
II. Caractérisation de l'acide humique utilisé.....	176
1) <i>Analyse élémentaire</i>	176
2) <i>Caractérisation spectroscopique de l'acide humique</i>	177
III. Interaction de l'acide humique avec les ions métalliques aluminium (III), plomb (II) et zinc (II).....	187
1) <i>Etat des connaissances sur les complexes métallo-humiques</i>	187
2) <i>Description usuelle des interactions métallo-humique en fluorescence</i>	190
3) <i>Complexation d'un cation métallique par l'acide humique à pH = 6</i>	191
IV. Conclusion	196
V. Bibliographie.....	197

Chapitre VII : Mise en compétition de deux ions métalliques lors de la complexation d'un acide humique

I. Introduction.....	201
II. Mode opératoire	202
1) <i>Préparation des solutions</i>	202
2) <i>Décomposition des spectres de fluorescence</i>	202
3) <i>Etat des connaissances sur les phénomènes de compétition entre métaux dans leur complexation par l'acide humique</i>	204
III. Résultats.....	205
1) <i>Compétition entre Al(III) et Pb(II)</i>	205
2) <i>Compétition entre Al(III) et Zn(II)</i>	210

3) <i>Compétition entre Pb(II) et Zn(II)</i>	214
IV. Discussion.....	218
1) <i>Influence du type de fluorophores complexés</i>	218
2) <i>Considérations globales</i>	221
V. Conclusion	225
VI. Bibliographie.....	227

Chapitre VIII : Mise en compétition d'un acide humique et de petites molécules organiques pour la complexation d'ions métalliques
--

I. Introduction.....	229
II. Principe des expériences de compétition.	230
1) <i>Déplacement des polluants dans les sols</i>	230
2) <i>Détermination des fractions complexées</i>	232
3) <i>Etudes préliminaires</i>	235
III. Compétition entre l'acide humique et l'acide chlorogénique	237
1) <i>Complexation de l'aluminium (III)</i>	237
2) <i>Complexation du plomb (II)</i>	240
3) <i>Complexation du zinc (II)</i>	243
IV. Compétition entre l'acide humique et l'acide gallique	244
1) <i>Complexation de l'aluminium (III)</i>	244
2) <i>Complexation du plomb (II)</i>	247
V. Conclusion	250
VI. Bibliographie.....	252

Conclusion générale	253
---------------------	-----

Introduction générale

Depuis plus d'un siècle, les activités humaines liées à la production de métaux non ferreux ont eu un impact important sur les milieux naturels conduisant à une accumulation des métaux dans les sols, les sédiments et les eaux. Parmi les sources historiques de pollution, les fonderies primaires de plomb et de zinc ont été les plus facilement identifiées, elles ont pollué d'importantes surfaces de sols et des rivières dans le monde suite aux émissions dans l'atmosphère de poussières chargées en espèces métalliques (Pb, Zn, Cd, etc...).

La matière organique des sols, des sédiments ou encore dissoute dans les eaux est souvent désignée comme l'un des principaux acteurs de la fixation des métaux au sein des milieux naturels. Elle est principalement constituée de deux types de molécules : les biomolécules et les composés humiques (substances colloïdales). Les substances humiques sont elles-mêmes divisées en trois groupes selon leur solubilité : les humines, les acides humiques, et les acides fulviques. Due à leur très grande capacité de complexation, les substances humiques jouent un rôle majeur dans la rétention et la mobilité des espèces métalliques et par conséquent dans leur biodisponibilité vis-à-vis des plantes, des animaux et des populations.

L'étude des acides humiques (AH) présente de multiples intérêts : par exemple, au niveau d'un sol ces macromolécules sont à la fois support et source pour les végétaux (minéralisation). Ces substances conditionnent la structure du milieu dans lequel elles se trouvent, et jouent un rôle important dans le développement des végétaux. Les substances humiques constituent également la majeure partie de la matière organique dissoute dans les eaux naturelles. L'analyse des AH constitue un domaine à part entière de la chimie de

l'environnement et les interactions régissant la complexation des espèces métalliques sont encore assez mal connues, ce qui explique l'origine de ce travail.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe "Environnement" du Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman dans la thématique "Modèles chimiques de la rétention des métaux dans les sols". Cette thématique a été créée suite à la mise en place, il y a quelques années, d'un programme régional de recherche concertée intitulé « Etude de sites pollués par les métaux ». L'un des objectifs de ce thème est d'apporter une meilleure compréhension, à l'échelle moléculaire, des mécanismes des processus telles que la complexation des métaux par les substances humiques. Les aspects expérimentaux et théoriques sont utilisés conjointement pour atteindre cet objectif. En effet, les spectroscopies moléculaires électroniques et vibrationnelles couplées aux calculs de chimie quantique sont mises en œuvre pour étudier les interactions métaux - acide humique et plus précisément, caractériser (i) les sites de fixation, (ii) le mode de fixation (mono- ou bi-dentate), (iii) l'état de protonation du site, (iv) la sphère de coordination du métal et enfin expliquer la régiosélectivité de la réaction de complexation.

Le but du travail, exposé dans ce mémoire, est d'établir un classement des différents sites de fixation des acides humiques en fonction de leur pouvoir complexant vis-à-vis d'un ion métallique donné, dans des conditions physicochimiques données. D'autre part, la matière organique est un mélange de molécules de tailles variées, des phénomènes de compétition entre composés organiques ont lieu pour la complexation et le transport des polluants. L'examen de ces compétitions entre composés de différentes tailles permet de simuler, pour mieux comprendre, les phénomènes de relargage et de rétention de métaux polluants dans les systèmes humiques.

Cependant l'étude des interactions entre métaux et substances humiques reste très délicate à cause de la poly-fonctionnalité du système chimique. Une meilleure compréhension des mécanismes de complexation peut être obtenue en étudiant des systèmes modèles qui présentent des groupements fonctionnels identiques à ceux observés dans les substances humiques. Les fonctions complexantes les plus abondantes des AH sont les groupements carboxyliques, hydroxy-phénoliques (catéchol, par exemple), hydroxy-carbonyles (et aussi plus minoritairement $-OCH_3$, $-NH_2$, $=N$, $-SH$ et $-C=O$). L'étude du mécanisme de complexation de molécules modèles contenant un seul de ces sites de fixation (ligand « mono-site ») sert à évaluer les propriétés complexantes vis-à-vis des ions métalliques dans l'objectif

d'établir un classement des différentes fonctions. Des modèles contenant plusieurs sites de complexation (ligand « multi-site ») sont également étudiés pour mieux apprécier les effets de compétition entre groupements complexants au sein d'une même structure comme c'est le cas dans les substances humiques.

Nous avons choisi ainsi de prendre des modèles de la famille des polyphénols. Ces composés sont omniprésents dans le règne végétal, et sont des précurseurs des substances humiques. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à des molécules de la famille des flavonoïdes : trois composés mono-sites (la 3-hydroxyflavone, la 5-hydroxyflavone, et la 3',4'-dihydroxyflavone) et un ligand multi-site (la quercétine), comportant les trois fonctions complexantes des molécules précédentes sur le même squelette carboné, ont été étudiés. Puis de manière à mettre en compétition les fonctions carboxyliques et catéchol, deux ligands multi-sites (les acides chlorogénique et gallique) ont également fait l'objet de notre attention. Enfin, un acide humique standard (IHSS) a également été étudié. La complexation de trois ions métalliques: l'aluminium (III), le plomb (II) et le zinc (II), présentant une toxicité notoire, a été envisagée. Le premier, très présent dans le règne végétal et minéral, a été choisi à cause de sa petite taille qui permet, par conséquent, de réduire de manière considérable les temps de calcul en chimie quantique. Les deux autres cations sont les ions de métaux lourds particulièrement étudiés à cause de la pollution historique due à leur production dans la région.

Dans une **première partie**, nous exposerons plus amplement la problématique environnementale qui a motivé nos études ainsi que les moyens mis en œuvre pour évaluer la fixation des métaux au sein de systèmes modèles ou humiques.

Puis, l'ensemble de l'étude de la complexation des trois ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II) par les modèles mono-sites (3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 3',4'-dihydroxyflavone) et multi-sites (quercétine, acides chlorogénique et gallique) sera présenté dans une **seconde partie** où l'association de différentes techniques spectroscopiques et de moyens de chimie quantique a servi à proposer les mécanismes de chélation des principales fonctions complexantes de la matière organique.

Une **troisième partie** exposera les principaux résultats concernant (i) l'analyse et la complexation des trois polluants cités précédemment par un acide humique standard; (ii) des compétitions entre ions métalliques pour la fixation de l'AH dans l'objectif d'évaluer la force de rétention de cet acide envers chacun d'eux et d'identifier les fluorophores concernés par la complexation des différents cations ; et enfin (iii) la compétition entre molécules organiques de faible poids moléculaire (les acides chlorogénique et gallique) et l'acide humique pour mieux comprendre les phénomènes de transfert de métaux polluants dans les systèmes humiques.

Partie A

Présentation de la problématique et des techniques utilisées

Chapitre I

Présentation des systèmes étudiés

Chapitre I

Présentation des systèmes étudiés

I. Introduction.....	5
II. Les substances humiques.....	6
1) Composition	6
2) Formation.....	8
3) Caractérisation	10
4) Structure.....	10
5) Cas du système sol	12
a. <u>Propriétés.....</u>	<u>12</u>
b. <u>Phénomènes de migration</u>	<u>13</u>
III. Les métaux dans les systèmes naturels.....	14
1) Origines des métaux	14
a. <u>Origine naturelle.....</u>	<u>14</u>
b. <u>Origine anthropique.....</u>	<u>15</u>
2) Toxicité des métaux	16
3) Cas des métaux étudiés	17
a. <u>L'aluminium.....</u>	<u>17</u>
b. <u>Les métaux lourds plomb et zinc.....</u>	<u>19</u>
i) <i>Le plomb.....</i>	<i>19</i>

<i>ii) Le zinc</i>	21
IV. Utilisation des modèles pour l'étude de la MON	25
1) Interaction MON-métaux	25
2) Molécules modèles	27
V. Conclusion	29
VI. Bibliographie	30

I. Introduction

Les substances humiques (SH) sont issues de la dégradation de résidus organiques via des phénomènes de dégradation et condensation ; et représentent la partie la plus importante de la matière organique des systèmes naturels (MON).

Les SH sont capables de piéger de nombreux polluants comme les pesticides, les dioxines ou les hydrocarbures. Elles jouent ainsi un rôle majeur dans la rétention des ions métalliques. Leurs propriétés complexantes sont dues principalement à certaines fonctions récurrentes : les groupements carboxyliques et phénoliques.

Dans ce chapitre, nous rappellerons quelques données importantes sur les SH (composition, formation, caractérisation, structure) en prenant en exemple le cas du système sol qui est à l'interface avec l'atmosphère. Ensuite nous exposerons le problème des métaux dans les systèmes naturels en nous attardant sur les polluants étudiés : l'aluminium (III), le plomb (II) et le zinc (II).

Dans l'approche des interactions métallo-humiques par des molécules modèles, nous expliquerons le choix des modèles pour étudier les SH.

II. Les substances humiques

La matière organique naturelle (MON) est principalement constituée de substances humiques qui viennent de la dégradation et de la transformation de la matière organique fraîche (MOF). Ces SH conditionnent la structure du milieu dans lequel elles se trouvent, et jouent un rôle important sur le développement de la flore ; leurs compositions varient selon leur origine et la MOF ainsi que des conditions environnementales.

1) Composition

La matière organique fraîche constitue la matière première de l'humus, elle est composée de divers débris de la faune et de la flore, ces déchets subissent alors soit une décomposition microbienne (minéralisation primaire qui libère des composés simples) (Figure 1) ou une humification (édification de matériaux complexes qui peuvent subir à leur tour une minéralisation secondaire).

Les types d'humus sont classés selon l'activité biologique (renouvellement de la MOF, vitesse de décomposition) et les associations organo-minérales.

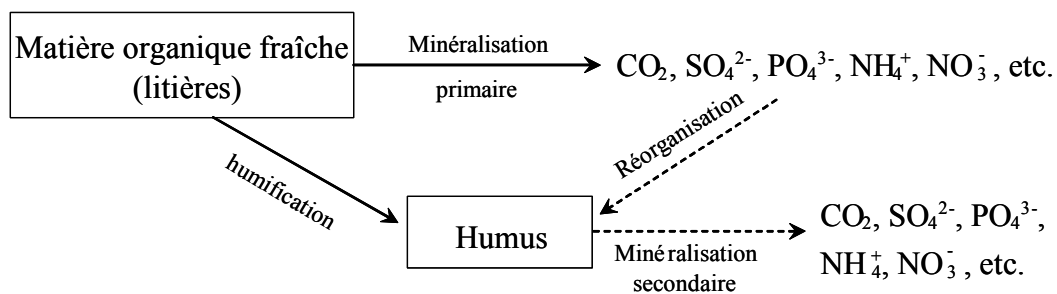


Figure 1 : Décomposition de la matière organique fraîche : humification et minéralisation d'après Duchaufour (2).

Les composés organiques de la MOF sont distribués en deux grands groupes : la biomasse et la MON. La dégradation rapide de la biomasse est à l'origine de substances servant de substrats aux micro-organismes (3) ; une décomposition plus lente forme les SH (Figure 2). On en trouve principalement de deux sortes : des biomolécules (peptides, polysaccharide, corps lipidiques) ou des composés humiques (substances colloïdales). Les composés humiques sont divisés en trois groupes selon leur solubilité : les humines, les acides humiques, et les acides fulviques.

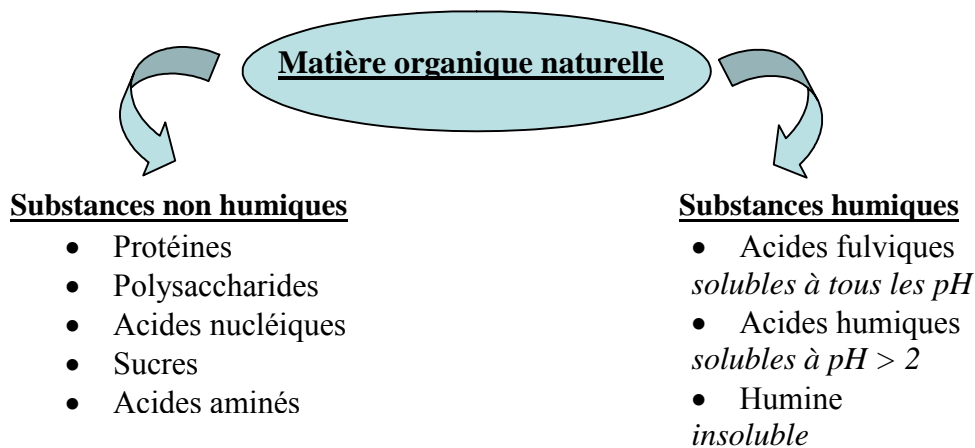


Figure 2 : Les différentes classes de la MON.

L'humification désigne l'ensemble des processus régissant la transformation de la MON. Elle fait partie du cycle de minéralisation du carbone, de l'azote ou du soufre assurant la transition des éléments constitutifs en éléments nutritifs (4, 5). Différents types d'organismes interviennent au niveau des débris organiques et permettent leur fragmentation et leur incorporation. A cette étape la MOF subit des étapes de minéralisation plus ou moins rapide selon l'environnement. Les résidus sont soit des ions solubles ou des molécules simples (CO_2 , H_2O) garantissant la restitution des éléments nécessaires aux plantes ; soit transformés en composés complexes. La MON est formé à 70% par ce type de résidus (6).

La décomposition va se produire ou être ralentie selon la présence de facteurs positifs (richesse en azote / hydrates de carbone) ou négatifs (grand rapport $\frac{\text{C}}{\text{N}}$, forte teneur en lignine

et lipides). On parle alors d'humification rapide (néoformation, Figure 3) ou lente (humification par héritage et transformation).

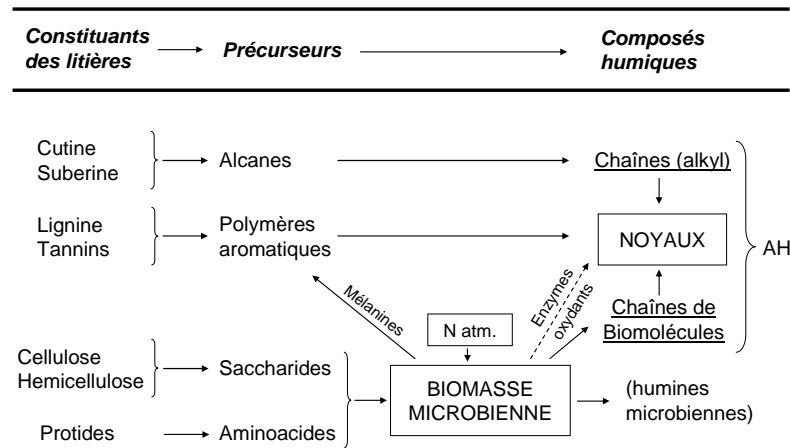


Figure 3 : Humification par néoformation d'après Duchaufour (2).

La Figure 3 résume la formation et l'évolution des composés humiques : ils sont composés de parties condensées (noyaux) de type aromatique : ceux-ci proviennent de l'oxydation par les polyphénol-oxydases (sécrétés par la microflore) des produits de dégradation de la lignine et de tanins. Lors de l'humification, les chaînes alkyles se raccourcissent et le nombre de groupements fonctionnels diminue. Certains cations vont ralentir les processus de biodégradation : ainsi Ca^{2+} à pH neutre et basique va immobiliser les précurseurs solubles, de même les ions Fe^{3+} , Mn^{2+} ou Al^{3+} vont jouer le rôle d'agent immobilisant en milieu acide.

2) Formation

L'humification est un ensemble de mécanismes complexes. Elle amène la MOF en SH par condensation oxydative et minéralisation totale. La synthèse des SH est encore mal définie et est conditionnée par de nombreux facteurs (nature de la matière organique, microfaune, pH, température, aération). Plusieurs théories expliquent la formation des SH, elles mettent en cause la lignine, les composés phénoliques, ou les polysaccharides (Figure 4).

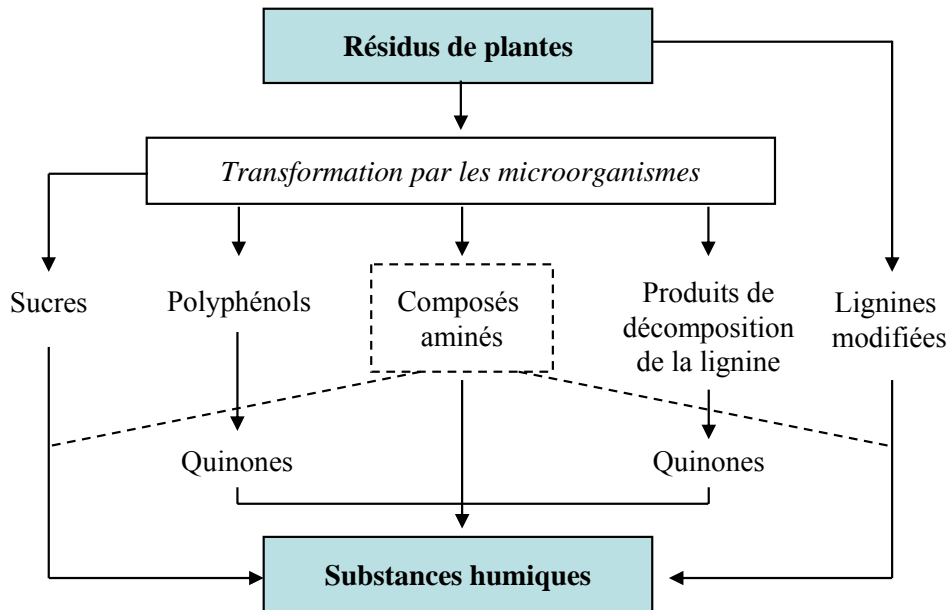


Figure 4 : Mécanisme de formation des SH d'après Stevenson (7).

Théorie 1 lignine

Certains auteurs (8-10) suggère que la lignine subit des transformations incluant la perte de groupements $-OCH_3$, la formation d'hydroxyphénols et l'oxydation de chaînes aliphatiques pour former des groupements $-COOH$. Cette hypothèse repose sur de nombreuses similitudes entre la lignine et les SH (faible dégradabilité, solubilité, nature acide, réactivité).

Théorie 2 polyphénols/quinones

Cette théorie considère les polyphénols et autres formes quinoniques comme précurseurs des SH (7). Les polyphénols proviennent de la dégradation de la MOF par des bactéries (11). Les phénols sont ensuite oxydés, transformés en quinone et dans une dernière phase dégradés, transformés et recombinaés en molécules humiques stables (12).

Théorie 3 polysaccharides

Dans une troisième hypothèse, les polysaccharides (sucres, protéines et composés cellulosiques) produits par les microorganismes sont considérés comme les précurseurs des SH (11). Les sucres réducteurs et autres acides aminés, sous-produits du métabolisme microbien, subissent une polymérisation non enzymatique pour former des polymères de SH.

Les diverses voies de production des SH citées ici sont des mécanismes probables et peut-être simultanées. Beaucoup d'auteurs refusent de favoriser une voie plutôt qu'une autre (13). La formation des SH reste encore complexe de même que sa composition (14).

3) Caractérisation

La MON regroupe un ensemble conséquent de molécules tant au point de vue structural que de leur composition. Cette diversité s'explique de par l'origine de la MOF (15). La caractérisation des SH passe avant tout par fractionnement (16). Les SH sont classées selon leur composition élémentaire : le rapport O/C différencie les acides humiques et fulviques, H/C le degré de condensation, et N/C le taux d'humification. Les méthodes d'analyse mettent en évidence une grande variété de groupements fonctionnels (carboxyliques, phénoliques, alcooliques, énoliques, quinoniques et hydroxyquinones).

La réactivité des SH est liée aux fonctions oxygénées parmi lesquelles les acides carboxyliques (-COOH) représentent la part la plus importante devant les fonctions hydroxydes (-OH). Ces fonctions, impliquées dans la complexation peuvent expliquer les propriétés hydrophiles des SH (7).

4) Structure

La littérature tente de fournir des structures relatives des SH (16), cependant elles restent mal connues et difficiles à représenter. A partir d'analyses qui mettent en évidence des groupements ou fonctions récurrents, des structures peuvent être proposées. Elles ne prennent en compte en général que la nature aromatique et phénolique des substances et des proportions de groupements carboxyliques, quinones et dérivés aminés peptidiques.

Selon Stevenson (7), les acides humiques sont des macromolécules aromatiques complexes. Les composés aliphatiques évoluent vers des groupes aromatiques et la liaison peptides/sucres aminés explique la présence d'azote (Figure 5 et Figure 6).

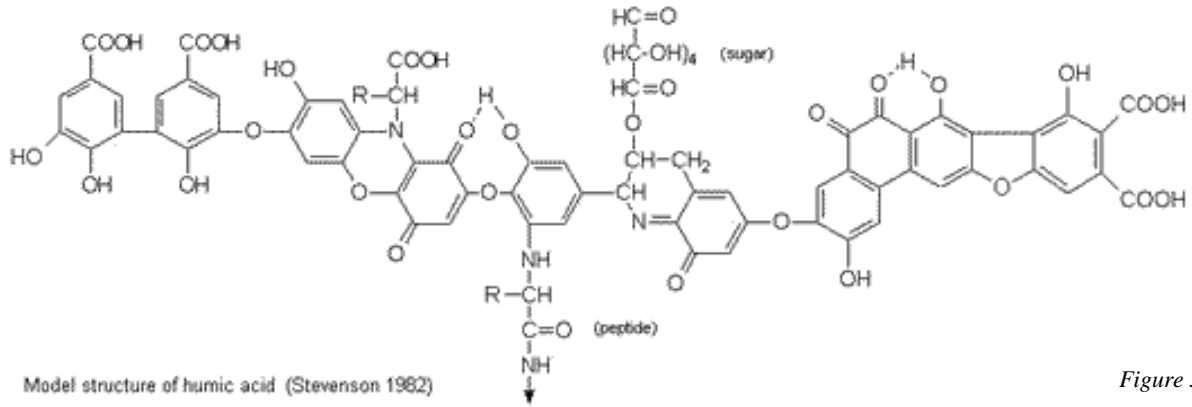


Figure 5

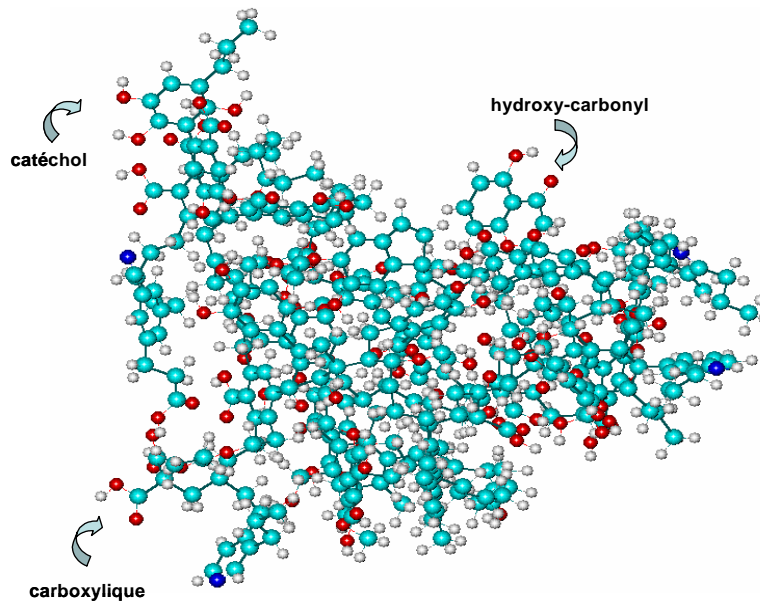


Figure 6

Figure 5 : Structure d'un acide humique selon Stevenson. Figure 6 : Macromolécule "hypothétique" de substance humique obtenue par assemblage aléatoire de différentes fractions observées dans la MOS.

Dans le modèle de Schnitzer (13), les SH présentent un motif élémentaire constitué de monomère aromatique substitué par divers radicaux. La structure des SH est le résultat de polymérisations et d'assemblages d'unités primaires consolidées par liaisons hydrogènes ou forces de Van der Waals.

Piccolo, quant à lui (17), suggère que la structure des SH n'est pas polymérique mais supramoléculaire. Il s'agirait de l'assemblage de fragments par liaisons faibles (van der Waals, interactions entre électrons π). Des observations microscopiques semblent conforter cette hypothèse : la structure des acides humiques se présente alors comme un agrégat de corpuscules complexe et ramifié (18).

En résumé, même si de nombreux modèles sont publiés, on peut distinguer deux types de structure de SH. Le premier où la structure est le reflet de la formation des SH et met en avant les composés primaires ; le second type serait obtenu à partir des propriétés et de la capacité des structures primaires à s'assembler (polymérisation, complexe supramoléculaire). L'étude de la structure des SH permet toutefois une meilleure connaissance des composants qui déterminent les propriétés des SH.

5) Cas du système sol

Le sol est un bon exemple de système naturel complexe (parmi lesquels on peut citer les cours d'eau, les marais, les sédiments) où, bien que la matière organique ne représente que 5 à 10% en masse du système, elle est responsable en grande partie de la migration et de la capture des espèces métalliques.

a. Propriétés

Le sol est l'interface entre l'atmosphère et la lithosphère, c'est un milieu complexe et multiphasique. Il est composé de différentes phases dont les proportions varient selon le type de sol ou au cours du temps. On trouve ainsi :

- la phase solide : elle est constituée de la fraction minérale (49% en volume, 81% en masse) et de la fraction organique (3% en volume, 2% en masse) ;
- la phase liquide ou solution du sol (20-35% en volume, 13-22% en masse) : on y trouve eau et espèces dissoutes provenant de l'altération des minéraux, de la décomposition de la matière organique (petits acides aminés), de gaz dissous, ou d'activités anthropiques (fertilisants). Les acides organiques occupent une place importante dans cet environnement ainsi que les colloïdes (particules entre phase dissoute et matière dissoute de taille inférieure au micron) (19, 20) ;
- et la phase gazeuse (15-30% en volume, $\approx 0\%$ en masse) : appelée atmosphère du sol, elle est constituée comme l'air avec principalement de l'azote, de l'oxygène, du gaz carbonique et du méthane sans compter les gaz issus de la respiration des êtres vivants

(H₂, NO, N₂O, NH₃, H₂S) (21, 22). Cette phase gazeuse contient moins d'oxygène et plus de CO₂ que l'air.

Le sol prend naissance à partir de la roche mère, il est issu de son altération d'origine physique et/ou chimique ou encore biologique.

Les transformations issues de ces altérations profondes sont lentes contrairement à la formation de la matière organique dans la partie supérieure du sol qui est à l'échelle humaine et dont les sources sont variées (animaux, végétaux). A plus courte échelle, l'évolution du sol va donc se faire par lessivage, par remontée de la nappe ou de par le rôle des racines (notamment lors de leurs extractions) ; et c'est à cette échelle de temps que va se ressentir les perturbations de la matière organique par les polluants.

b. Phénomènes de migration

Le profil d'un sol varie en fonction de facteurs comme le climat, la roche-mère, les organismes vivants, le temps etc. et notamment du fait des mouvements dans le sol. Les matières y circulent dans le sens descendant, par infiltration des solutions, et dans le sens ascendant, par remontée capillaire et remontée biologique (lombrics, termites en climat tropical, racines...).

En climat tempéré, il faut environ 1000 ans pour former un horizon A (sol peu évolué), plusieurs milliers d'années pour un horizon B (sol évolué). Cependant, le sol est un milieu très réactif, poreux et perméable ; il est le siège de transport, via l'eau, d'éléments dissous (Figure 7).

Si l'on prend l'exemple d'une zone industrielle, plusieurs sources de contaminations existent : les canalisations, l'usine même, les zones de dépôts de minerais ou produits, les fumées, les poussières rejetées dans l'atmosphère ... Par entraînement des eaux de pluie, les métaux peuvent alors se dissoudre selon le milieu, être transporté et alimenter la nappe. Les fumées sont sources de retombées atmosphériques qui peuvent s'étendre sur une zone

importante autour de l'usine. Les phénomènes de migration via l'eau dans le sol prennent alors toute leur importance.

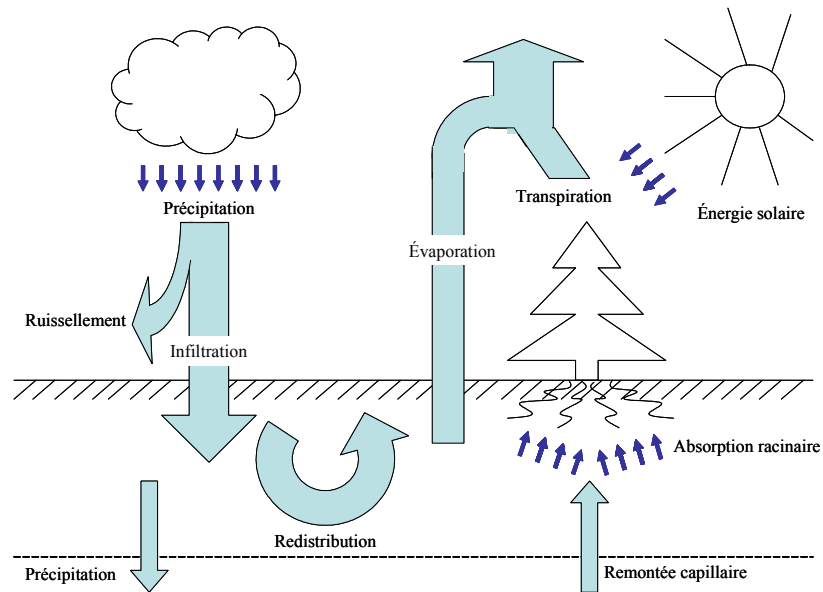


Figure 7 : Bilan hydrique (d'après 23).

Parallèlement à ce qui peut se passer au niveau du système sol, nous nous sommes intéressés d'une manière générale aux phénomènes de transports, transferts et migration des métaux par des molécules organiques. Or il est évident que parmi toute les composés organiques, ce sont les molécules organiques de faible taille qui ont la capacité de migrer contrairement aux substances humiques (responsables en grande partie de la rétention des métaux) qui ont des tailles importantes (2000 à 5000 g.mol⁻¹) et sont donc beaucoup moins mobiles.

III. Les métaux dans les systèmes naturels

1) Origines des métaux

a. Origine naturelle

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 (notion de fond géochimique). La plupart des minerais métallifères sont :

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

Quelque soit le minerai, il contient des éléments traces, coprécipités (Figure 8) (24). On trouve par exemple des gisements de minerais de galène (PbS) accompagné de traces de Ag, Zn, Cu, Cd etc. ou de sphalérite (ZnS) associés aux éléments Cd, Pb, As, Se, Ag, Au...

Solide	Éléments traces coprécipités
oxydes de Fe et d'Al	B, P, V, Mn, Ni, Cu, Zn, Mo, As, Se
oxydes de Mn	P, Fe, Co, Ni, Zn, Mo, As, Se, Pb
carbonates (Ca)	P, V, Mn, Fe, Co, Cd
illites	B, V, Ni, Co, Cr, Cu, Zn, Mo, As, Se, Pb
smectites	B, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Pb
vermiculites	Ti, Mn, Fe
matière organique	Al, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb

Figure 8 : Éléments traces coprécipités avec les principaux minéraux secondaires de la matière organique (24).

b. Origine anthropique

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 source de Cd -10/450ppm- ou de Zn - 50/450ppm-) ;
- 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.

2) Toxicité des métaux

Les métaux dans les systèmes naturels sont à l'état de trace. 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 (Tableau 1(a)).

Parmi les éléments traces, certains sont indispensables à la vie (oligo-éléments) ou à l'activité biologique mais jusqu'à un certain seuil où ils deviennent toxiques et peuvent se fixer et s'accumuler dans des organes (As, Cu, Zn, Ni, Cr...).

élément	quantité (mg/kg)	élément	quantité (mg/kg)
Fluor	700	Fer	60
Chlore	200	Fluor	37
Chrome	200	Zinc	33
Vanadium	110	Rubidium	4,6
Nickel	80	Strontium	4,6
Zinc	65	Brome	2,9
Azote	46	Cuivre	1
Cuivre	45	Vanadium	0,3
Cobalt	23	Sélénium	0,2
Plomb	15	Manganèse	0,2
Bore	3	Iode	0,2
Molybdène	1	Molybdène	0,1
Iode	0,3	Nickel	0,1
Cadmium	0,2	Chrome	0,02
Sélénium	0,09	Cobalt	0,02
		Uranium	0,001
		Beryllium	0,0003

Tableau 1 : Eléments trace dans le sol (a) et dans le corps humain en mg/kg (b). Source « Centre de documentation sur les Eléments Trace », institut pour l'UNESCO.

D'autres métaux comme Mg, Pb ou Cd n'ont pas d'activités bénéfiques et peuvent causer de nombreux troubles. La littérature abonde d'études sur les risques et effets des métaux sur la santé (25-29) : encéphalopathie, épilepsie, troubles de mémoire (Al) ; cancer de la peau, de la vessie ou du rein (As) ; changements histomorphologiques (Cu) ; troubles du système nerveux (Pb)...

3) Cas des métaux étudiés

a. L'aluminium

Du latin « alumen » : alun, l'aluminium ne fut isolé qu'en 1827 par Wöhler, mais on connaissait depuis l'antiquité l'alun (sulfate double d'aluminium et de potassium) dont les cristaux étaient utilisés pour leur propriété astringente.

L'aluminium-métal est élaboré en trois étapes à partir du minerai de bauxite (qui contient 40 à 60% du métal) ; il est d'abord raffiné, puis réduit d'alumine Al_2O_3 en aluminium Al et moulé en lingots.

L'aluminium est employé dans la fabrication d'alliages. Du fait de sa légèreté et de son inaltérabilité ; les champs d'utilisation sont variés : construction (immobilière, navale, ferroviaire), automobile, aéronautique mais aussi emballages pour l'alimentation.

L'aluminium naturel se trouve surtout dans les minerais de la croûte terrestre, il est émis lors d'activités volcaniques. La production industrielle liée aux utilisations de Al est quant à elle la 1^{ère} source anthropique du métal mais on peut citer également l'industrie minière, l'agriculture, la combustion du charbon, les fonderies ou les échappements automobiles. Les concentrations ubiquitaires sont données dans le tableau suivant (Tableau 2).

En solution, l'aluminium (III) se présente sous différentes formes en fonction du pH. Pour des pH acides (< 4), la spéciation dominante de l'aluminium est Al^{3+} généralement sous sa forme hexahydratée $Al(H_2O)_6^{3+}$ (Figure 9). Entre les pH 4 et 6, les formes $Al(OH)^{2+}$ et $Al(OH)_2^+$ coexistent ; et aux pH basiques $Al(OH)_4^-$ ↓ prédomine.

Milieu	Concentration
Air	5 à 180 pg/m ³
Eaux	
> eau douce de surface	< 0,1 mg/L
> eau de mer	< 1 µg/L
> eau souterraine	< 100 µg/L
Sols	0,7 à 100 g/Kg
Sédiments	Non disponible

Tableau 2 : Taux de métal aluminium moyen selon le milieu [source: ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry].

Dans certaines conditions de non-équilibre, l'aluminium peut se polymériser et donner les formes $Al_{13}(OH)_{32}^{7+}$ et $Al_2(OH)_2(H_2O)_8^{4+}$, ces polycations peuvent entraîner la précipitation de l'aluminium réduisant la mobilité de l'élément.

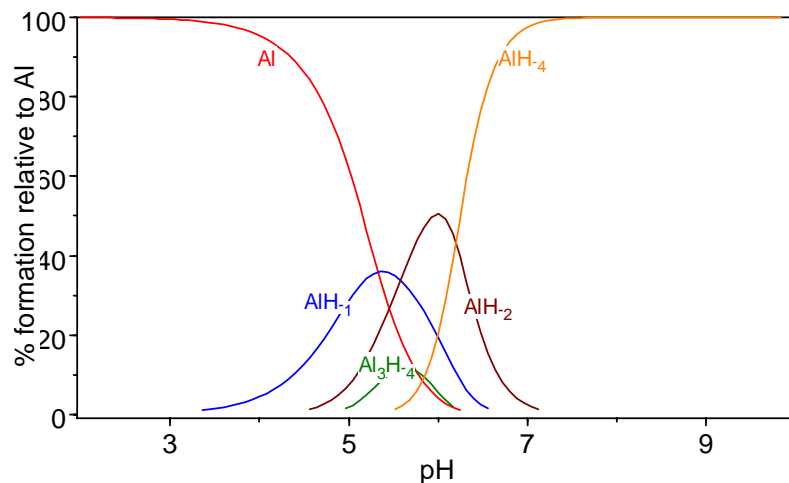


Figure 9 : Spéciation de l'aluminium en solution (réalisée à l'aide du logiciel Hyperquad Simulation and Speciation (HySS)) (30). Les formes moléculaires sont données par la formule Al_xH_y : AlH_{-1} correspond à $Al(OH)^{2+}$, AlH_{-2} à $Al(OH)_2^+$, AlH_{-4} à $Al(OH)_4^-$ et Al_3H_{-4} à $Al_3(OH)_4^{5+}$. La concentration totale en $Al(III)$ est $6.10^{-5}M$.

Dans les sols, l'aluminium (III) a grossièrement le même comportement que dans l'eau mais entre dans la composition de minéraux. Le métal sous sa forme élémentaire ne se dégrade pas dans l'environnement ; dans l'état d'oxydation $Al(III)$, il se complexe avec des espèces riches en électrons.

D'après des études portant sur des organismes marins (31), l'aluminium ne présente pas de bioaccumulation importante mais il est absorbé fortement au niveau des racines où il est complexé à du phosphore (le rendant inaccessible pour les organismes dans l'eau) ou surtout à des composés organiques (32).

Pour l'homme, l'apport journalier d'aluminium provient à 95% de l'alimentation et de l'eau. La disponibilité de l'aluminium dépend du pH intestinal, des formes ingérées, de la présence d'agents complexants (comme l'acide citrique très présent dans l'alimentation) (33). L'absorption par inhalation est corrélée à une augmentation des taux urinaires mais le métal peut aussi atteindre le cerveau et dans certain cas occasionner des fibroses pulmonaires. De nombreuses études (34-36) ont montré le potentiel neurotoxique important du métal : dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les cellules du cerveau des patients atteints contiennent de 10 à 30 fois plus d'aluminium que la normale (37).

Les effets de l'aluminium sur l'environnement ont attiré notre attention, principalement à cause des problèmes d'acidification des écosystèmes. Dans un milieu acide, l'aluminium (III) est soluble et possède alors une forte activité biocide. Il peut s'accumuler dans les plantes ou la flore en général et donc être consommé par les animaux ou l'homme et provoquer des problèmes de santé chez ces derniers.

b. Les métaux lourds plomb et zinc

Les métaux lourds sont caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 grammes par cm^3 . Quarante et un métaux correspondent à cette définition générale.

i) *Le plomb*

L'utilisation du plomb est directement liée à la métallurgie qui a connu son apogée sous l'empire romain, lorsque le plomb était utilisé pour la production de la monnaie, les canalisations, la vaisselle... Ce phénomène peut être parfaitement suivi par l'analyse des glaces polaires. La révolution industrielle a entraîné de nouvelles utilisations massives et une augmentation exponentielle des quantités de plomb produit 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).

Il existe 2 degrés d'oxydation du plomb : Pb(II) et Pb(IV) bien que la première soit majoritaire. Lorsqu'il est lié à un ligand organique, les électrons 6s de Pb(II) le rendent soit hémidirectionnel (la forme de l'orbitale moléculaire 6s bloque la moitié de l'espace) ou holodirectionnel (il n'y a pas de préférence spatiale). La plupart des composés inorganiques du plomb sont peu solubles dans l'eau (PbS, PbCO₃, PbSO₄) mais ses composés halogénés (chlorures, bromure) ou les acétates le sont beaucoup plus. Les teneurs moyennes en plomb dans l'environnement sont présentées Tableau 3.

<i>Milieu</i>	<i>Concentration</i>
Air	0,1 ng/m ³
Eaux	
> eau douce de surface	1 à 10 µg/L
> eau de mer	< 50 ng/L
> eau de pluie	< 3 ng/L
Sols	5 à 60 mg/kg
Roches	
> gabbro	1,9 mg/kg
> andésite	8,3 mg/kg
> granites	22,7 mg/kg
> schistes	23 mg/kg
> grès	10 mg/kg
> calcaires et dolomies	71 mg/kg
Sédiments	Non disponible

Tableau 3 : Concentrations moyennes en plomb [source: ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry and HSDB - Hazardous Substances Data Bank].

La mobilité du plomb dans les sols est très faible, il a tendance à s'accumuler dans les horizons de surface (notamment riches en matière organique). Effectivement, le plomb présente une grande affinité pour la MON, mais aussi pour les argiles (38).

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 est assez limitée (39). 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. Pour être absorbé, le plomb (II) doit être transformé en sel hydrosoluble (5 à 10% du métal ingéré). Le plomb (II) atmosphérique après migration jusqu'aux alvéoles pulmonaires passe dans le sang (seulement les plus fines particules) (40). 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 (41). Du fait de sa localisation dans l'os, le relargage du plomb dans le sang est un phénomène très lent.

Les effets nocifs chez l'homme se concentrent sur le système nerveux central (Figure 10). Des troubles d'ordre neurologique ont été observés chez l'homme et l'enfant (irritabilité, troubles du sommeil, anxiété, perte de mémoire, confusion, sensation de fatigue) mais aussi des perturbations du temps de réaction et de l'habileté manuelle.

Il a été montré que l'exposition au plomb entraîne un risque accru de cancers respiratoires, gastriques et vésicaux (42). De plus, une exposition prolongée au plomb amène une réduction de la production des spermatozoïdes et donc un risque d'hypofertilité (43).

ii) *Le zinc*

Le zinc est présent dans l'écorce terrestre principalement sous forme de sulfure (blende, sulfure le plus répandu de la lithosphère), accessoirement sous forme de $ZnCO_3$ (smithsonite), d'hémimorphite $Zn_4[(OH)_2Si_2O_7]H_2O$ ou d'hydrozincite $Zn_5(OH)_6(CO_3)_2$. Il est produit par hydrométallurgie en 4 étapes (enrichissement et grillage du minerai, extraction de Zn par fusion et lessivage à H_2SO_4 , purification, et raffinage électrolytique). Le zinc vient également des minerais de plomb où il est lié au cadmium.

Enfants	Plombémie (µg/L)	Adultes
	1500	
Décès →		
	1000	← Encéphalopathie
Encéphalopathie →		
Néphropathie →		← Anémie
Anémie →		
		← Longévité diminuée
Douleurs abdominales →		← Altération de la synthèse d'hémoglobine
	500	
		← Neuropathie périphérique
		← Infertilité masculine
↘ Synthèse de l'hémoglobine →	400	← Néphropathie
↘ Métabolisme de la vitamine D →	300	← Pression artérielle systolique ↗ (hommes)
		← Acuité auditive ↘
↘ Vitesse de conduction nerveuse →	200	← Protoporphirines érythrocytaires ↗ (hommes)
		← Protoporphirines érythrocytaires ↗ (femmes)
↗ Protoporphirines érythrocytaires →		
↘ (?) Métabolisme de la vitamine D →		
Toxicité neurologique →		
↘ QI →		← Hypertension ↗ (?)
↘ Audition →	100	
↘ Croissance →		
Passage placentaire →		

↗ : fonction croissante ↘ : fonction décroissante

Figure 10 : Effet du plomb sur l'homme (concentration sanguine minimale pour l'observation des effets décrits) [source : ATSDR 1999 -Agency for Toxic Substances and Disease Registry].

Son utilisation principale se trouve dans les revêtements de protection des métaux contre la corrosion (galvanoplastie, métallisation), et dans des activités plus éparées (alliages, constructions...).

Dans l'atmosphère, le zinc est présent entre autre par suite du transport de particules du sol, d'éruptions volcaniques, ou d'émission d'aérosols marins (Tableau 4).

<i>Milieu</i>	<i>Concentration</i>
Air	0,01 à 0,2µg/m ³
Eaux de surface	
> rivières	10 µg/L
> lacs	20 µg/L
> mers	< 1 µg/L
Eau souterraine	100 µg/L
Eau de pluie	10 µg/L
Sols	
> en général	10 à 300 mg/Kg
> sols sableux	20 à 45 mg/Kg
> tourbe	55 à 140 mg/Kg
> argile	70 à 150 mg/Kg
Sédiments	70 à 140 mg/Kg

Tableau 4 : Concentrations ubiquitaires du zinc dans l'environnement. [Source : CE(1999) – Risk assessment for zinc].

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.

Le zinc (II) dans l'eau existe sous diverses formes (Figure 11) : ion hydraté $Zn(H_2O)^{2+}$, complexé avec des ligands organiques, zinc adsorbé... La spéciation du zinc est très complexe et dépend de nombreux facteurs comme le pH, la quantité de MON, ou le potentiel rédox. Si les chlorure et sulfate de zinc sont très solubles dans l'eau, ils peuvent s'hydrolyser en solution pour former un précipité d'hydroxyde de zinc. Dans les sols, le zinc se trouve généralement à l'état d'oxydation +II mais d'autres formes ioniques peuvent se rencontrer (44).

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).

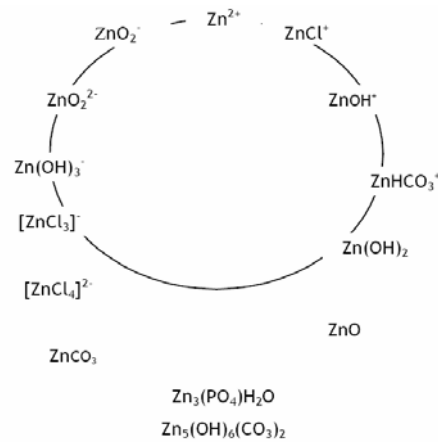


Figure 11 : Différentes formes du zinc en solution.

Parmi les facteurs qui affectent la disponibilité de Zn(II), la quantité total de Zn, le pH, la matière organique, les sites d'absorption, l'activité microbienne et l'humidité jouent des rôles importants (39). 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. Son potentiel de bioaccumulation est faible chez les mammifères. Chez l'homme, c'est l'un des oligo-éléments les plus abondants. Il intervient au niveau de la croissance, du développement osseux, cérébral et foetal, de la reproduction, du goût, de l'odorat et des fonctions immunitaires. On trouve du zinc dans tous les organes et tissus de manière non spécifique. La pénétration dans l'organisme se fait principalement par voie orale, la voie cutanée reste marginale bien qu'il soit présent dans de nombreux cosmétiques. 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. Pour des expositions suivies, on note une fréquence plus élevée des troubles gastro-intestinaux. 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 (45).

L'intérêt que nous avons porté à ces métaux lourds est en partie dû à la pollution particulière de ces derniers dans la région (pollution atmosphérique de sites

pyrométallurgiques, ex-usine Métaleurop). De plus, ceux-ci font partie des polluants les plus courants.

IV. Utilisation des modèles pour l'étude de la MON

L'étude des interactions métaux – substance humique 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 (46-48), molécules précurseurs ou fragments de la MOS (49, 50), qui présentent des groupements fonctionnels identiques à ceux observés dans les substances humiques (51-57).

1) Interaction MON-métaux

Le risque majeur en terme de pollution est l'accumulation continue de substances toxiques dans l'environnement. 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 » (58, 59). Cette potentialité est alors exprimée lors de la mobilisation de produits stockés lors d'altérations du milieu naturel. C'est pour cela qu'il est important de connaître et déterminer les risques encourus ; cela implique : l'identification des substances accumulatrices, les mécanismes de stockage et les facteurs influençant le relargage des polluants (Figure 12).

Un des objectifs du travail réalisé est d'évaluer le potentiel de rétention des métaux par la matière organique car cette dernière est un des principaux acteurs du danger latent émanant de la pollution des milieux naturels car la MON possède une capacité de stockage spécifique aux métaux. De plus, les interactions métaux/MON sont sensibles à la fois aux conditions physico-chimiques (comme le pH) et à la nature et la dynamique de la MON : ce sont donc d'excellents indices sur l'état d'un système naturel.

Enfin si la MON affecte le taux de métaux biodisponible, la complexation des métaux avec la matière organique la mobilise et joue alors un rôle sur l'évolution et la constitution du milieu.

Il s'avère donc crucial de connaître les interactions métaux/MON. Malheureusement la matière organique est très complexe de par sa grande hétérogénéité, ses diverses interactions possibles ou son évolution spatiale et temporelle. Les acides humiques sont reconnus pour leur capacité à complexer les métaux principalement grâce à leurs fonctions $-COOH$ et $\phi-OH$ (et aussi dans une moindre importance $-OCH_3$, $-NH_2$, $=N$, $-SH$ et $-C=O$) (60).

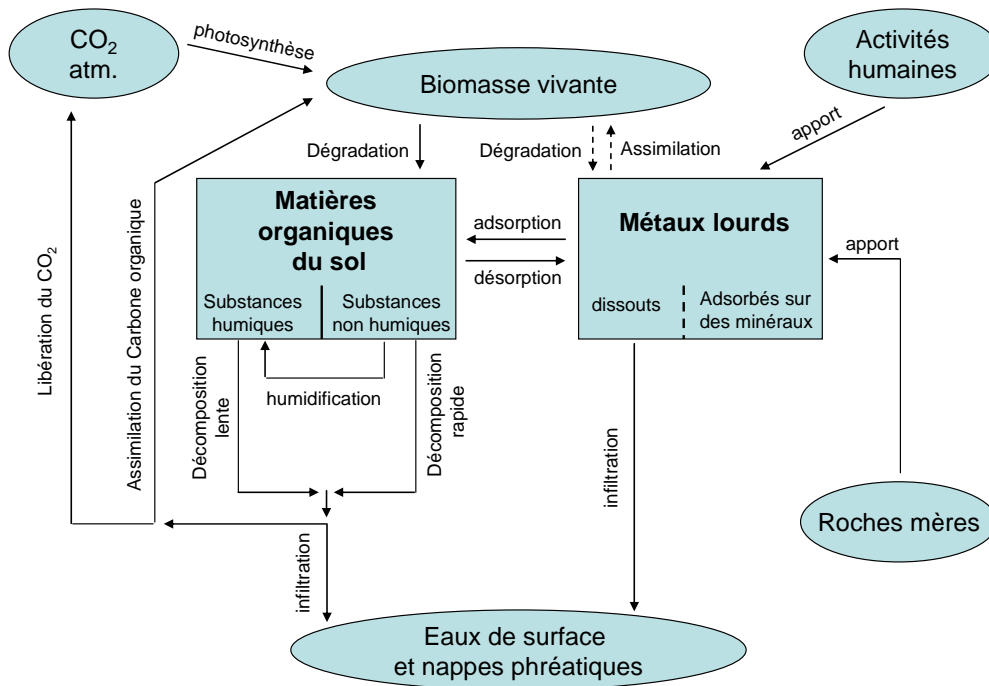


Figure 12 : Principaux réservoirs et processus de transfert affectant le cycle du carbone et des métaux dans le système sol (39).

Les acides humiques sont donc un des agents majeurs de la biodisponibilité, cependant ces macromolécules ne sont que peu responsables du transport des polluants et pour appréhender à la fois ces mécanismes de migration et étudier les fonctions majeures des acides humiques, nous avons examiné des molécules modèles de faibles tailles.

2) Molécules modèles

Les modèles de la MON ont fait l'objet de nombreuses publications au sein de l'équipe (61-74).

Les ions métalliques peuvent se rencontrer sous trois formes dans un milieu quel qu'il soit : libres, associés à des complexes inorganiques (adsorption, précipitation, occlusion, liés à la biomasse) ou organiques.

Les fonctions de la matière organique les plus complexantes sont les groupements carboxyliques et hydroxy-phénoliques (24). La stabilité des complexes formés augmente en partie avec le nombre de sites par molécules (75) : il nous a semblé alors intéressant d'analyser des molécules contenant un seul site de complexation (Figure 13) puis d'autres en ayant plusieurs (Figure 14) pour évaluer les effets de compétition entre groupements complexants. Les modèles étudiés font partie de la famille des polyphénols et présentent des sites α -hydroxy-carbonyle, β -hydroxycarbonyle, catéchol et carboxyliques qui sont tous susceptibles de fixer des métaux.

Par la suite, ces molécules, omniprésentes dans les végétaux et qui sont aussi des précurseurs de l'acide humique seront mis en compétition avec ce dernier afin de mieux appréhender les phénomènes de « relargage » ou de rétention de métaux polluants dans les sols.

Les expériences menées (études de l'acide humique, des modèles et des compétitions) seront réalisées dans des conditions les plus proches du milieu naturel. Un pH légèrement acide (de 6) a été choisi, il correspond au pH moyen d'un sol cultivé ou d'un cours d'eau (76). La force ionique (f_i) du milieu réactionnel fixée à 0,1M (en NaCl). Malheureusement, dans le cas des flavonoïdes, la très faible solubilité dans l'eau de ces composés a conduit à faire les manipulations en milieu méthanoïque ; mais afin de se mettre dans des conditions proches du milieu naturel, les mêmes études ont été réalisées dans un solvant mixte eau-méthanol (50%-50% en volume) où le pH a pu toutefois être fixé à 6.

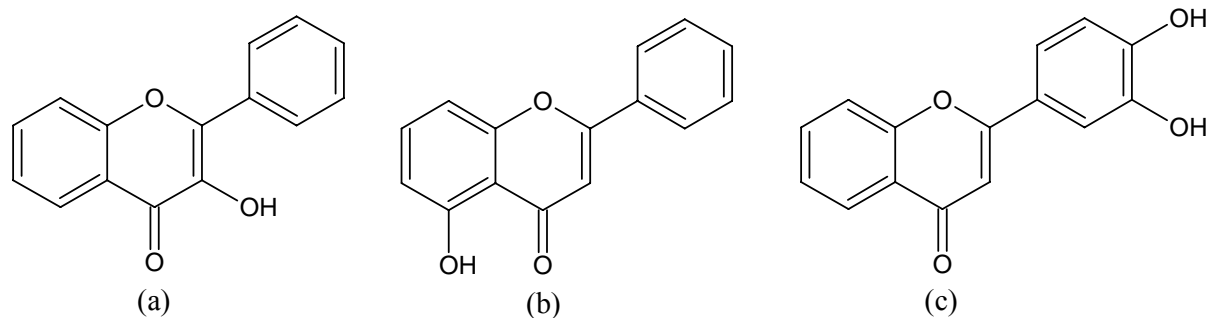


Figure 13 : Structures des molécules modèles mono-sites étudiées ; (a) 3-hydroxyflavone (b) 5-hydroxyflavone et (c) 3',4'-dihydroxyflavone. Ces trois éléments appartiennent à la famille des flavonoïdes, une famille de composés végétaux omniprésents dans la nature.

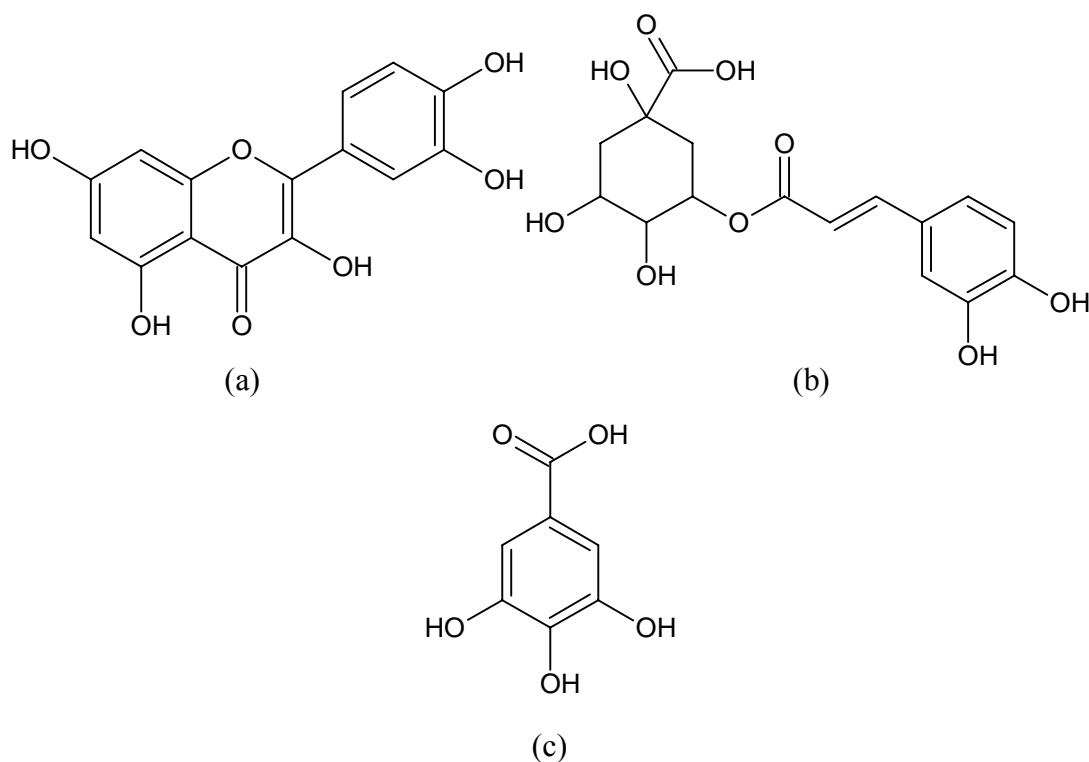


Figure 14 : Structures des molécules modèles multi-sites ; (a) quercétine (b) acide chlorogénique et (c) acide gallique. Le premier composé possède la même structure et les trois fonctions présentes dans les modèles mono-sites, les deux autres composés permettent d'approfondir l'étude de l'effet de compétition de groupes chélateurs au sein d'une même structure.

V. Conclusion

Dans les systèmes naturels, la matière organique est la principale responsable de la mobilisation des métaux. Elle est composée de:

- une partie brute dans laquelle on reconnaît encore des structures végétales et animales: débris de feuilles, tiges, racines, organes d'insectes...
- une partie transformée résultant de l'évolution de la précédente.

On estime que les acides humiques sont des « réservoirs » de polluants mais que la biodisponibilité de ces derniers (lié à leur mobilité) vient de la présence de fragments de faible masse moléculaire mobiles à travers les différentes couches du sol.

L'étude de molécules modèles possédant des sites similaires à ceux rencontrés dans les biopolymères naturels permet de connaître les capacités complexantes des fonctions les plus répandues.

De plus en mettant ces composés en compétition avec des SH tel que l'acide humique, une simulation des systèmes naturels peut être réalisée afin de mieux appréhender le transport/transfert des polluants dans les milieux naturels, c'est ce qui sera réalisé par la suite.

VI. Bibliographie

1. Caudron, A. (2004) *Thèse de Doctorat*, Université des Sciences et Technologies de Lille.
2. Duchaufour, P. (1997) *Abrégé de pédologie, 5ème édition* (Masson).
3. Vaughan, D. & Ord, B. (1990) *Journal of the Science of Food and Agriculture* **52**, 289-299.
4. Balesdent, J. & Mariotti, A. (1996) *Mass Spectrometry of Soils*, 83-111.
5. Paul, E. A. & Clark, F. E. (1989) *Soil Microbiology and Biochemistry*.
6. Stott, D. E., Martin, J. P., Focht, D. D., & Haider, K. (1983) *Soil Science Society of America Journal* **47**, 66-70.
7. Stevenson, F. J. (1982) *Humus Chemistry* (Wiley, New York).
8. Felbeck, G. T., Jr. (1971) *Soil Science* **111**, 42-48.
9. Flaig, W. (1988) *Life Sciences Research Report* **41**, 75-92.
10. Waksman, S. A. & Iyer, K. R. N. (1932) *Soil Science* **34**, 43-69.
11. Kononova, M. M. (1966) *Soil Organic Matter: Its Nature, Its Role in Soil Formation and in Soil Fertility. 2nd ed.*
12. Flaig, W. (1964) *Geochimica et Cosmochimica Acta* **28**, 1523-1535.
13. Schnitzer, M. (1978) *Developments in Soil Science* **8**, 1-64.
14. MacCarthy, P. (2001) *Soil Science* **166**, 738-751.
15. Pal, S. (1992) *Plant and Soil* **140**, 75-84.
16. Schnitzer, M., Khan, S. U., & Editors (1978) *Developments in Soil Science, Vol. 8: Soil Organic Matter*.
17. Piccolo, A. (2002) *Advances in Agronomy* **75**, 57-134.
18. Almendros, G. & Sanz, J. (1992) *Geoderma* **53**, 79-95.

19. Holocher, J., Peeters, F., Aeschbach-Hertig, W., Kinzelbach, W., & Kipfer, R. (2003) *Environmental Science and Technology* **37**, 1337-1343.
20. Strobel, B. W., Bruun Hansen, H. C., Borggaard, O. K., Andersen, M. K., & Raulund-Rasmussen, K. (2001) *Biogeochemistry* **56**, 1-26.
21. Joubert, A. V. P., Lucas, L., Garrido, F., Joulain, C., & Jauzein, M. (2007) *Environmental Pollution (Amsterdam, Netherlands)* **148**, 749-758.
22. Zhuk, L. I., Danilova, E. A., Yashina, T. Y., & Kist, A. A. (2001) *NATO Science Series, IV: Earth and Environmental Sciences* **5**, 217-225.
23. Stengel, P., Gelin, S., & Editors (1998) *Soil: Fragile Interface*.
24. Sposito, G. (1989) *The chemistry of soils* (Oxford University Press, Inc.).
25. Afridi, H. I., Kazi, T. G., Jamali, M. K., Kazi, G. H., Arain, M. B., Jalbani, N., Shar, G. Q., & Sarfaraz, R. A. (2006) *Toxicology and Industrial Health* **22**, 381-393.
26. Masoud, M. S., El-Samra, M. I., & El-Sadawy, M. M. (2007) *Chemistry and Ecology* **23**, 201-216.
27. Oesterholt, F., Martijnse, G., Medema, G., & van der Kooij, D. (2007) *Journal of Water Supply: Research and Technology--AQUA* **56**, 171-179.
28. Vahter, M., Aakesson, A., Liden, C., Ceccatelli, S., & Berglund, M. (2007) *Environmental Research* **104**, 85-95.
29. Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., & Hitmi, A. (2007) *Chemosphere* **68**, 1563-1575.
30. Hyperquad Simulation and Speciation (2000) (Protonic Software).
31. Havas, M. (1985) *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **42**, 1741-1748.
32. Juste, C., Chassin, P., Gomez, A., Lineres, M., Mocquot, B., Feix, I., & Wiart, J. (1995) *Adème : Connaître pour Agir, Guides et cahiers techniques* **1799**.
33. Stauber, J. L., Florence, T. M., Davies, C. M., Adams, M. S., & Buchanan, S. J. (1999) *Journal - American Water Works Association* **91**, 84-93.
34. Bocca, B., Alimonti, A., Bomboi, G., Giubilei, F., & Forte, G. (2006) *Trace Elements and Electrolytes* **23**, 270-276.
35. Miu, A. C. (2006) *Journal of Alzheimer's Disease* **10**, 39-42.
36. Reusche, E. (2002) *Research in Legal Medicine* **27**, 175-189.
37. Harrington, C. R., Wischik, C. M., McArthur, F. K., Taylor, G. A., Edwardson, J. A., & Candy, J. M. (1994) *Lancet* **343**, 993-997.

38. Adriano, D. C. (1986) *Trace Elements in the Terrestrial Environment*.
39. Alloway, B. J. (1995) *Heavy Metals in Soils, Second Edition* (Blackie Academic & Professional).
40. Botta, A., Poyen, D., & Mathias, A. (1975) *Revue de Medecine du Travail* **3**, 303-307.
41. Wedeen, R. P. (1988) *Environmental Health Perspectives* **78**, 57-60.
42. Fu, H. & Boffetta, P. (1995) *Occupational and Environmental Medicine* **52**, 73-81.
43. Lin, S., Hwang, S. A., Marshall, E. G., Stone, R., & Chen, J. (1996) *Annals of epidemiology* **6**, 201-208.
44. Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (1989) *Trace Elements in Soils and Plants*.
45. Chandra, R. K. (1984) *JAMA, the Journal of the American Medical Association* **252**, 1443-1446.
46. Neill, C. & Gignoux, J. (2006) *Soil Biology & Biochemistry* **38**, 803-811.
47. Schulten, H.-R. & Leinweber, P. (1996) *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **38**, 1-53.
48. Aplincourt, M., Bee-Debras, A., & Prudhomme, J. C. (1988) *Science du Sol (1984)* **26**, 157-168.
49. van Hees, P. A. W., Jones, D. L., Nyberg, L., Holmstroem, S. J. M., Godbold, D. L., & Lundstroem, U. S. (2005) *Soil Biology & Biochemistry* **37**, 517-531.
50. van Hees, P. A. W., Vinogradoff, S. I., Edwards, A. C., Godbold, D. L., & Jones, D. L. (2003) *Soil Biology & Biochemistry* **35**, 1015-1026.
51. Bartoli, F. & Philippy, R. (1990) *Soil Science* **150**, 745-751.
52. Bradl, H. B. (2004) *Journal of Colloid and Interface Science* **277**, 1-18.
53. Brunelot, G., Adrian, P., Rouiller, J., Guillet, B., & Andreux, F. (1989) *Chemosphere* **19**, 1413-1419.
54. Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E. J., Pan, H., & Dai, S. (2002) *Chemosphere* **48**, 59-68.
55. Kaiser, M. & Ellerbrock, R. H. (2005) *Geoderma* **127**, 196-206.
56. Karlsson, T., Elgh-Dalgren, K., Bjoern, E., & Skyllberg, U. (2007) *Geochimica et Cosmochimica Acta* **71**, 604-614.
57. Sebastia, J., Labanowski, J., & Lamy, I. (2007) *Chemosphere* **68**, 1245-1253.

58. Lehmann, B. (1998) *Mercury from gold and silver mining: a chemical time bomb?*, edited by Lacerda L. D. de, Salomons W.
59. Ma, W. C. & van der Voet, H. (1993) *The Science of the total environment* **Suppl Pt 2**, 1701-1714.
60. Stevenson, I. L. & Schnitzer, M. (1982) *Soil Science* **133**, 179-185.
61. Andre, E., Cornard, J.-P., & Lapouge, C. (2007) *Chemical Physics Letters* **434**, 155-159.
62. Lapouge, C., Dangleterre, L., & Cornard, J.-P. (2006) *Journal of Physical Chemistry A* **110**, 12494-12500.
63. Cornard, J.-P. & Lapouge, C. (2006) *Journal of Physical Chemistry A* **110**, 7159-7166.
64. Cornard, J.-P., Caudron, A., & Merlin, J.-C. (2006) *Polyhedron* **25**, 2215-2222.
65. Cornard, J. P., Dangleterre, L., & Lapouge, C. (2006) *Chemical Physics Letters* **419**, 304-308.
66. Dangleterre, L. & Cornard, J.-P. (2005) *Polyhedron* **24**, 1593-1598.
67. Cornard, J.-P., Rasmiwetti, & Merlin, J.-C. (2005) *Chemical Physics* **309**, 239-249.
68. Cornard, J. P., Dangleterre, L., & Lapouge, C. (2005) *Journal of Physical Chemistry A* **109**, 10044-10051.
69. Cornard, J.-P. & Merlin, J.-C. (2003) *Journal of Molecular Structure* **651-653**, 381-387.
70. Cornard, J.-P. & Merlin, J.-C. (2002) *Journal of Inorganic Biochemistry* **92**, 19-27.
71. Cornard, J. P. & Merlin, J. C. (2002) *Polyhedron* **21**, 2801-2810.
72. Cornard, J.-P. & Merlin, J.-C. (2001) *Journal of Molecular Structure* **569**, 129-138.
73. Cornard, J.-P., Boudet, A.-C., & Merlin, J.-C. (2001) *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **57**, 591-602.
74. Boudet, A.-C., Cornard, J.-P., & Merlin, J.-C. (2000) *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **56**, 829-839.
75. Schindler, P. W. (1990) *Reviews in Mineralogy* **23**, 281-307.
76. Richman, D. L., Tucker, C. L., & Koehler, P. G. (2006) *Pest Management Science* **62**, 1216-1223.

Chapitre II

Techniques et conditions expérimentales

Chapitre II

Techniques et mises en œuvre expérimentales

I. Spectroscopie UV-visible	35
1) Principe.....	35
2) Loi de Beer-Lambert, Principe de Franck-Condon	36
3) Appareillage	37
II. Méthodes de détermination des stoechiométries et des constantes de formation de complexes	38
1) Méthode des rapports molaires.....	38
2) Méthode des variations continues	41
3) Détermination des constantes de formation des complexes.....	43
III. Spectroscopie de fluorescence	44
1) Principe.....	44
2) Mesure	46
3) Caractéristiques des spectres de fluorescence	49
a. <u>Intensité de fluorescence stationnaire.....</u>	<u>49</u>
b. <u>Les différents types de spectres de fluorescence.....</u>	<u>51</u>
4) Appareillage	53

IV. Spectroscopie Raman et MicroRaman.....	53
1) Principe.....	53
2) Appareillage	56
a. <u>Spectromètre FT Raman RFS 100/S (BRUKER)</u>	<u>56</u>
b. <u>Microspectromètre HoloLab Series 5000 (Kaiser Optical Systems)</u>	<u>57</u>
V. Calculs théoriques.....	58
1) Fondements de la théorie	59
2) La fonctionnelle d'échange-corrélation.....	62
3) Les fonctionnelles avec correction de gradient.....	62
4) Méthodes hybrides HF / DFT.....	63
5) Applications.....	64
VI. Bibliographie	66

I. Spectroscopie UV-visible

1) Principe

En spectroscopie UV-visible, l'absorption d'un photon d'énergie correspondante au domaine UV-visible (Figure 1) fait passer une molécule d'un état fondamental à un état électronique excité. Les orbitales moléculaires mises en jeu sont de différents types: σ (association d'orbitales atomiques s ou p ayant leurs axes de symétrie colinéaires), π (association d'orbitales atomiques p se recouvrant latéralement) et n (paire d'électrons non liants localisés sur des hétéroatomes).

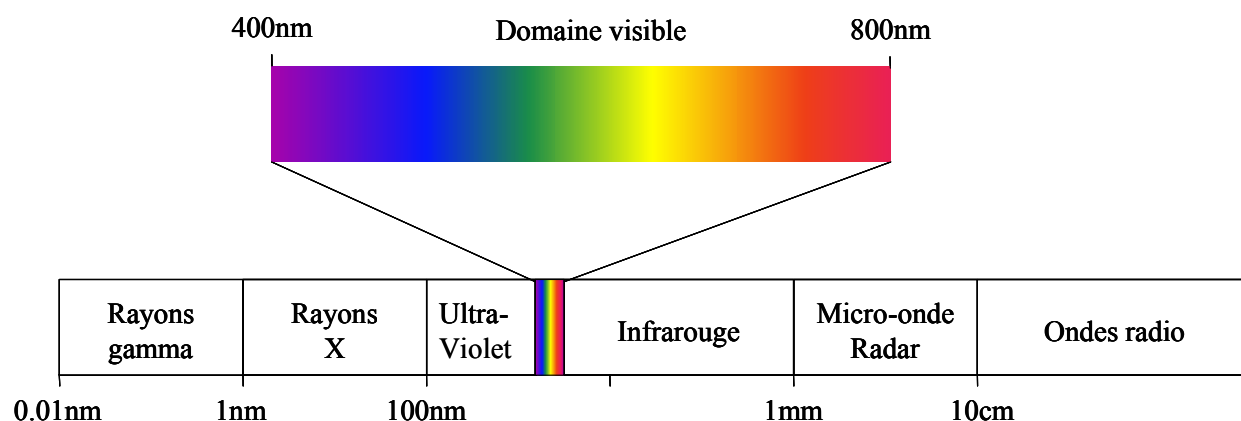


Figure 1 : Domaine du rayonnement électromagnétique en fonction de la longueur d'onde.

Pour un état électronique donné, l'ordre d'énergie des orbitales moléculaires est généralement le suivant : $\sigma < \pi < n$. Par conséquent, l'ordre croissant des énergies des transitions électroniques est en général : $n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$.

Nous aurons des phénomènes d'autant plus remarquables pour des systèmes possédant des électrons facilement excitables par le rayonnement UV-visible : il s'agit de molécules organiques insaturées (chromophores) ou d'espèces inorganiques possédant des électrons dans des orbitales d.

Effectivement la présence d'une double liaison isolée ou d'un hétéroatome (O, S etc.) suffit à permettre une détection dans le proche UV d'un composé organique. Les systèmes fortement délocalisés ont une énergie de transition $\pi \rightarrow \pi^*$ d'autant plus faible que le nuage d'électrons π est plus étendu : la bande d'absorption se situera d'autant plus vers les grandes longueurs d'onde.

2) Loi de Beer-Lambert, Principe de Franck-Condon

On mesure l'efficacité d'absorber un rayonnement UV-visible par l'absorbance $A(\lambda)$ ou la transmittance $T(\lambda)$:

$$\text{Équation 1} \quad A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} = -\log T(\lambda)$$

où I_{λ}^0 et I_{λ} sont les intensités des faisceaux incident et transmis.

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

$$\text{Équation 2} \quad A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} = \varepsilon(\lambda) * l * c$$

où $\varepsilon(\lambda)$ est le coefficient d'absorption molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), c la concentration ($mol \cdot L^{-1}$) 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.

Les mouvements des électrons sont beaucoup plus rapides que ceux des noyaux, et ainsi la promotion d'un électron pendant l'absorption d'un rayonnement ($10^{-15}s$) est beaucoup plus rapide que la vibration moléculaire ($10^{-10}-10^{-12}s$). Ceci est à la base du principe de Franck-

Condon : une transition électronique se produit sans changement des positions des noyaux dans l'entité moléculaire.

La largeur d'une bande d'un chromophore situé dans un microenvironnement particulier résulte de deux effets : les élargissements homogènes et inhomogènes. L'élargissement homogène est dû à l'existence de sous niveaux vibrationnels dans un état électronique. L'élargissement inhomogène résulte des fluctuations de la structure de la couche de solvation entourant le chromophore. Ces effets sont les mêmes dans le cas de la fluorescence.

Ainsi par exemple, le spectre d'absorption de l'acide humique est la résultante d'un très grand nombre de contributions, dans lequel il est impossible de distinguer un maximum (Figure 2).

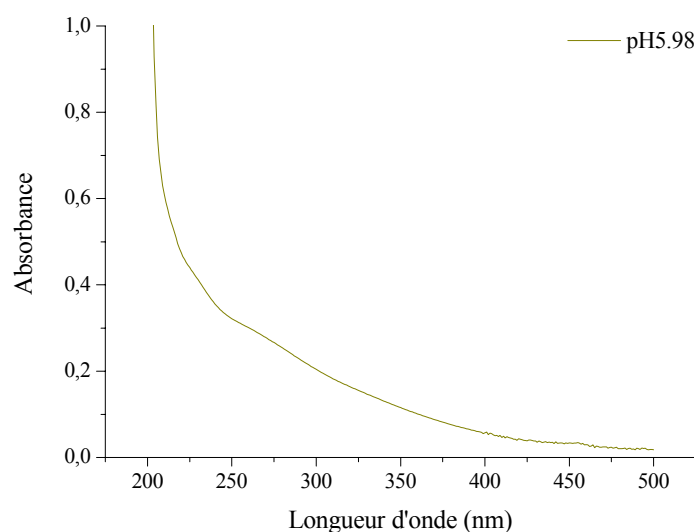


Figure 2 : Spectre UV-visible de l'acide humique (10 mg/L) dans l'eau à pH = 5,98, force ionique de 0.1 M.

3) Appareillage

Les spectres d'absorption électronique ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Cary UV 100 Bio (Varian) entre 200 et 500 nm à une vitesse de 150 nm/min pour tous les composés étudiés avec une résolution spectrale de 1 nm. Dans le cas des dosages, un dispositif à circulation a été mis en place, en utilisant une cuve en quartz spécifique. Ce

montage permet de faire des ajouts directement dans un bécher. Une pompe péristaltique permet de faire une circulation de la solution entre le bécher et la cellule de mesure.

II. Méthodes de détermination des stoechiométries et des constantes de formation de complexes

1) Méthode des rapports molaires

Cette méthode, introduite par Yoe et Jones (1) permet de déterminer la stoechiométrie des complexes en solution à partir des différentes données spectrométriques.

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

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 3) :

- Dans le cas de la formation d'un complexe unique possédant une constante de complexation élevée, la courbe $A(\lambda_{max})$ en fonction de R (Figure 3a) est composée de deux droites dont le point d'intersection donne directement le rapport $\frac{[M]}{[L]} = \frac{y}{x}$ du complexe (stoechiométrie).

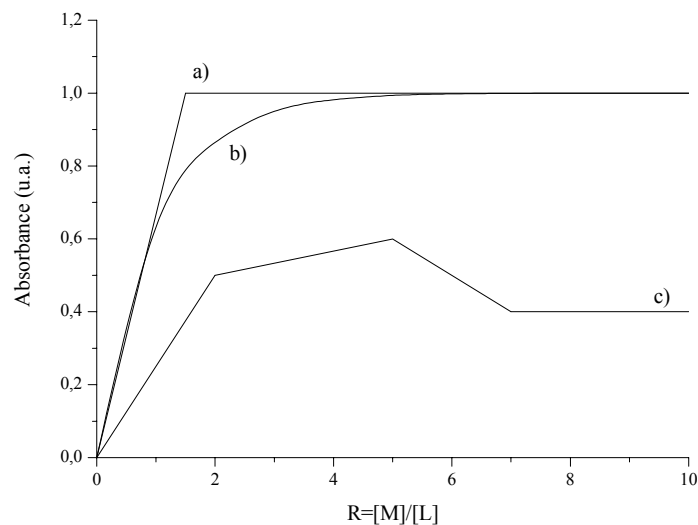


Figure 3 : Absorbance à λ_{max} en fonction du rapport molaire $[M]/[L]$. a) formation d'un complexe unique de constante d'équilibre élevée, b) formation d'un complexe unique de constante d'équilibre plus faible et c) formation successive de trois complexes de constantes d'équilibre distinctes.

- Pour un complexe unique ayant une constante de complexation plus faible, on observe une variation graduelle de la pente (Figure 3b), 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 3c). Les abscisses des changements de pente correspondent aux compositions des différents complexes formés.

Dans l'exemple de la complexation de la 3-hydroxyflavone (3HF) par le plomb (II) dans le méthanol, le faisceau de spectres UV-visible (Figure 4) laisse apparaître des points isobestiques, signes que seuls deux espèces sont en équilibre (la 3HF et son complexe).

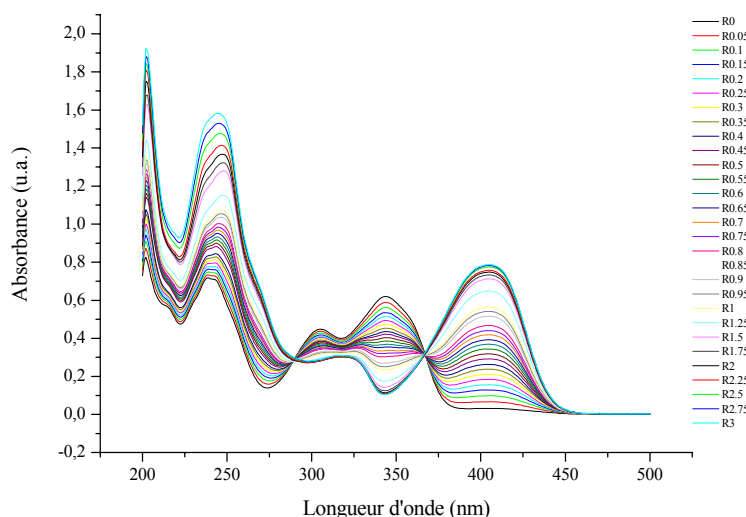


Figure 4 : Spectres d'absorption UV-visible de la 3HF 4.10-5 mol.L⁻¹ dans le méthanol pour différents rapports $R = [Pb(II)]/[3HF]$.

La méthode des rapports molaires appliquée à ce cas (Figure 5), confirme qu'il n'y a bien qu'un seul complexe et que sa stoechiométrie est 1:1.

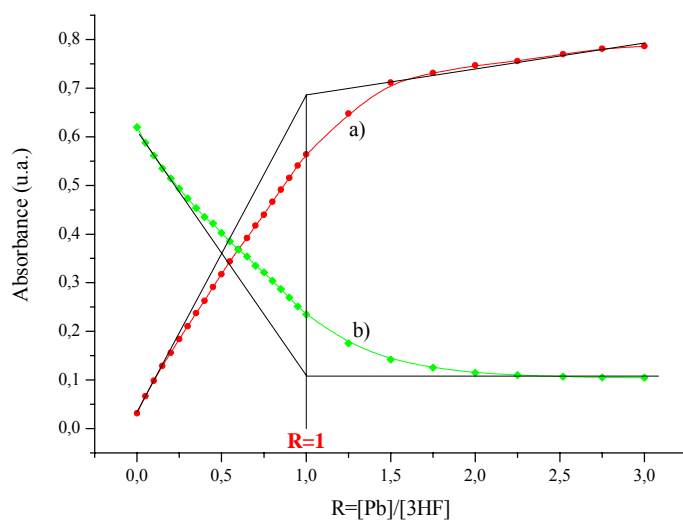


Figure 5 : Courbes de rapports molaires tracées aux maxima d'absorption de la forme complexée avec Pb(II) à 403nm (a) et de la 3HF libre à 343 nm (b).

Expérimentalement, les réactions de complexation étant immédiates, on travaillera avec une cellule à circulation : on réalise une solution de ligand ($6 \cdot 10^{-5}$ M et $4 \cdot 10^{-5}$ M pour les flavonoïdes en milieu mixte et dans le méthanol ; $6 \cdot 10^{-5}$ M pour les acides) à laquelle on ajoute à la burette de faibles quantités d'une solution d'ions métalliques (de rapport $R = \frac{[\text{métal}]}{[\text{ligand}]} = 0.01$ à 5 ou plus). Les spectres sont enregistrés directement à partir du mélange réactionnel pour des concentrations d'ions métalliques variables.

2) Méthode des variations continues

Cette méthode qui permet de déterminer aussi la composition de complexes a été développée par Job (2) 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 par Vosburg et Cooper (3).

Dans cette méthode des variations continues dite de Job, on étudie 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 :

$$\text{Équation 3} \quad x_L = \frac{[L]_t}{[L]_t + [M]_t} = \frac{[L]_t}{C_t}$$

La courbe $A=f(x_L)$ présente un maximum tel que $\frac{d[M_m L_t]}{dx_L} = 0$, l'abscisse de ce maximum permet de calculer aisément la stoechiométrie du complexe formé.

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. Un exemple de spectres enregistrés à partir de cette méthode est présenté sur la Figure 6.

La fonction de Job $[A(\lambda \text{ max})_{\text{solution complexée}} - A(\lambda \text{ max})_{3\text{HF}}]$ en fonction de la fraction molaire de ligand $x_{3\text{HF}}$ est représentée sur la Figure 7.

Le maximum de la fonction de Job correspond à une fraction molaire x_{3HF} égale à 0,5 : on en déduit ainsi la formation d'un complexe de stoechiométrie 1:1 soit une espèce $[Pb(3HF)]^+$.

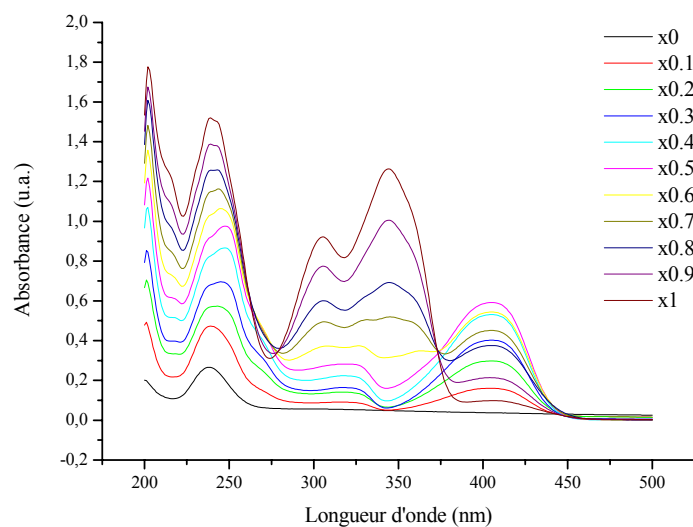


Figure 6 : Spectres UV-visible des différentes solutions de la gamme des variations continues de la complexation de la 3HF avec le plomb dans le méthanol (x = fraction molaire du ligand).

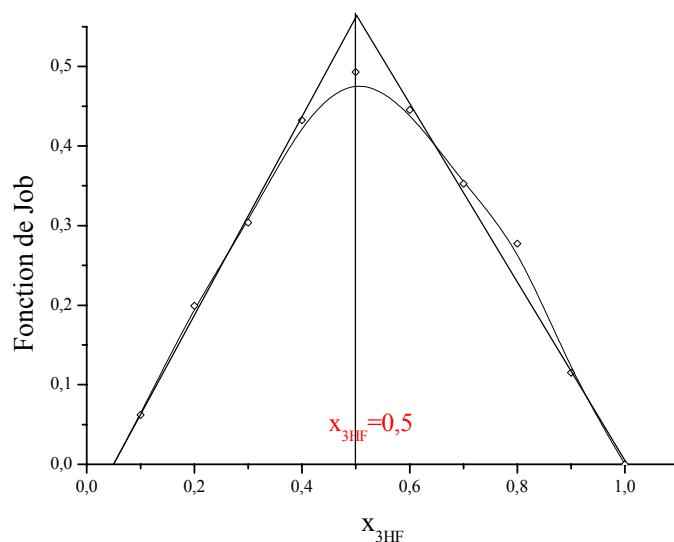


Figure 7 : Courbe de variation de la fonction de Job au maximum d'absorption du complexe formé entre la 3HF et Pb(II).

3) Détermination des constantes de formation des complexes

En complément de la méthode des rapports molaires et/ou de la méthode des variations continues qui sont employées pour déterminer la stœchiométrie des complexes formés, le logiciel de traitement de données Specfit/32 (4) a été utilisé.

Ce logiciel permet de calculer les constantes de stabilités 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 » (5-8). 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.

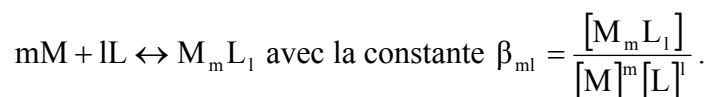
Le système de complexation suivant a été utilisé :



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

Équation 4
$$\beta_{mlh} = \frac{[M_m L_l H_h]}{[M]^m [L]^l [H]^h}$$

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 :



III. Spectroscopie de fluorescence

Historiquement les premiers phénomènes de fluorescence furent observés en 1565 par Monardes qui vit une émission bleue en préparant une décoction de copeaux de bois. Le terme fut introduit par Stokes au XIXème siècle, il s'aperçut qu'une solution de sulfate de quinine émettait une lumière bleuâtre lorsqu'elle était irradiée par des rayonnements UV. Il suppose alors que cette émission est causée par l'absorption des rayonnements ultraviolets. En 1853 il publie un article dans lequel il explique que beaucoup de composés à base de fluorure de calcium présente une émission bleuâtre d'où le terme de fluorescence. Cependant il s'agissait là de phénomènes dus à des impuretés.

1) Principe

Lorsqu'une molécule excitée par l'absorption d'un rayonnement électromagnétique revient à l'état fondamental en libérant son énergie sous forme de photon, on parle de fluorescence. La durée de vie de l'état excité (S_1) de l'espèce fluorescente est inférieure à 10^{-7} s (9). Par contre, dans le cas de la phosphorescence, l'émission de photons peut durer plusieurs heures.

Il existe plusieurs types de fluorescence :

- Fluorescence de résonance : la longueur d'onde de l'émission fluorescente est la même que la longueur d'onde de l'absorption ;
- Fluorescence de Stokes : la longueur d'onde de l'émission fluorescente est plus grande que la longueur d'onde de l'absorption.

Mais d'autres voies de désexcitation sont possibles hormis la fluorescence (Figure 8) comme :

- la conversion interne : c'est une transition non radiative entre deux états électroniques de même multiplicité de spin suivie d'une relaxation vibrationnelle. Cette relaxation amène la molécule jusqu'au plus bas niveau vibrationnel de l'état électronique concerné en transférant son énergie par collisions à son environnement (notamment au solvant) ;
- le croisement intersystème : c'est une transition non radiative entre deux états de multiplicités de spin différentes. Ce type de transition est théoriquement interdit mais le couplage spin-orbite le rend possible s'il est assez fort. Il est favorisé dans certains cas : si la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est du type $n \rightarrow \pi^*$ ou si des atomes lourds (notamment le plomb) sont mis en jeu.

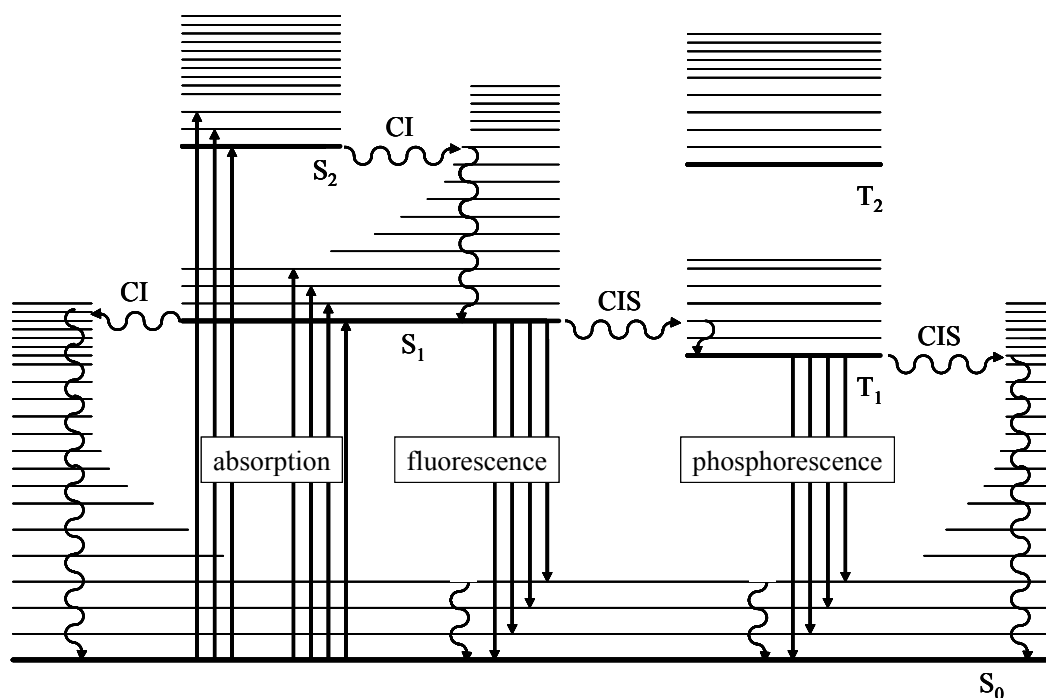


Figure 8 : Diagramme de Perrin-Jablonski. Les états électroniques singulets et triplets sont notés S_x et T_x (traits horizontaux en gras, les traits plus fins correspondent aux états vibrationnels). Mise en évidence les processus mis en jeu : absorption, fluorescence, phosphorescence, conversion interne CI, passage intersystème CIS, ou relaxation vibrationnelle (transfert radiatif représentés par des traits pleins et non-radiatifs par des ondulations).

Ces divers phénomènes sont en compétition avec la fluorescence et sont susceptibles de la modifier. Ils peuvent donc nous donner des renseignements sur l'environnement s'ils ont des temps comparables (Tableau 1).

absorption	10^{-15} s
croisement intersystème	10^{-10} - 10^{-8} s
conversion interne	10^{-11} - 10^{-9} s
relaxation vibrationnelle	10^{-12} - 10^{-10} s
durée de vie de S1	10^{-10} - 10^{-7} s > fluorescence
durée de vie de T1	10^{-6} -1s > phosphorescence

Tableau 1 : Temps caractéristiques des divers transitions radiatives et non radiatives.

En fluorimétrie stationnaire où une illumination continue est utilisée, la concentration en espèces excitées est constante et l'intensité de fluorescence est indépendante du temps (par opposition à la fluorimétrie résolue dans le temps).

Les espèces fluorescentes sont des molécules généralement aromatiques ou insaturées. Plus le nombre de cycle aromatiques (degré de condensation et de rigidité) augmente, plus le rendement quantique de fluorescence augmente (exemple du tryptophane).

La fluorescence est une technique par laquelle l'acide humique est couramment étudié. De nombreuses études (10-12) portent sur le sujet et relatent notamment que son spectre est caractéristique de sa nature et de son origine.

La fluorimétrie est une technique très sensible, qui dans certains cas peut-être 1000 fois plus sensible que la spectroscopie d'absorption (10^{-9} mol/L peuvent être étudiées en routine). Cette technique permet de détecter des molécules à l'état de traces (13).

2) Mesure

Dans un spectrofluorimètre conventionnel (Figure 9), la source lumineuse est une lampe xénon qui offre un spectre continu de 250nm à l'infrarouge. L'appareil possède deux monochromateurs : un situé entre la source et l'échantillon (monochromateur d'excitation) et un autre placé entre l'échantillon et le détecteur (monochromateur d'émission).

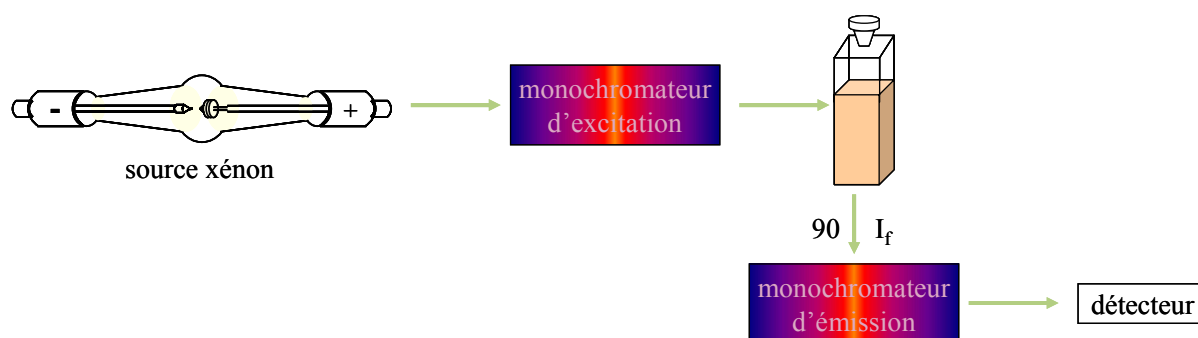


Figure 9 : Schéma de principe d'un spectrofluorimètre classique à mesures stationnaires.

La collection se fait à 90° par rapport aux rayons incidents permettant de recueillir uniquement la fluorescence émise au centre de la cuve et limite la collection du rayonnement d'excitation.

Plusieurs phénomènes peuvent perturber les mesures :

- Des effets de filtre interne d'excitation : 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. Dans le cas de l'acide humique, cet effet a lieu dès 30 mg.L^{-1} (Figure 10 et Figure 11).
- Des effets de réabsorption : si les photons émis par le phénomène de fluorescence se trouvent dans un domaine d'absorption de la molécule concernée, ils sont alors réabsorbés. Pour AH, nous observons ce phénomène de réabsorption dans les basses longueurs d'onde (Figure 12), ce qui n'est pas gênant pour des mesures qualitatives, mais qui nécessite une correction des spectres de fluorescence pour des mesures quantitatives.

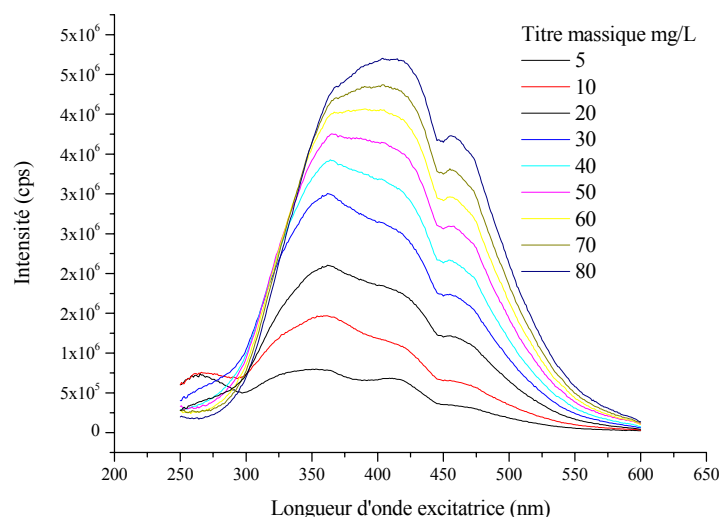


Figure 10 : Spectres synchrones de l'acide humique dans l'eau à pH = 6, en fonction du titre massique. On remarque que l'effet de filtre interne affecte plus les bandes situées vers les courtes longueurs d'onde (350 nm, 275 nm) et moins celles situées vers les grandes longueur d'onde (412nm, 460nm).

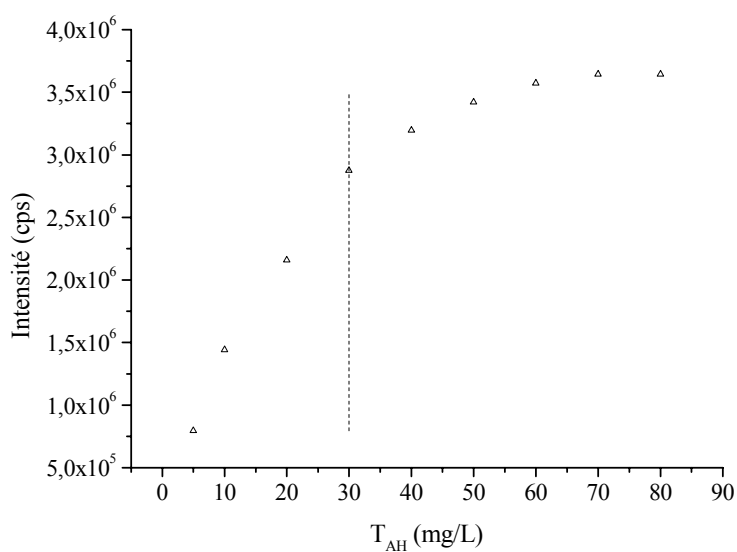


Figure 11 : Variation de l'intensité de fluorescence en fonction du titre en acide humique IHSS à $\lambda_{\text{émission}}=420\text{nm}$ et $\lambda_{\text{excitation}}=350\text{nm}$ (valeurs relevées sur le spectre synchrone- offset de 70nm).

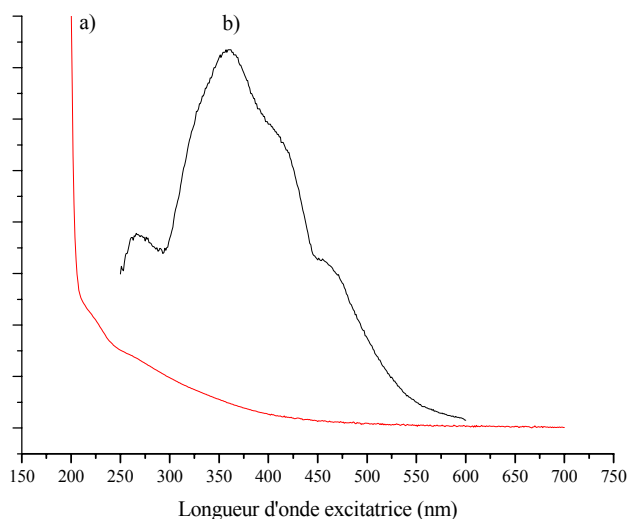


Figure 12 : Spectre UV-visible (a) et synchrone -offset de 70 nm- (b) de AH dans l'eau à pH=6, 10mg.L⁻¹.

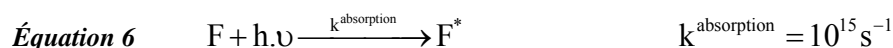
3) Caractéristiques des spectres de fluorescence

a. Intensité de fluorescence stationnaire

L'intensité de fluorescence I_f est le nombre de photons émis par unité de temps et de volume (Équation 5). Afin de donner l'expression de l'intensité de I_f , il faut exprimer $[F^*]$ et donc se rappeler des divers phénomènes précédents l'émission. Dans un premier temps, les fluorophores F vont absorber un nombre $\alpha \cdot N_0$ de photons selon l'Équation 6 (N_0 est le nombre de photons par unité de temps et de volume émis par une source en illumination continue).

$$\text{Équation 5} \quad I_f = k_{\text{radiatif}}^{\text{desexcitation}} \cdot [F^*]$$

où $[F^*]$ désigne la concentration de fluorophores excités.



Ce processus d'absorption est suivi de la désexcitation des fluorophores F selon 2 voies : radiative et non radiative (Équation 7).



Les vitesses d'apparition et de consommation de l'espèce F^* sont données selon les différents processus où il prend part (Équation 8).

Équation 8

$$\begin{array}{l}
 \left(\frac{d[F^*]}{dt} \right)_{\text{absorption}} = k^{\text{absorption}} \cdot \alpha \cdot N_0 \\
 \left(\frac{d[F^*]}{dt} \right)_{\text{radiatif}} = -k_{\text{radiatif}}^{\text{désexcitation}} \cdot [F^*] \\
 \left(\frac{d[F^*]}{dt} \right)_{\text{nonradiatif}} = -k_{\text{nonradiatif}}^{\text{désexcitation}} \cdot [F^*]
 \end{array}$$

L'expression de la vitesse de variation de $[F^*]$ s'exprime comme indiqué dans l'Équation 9.

Équation 9

$$\left(\frac{d[F^*]}{dt} \right) = k^{\text{absorption}} \cdot \alpha \cdot N_0 - \left(k_{\text{radiatif}}^{\text{désexcitation}} + k_{\text{nonradiatif}}^{\text{désexcitation}} \right) \cdot [F^*]$$

$k^{\text{absorption}} \cdot \alpha \cdot N_0$ représente le nombre de photons absorbés par unité de volume et de temps. On peut noter que $k^{\text{absorption}} \cdot N_0$ représente I_0 , l'intensité de la lumière incidente. Dans les cas de mesure stationnaire, on a $\left(\frac{d[F^*]}{dt} \right) = 0$.

On trouve ainsi que $[F^*]$ est directement proportionnel à I_0 selon l'Équation 10.

Équation 10

$$[F^*] = \frac{\alpha \cdot I_0}{\left(k_{\text{radiatif}}^{\text{désexcitation}} + k_{\text{nonradiatif}}^{\text{désexcitation}} \right)}$$

Si on remplace l'expression de $[F^*]$ que l'on vient de trouver dans l'Équation 5, on trouve que

I_f est directement proportionnel au rendement quantique $\Phi_f = \frac{k_{\text{radiatif}}^{\text{désexcitation}}}{k_{\text{nonradiatif}}^{\text{désexcitation}} + k_{\text{radiatif}}^{\text{désexcitation}}}$ (fraction de molécules excitées qui retournent à l'état S_0 avec émission de fluorescence) (Équation 11).

Équation 11
$$[F^*] = \alpha \cdot I_f \cdot \frac{k_{\text{radiatif}}^{\text{desexcitation}}}{(k_{\text{radiatif}}^{\text{desexcitation}} + k_{\text{nonradiatif}}^{\text{desexcitation}})} = \alpha \cdot I_f \cdot \Phi_f$$

b. Les différents types de spectres de fluorescence

Il existe quatre principaux types d'expérience en fluorimétrie. Grâce à la présence des deux monochromateurs, on peut réaliser des spectres d'émission, d'excitation, synchrone ou des matrices émission-excitation.

- spectre d'émission : on excite à une longueur d'onde d'excitation précise et on balaie en longueur d'onde d'émission (spectre vert Figure 13) ;
- spectres d'excitation : on regarde la réponse/fluorescence à une longueur d'onde d'émission précise et on balaie en longueur d'onde d'excitation (spectre bleu Figure 13) ;
- spectre synchrone : on balaie en longueur d'onde d'excitation et d'émission en gardant constante la différence entre la longueur d'onde excitatrice et la longueur d'onde d'émission (spectre rouge Figure 13) ;
- matrice Emission-Excitation : c'est la représentation en 3 dimensions de la fluorescence d'un composé. Dans ce type d'expérience, on enregistre un grand nombre de spectres d'émission excités à différentes longueurs d'onde (Figure 13). On repère ainsi les zones de forte intensité de fluorescence, c'est-à-dire celles où il est le plus intéressant de se positionner pour l'observation.

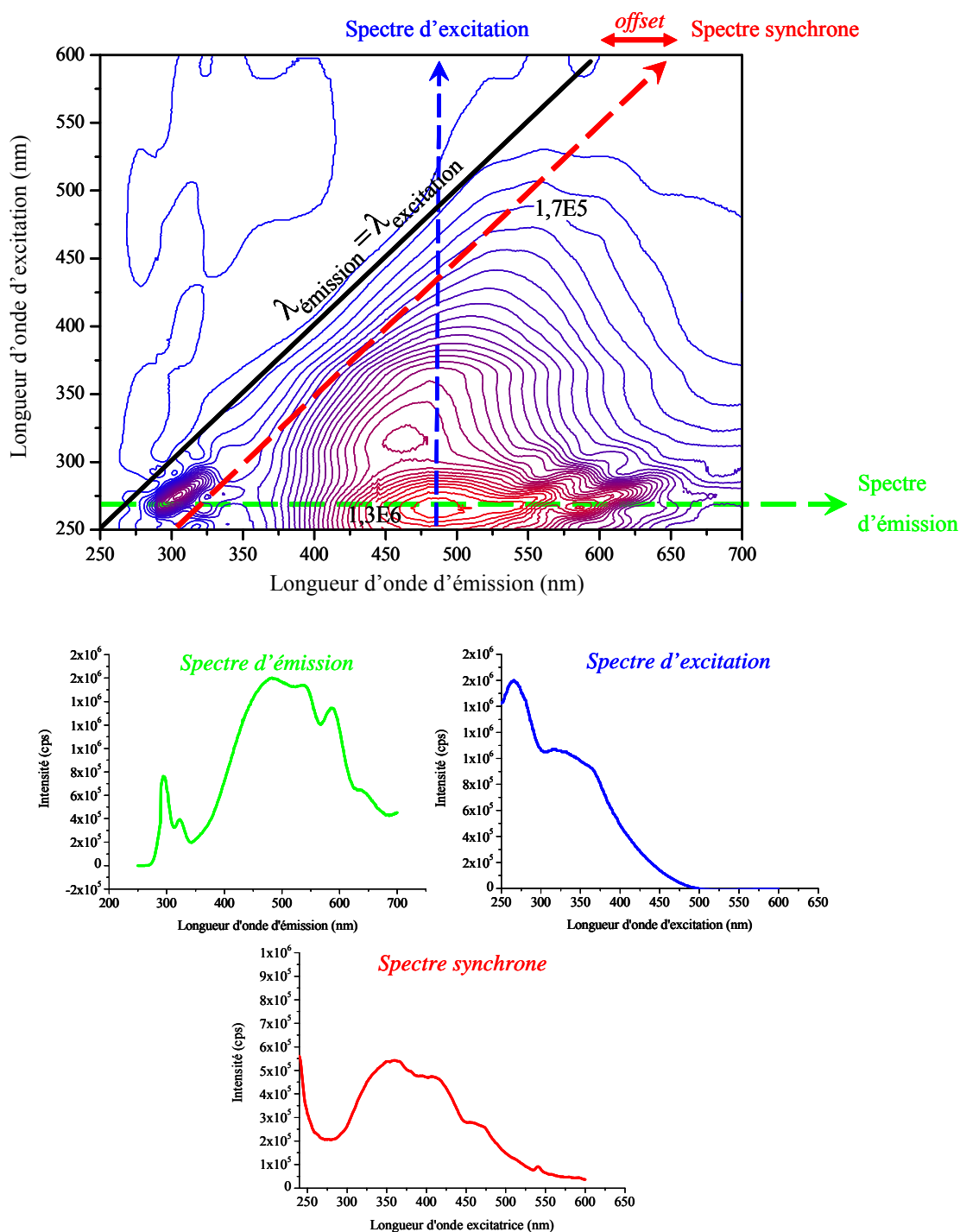


Figure 13 : Matrice Emission-Excitation de l'acide humique dans l'eau à pH=6 ($\lambda_{\text{excitation}}=250-600\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}}=250-700\text{nm}$) représentée en lignes de niveau (le bleu étant pour les contours de plus faible intensité de fluorescence et le rouge pour ceux d'intensité la plus élevée).

4) Appareillage

Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Fluoromax 3 (Jobin Yvon) à une vitesse de 150 nm/min pour tous les composés étudiés avec une résolution spectrale de 1 nm. Comme dans le cas de la spectroscopie d'absorption, les dosages ont été effectués avec un dispositif à circulation, utilisant une pompe péristaltique.

IV. Spectroscopie Raman et MicroRaman

1) Principe

La diffusion Raman est le résultat de l'interaction lumière-matière mettant en jeu les états vibrationnels des molécules.

Un système qui est soumis à un rayonnement exciteur de fréquence ν_{ex} diffuse dans toutes les directions de l'espace. Il existe trois types de diffusion (Figure 14) qui se différencient par la fréquence du photon diffusé :

○ $E_{\text{adsorbée}} = E_{\text{émis}} : \nu_{\text{diffusé}} = \nu_{\text{ex}} : \text{diffusion élastique Rayleigh}$

○ $E_{\text{adsorbée}} \neq E_{\text{émis}} : \nu_{\text{diffusé}} \neq \nu_{\text{ex}} : \text{diffusion inélastique}$

$\nu_{\text{diffusé}} = \nu_{\text{ex}} - \nu_{ij} : \text{Raman Stokes}$

$\nu_{\text{diffusé}} = \nu_{\text{ex}} + \nu_{ij} : \text{Raman anti-Stokes.}$

où ν_{ij} est la fréquence correspondante à la différence d'énergie entre les niveaux vibrationnels i et j .

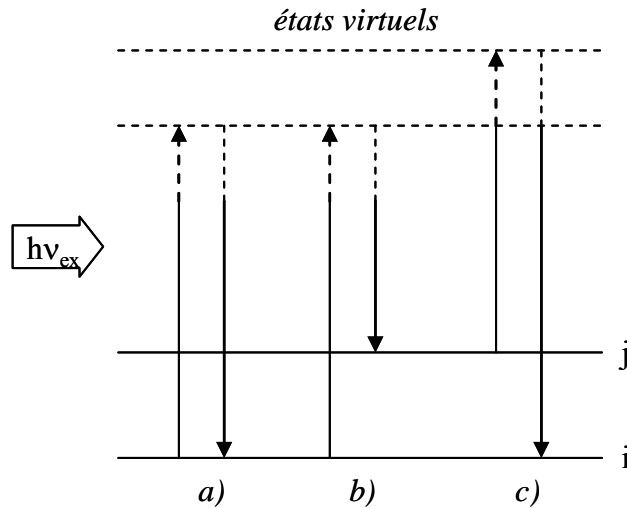


Figure 14 : Etats énergétiques d'un système soumis à l'effet Raman. Cas de la diffusion a) Rayleigh b) Raman Stokes c) Raman anti-Stokes.

L'intensité d'une raie de diffusion est proportionnelle à la population du niveau de départ et de la longueur d'onde excitatrice. L'intensité d'une raie Raman s'exprime de la façon suivante :

$$\text{Équation 12} \quad I_{ij} = \frac{2^7 * \pi^5}{3^2 * c^4} * I_{ex} * (\nu_{ex} \pm \nu_{ij})^4 * |P_{ij}|^2 \text{ avec } P_{ij} \text{ le moment de transition :}$$

$$\text{Équation 13} \quad P_{ij} = \int \psi_i \cdot \bar{P} \cdot \psi_j^* \cdot dv$$

où ψ_i et ψ_j sont les fonctions d'onde vibrationnelles des niveaux i et j et P est le moment dipolaire induit ($P = \alpha \cdot E$, α la polarisabilité).

La diffusion est liée à la polarisabilité moléculaire α , celle-ci traduit la faculté du nuage électronique de la molécule à acquérir un moment dipolaire électrique induit \bar{P} sous l'effet du champ électrique \bar{E} .

$$\text{Équation 14} \quad \bar{P} = \bar{\alpha} \cdot \bar{E}$$

On définit le tenseur de polarisabilité :

$$\text{Équation 15} \quad \begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix}$$

Pour chaque composante, nous avons au premier ordre : $\alpha_{ij} = (\alpha_{ij})_0 + \left(\frac{\partial\alpha_{ij}}{\partial Q}\right)_0 \cdot Q$. Si le champ \vec{E} oscille à la fréquence ν_{ex} ($E = E_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_{ex} \cdot t)$) et si la molécule est en mouvement de vibration avec une coordonnée normale Q ($Q = Q_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu \cdot t)$); l'Équation 14 nous donne alors :

$$P = \left((\alpha_{ij})_0 + \left(\frac{\partial\alpha_{ij}}{\partial Q}\right)_0 \cdot (Q_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu \cdot t)) \right) * (E_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_{ex} \cdot t))$$

$$P = (\alpha_{ij})_0 \cdot E_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_{ex} \cdot t) + \left(\frac{\partial\alpha_{ij}}{\partial Q}\right)_0 \cdot E_0 \cdot Q_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_{ex} \cdot t) \cdot \cos(2\pi \cdot \nu \cdot t)$$

Équation 16

$$P = (\alpha_{ij})_0 \cdot E_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_{ex} \cdot t) + \left(\frac{\partial\alpha_{ij}}{\partial Q}\right)_0 \cdot E_0 \cdot Q_0 \cdot \frac{1}{2} [\cos(2\pi \cdot (\nu_{ex} + \nu) \cdot t) + \cos(2\pi \cdot (\nu_{ex} - \nu) \cdot t)]$$

\downarrow
composante Rayleigh

\downarrow
composante anti-Stokes

\downarrow
composante Stokes

L'apparition d'une raie Raman est liée à 2 conditions :

- au changement de la polarisabilité $\left(\frac{\partial\alpha_{ij}}{\partial Q}\right)_0 \neq 0$
- le produit $\vec{P} \cdot \psi_j^*$ est paire (cf : Équation 13), c'est-à-dire si ψ et Q ont même espèce de symétrie : l'activité peut donc être prévue grâce à la symétrie des modes normaux.

Un spectre Raman présente des raies repérées grâce au déplacement Raman exprimé en nombre d'onde ($\bar{\nu}$ en cm^{-1}). Ce déplacement représente la différence d'énergie entre deux niveaux vibrationnels et est donc caractéristique du type de vibrateurs (élongation/déformation, symétrique/antisymétrique, C=O/O-H/...).

2) Appareillage

Les expériences ont été réalisées sur plusieurs types d'appareil Raman. Classiquement, ils sont dotés des mêmes éléments ; c'est-à-dire : une source laser (monochromatique, cohérente et peu divergent), un spectromètre, et un détecteur.

La fluorescence, accompagne parfois la diffusion Raman, gênant voire empêchant son observation. Alors que le spectre Raman se déplace avec l'excitatrice, le spectre de fluorescence, très large, est centré sur une fréquence donnée. Le choix judicieux de l'excitatrice peut donc améliorer la détection Raman en évitant de peupler les niveaux électroniques excités.

C'est pour cela que nous avons travaillé sur deux appareils avec des longueurs d'onde excitatrices à 785 nm et 1063 nm afin de ne pas exciter là où se trouve une bande d'absorption (pour nos composés modèles à $\lambda < 500$ nm).

Nous avons donc utilisés deux appareils :

a. Spectromètre FT Raman RFS 100/S (BRUKER)

L'appareil (Figure 15) permet à la fois d'étudier des échantillons: solide, liquide ou gazeux grâce aux différents types d'accessoires porte-échantillons.

Ce spectromètre possède une grande sensibilité et une grande stabilité. La source laser Nd:YAG (diode) est entièrement contrôlée par logiciel. La configuration standard fournit une gamme spectrale de 3600 à 70 cm^{-1} (partie Stokes) et -100 à -2000 cm^{-1} (partie anti-Stokes). Le système peut être équipé soit d'un détecteur InGaAs ou d'une diode Ge de grande sensibilité.

L'excitation à 1064 nm permet de s'affranchir de tous problèmes éventuels de fluorescence qui masque souvent le spectre Raman de composés organiques.

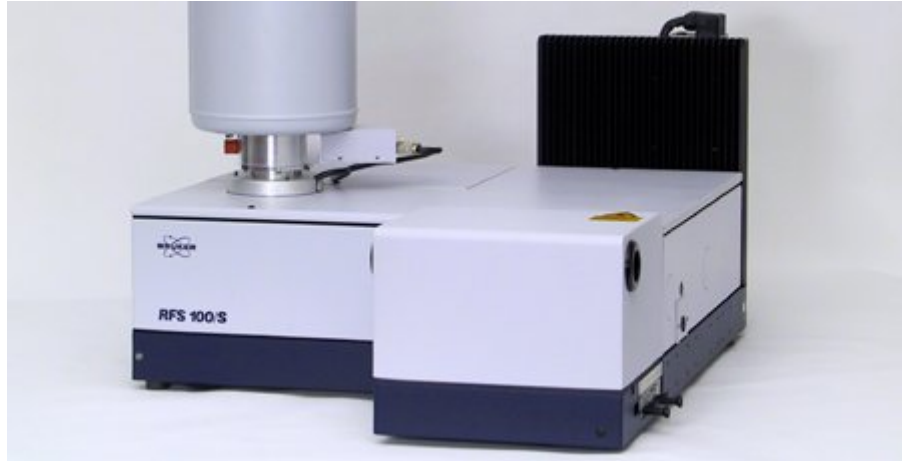


Figure 15 : Spectromètre FT Raman RFS 100/S de Bruker.

b. Microspectromètre HoloLab Series 5000 (Kaiser Optical Systems)

Ce microspectromètre est composé d'une diode laser qui émet à 785 nm avec une puissance nominale de 400 mW. Le filtrage optique de la raie Rayleigh est assuré par des filtres Notch. Le détecteur CCD de type "deep depletion" éclairé par l'arrière est optimisé pour le proche infra rouge. L'ensemble laser-microscope-spectromètre est relié par fibres optiques. Une platine motorisée XYZ de résolution 0.1 μm pilotée par le logiciel HoloMap sous Matlab v6.5 permet l'enregistrement de cartographies point par point.



Figure 16 : Microspectromètre HoloLab Series 5000 de Kaiser.

Une condition opératoire d'un grand intérêt est la possibilité d'éclairer l'échantillon à travers un microscope optique classique, ce qui permet de réduire la zone éclairée aux limites imposées par la diffraction. Ainsi, avec les longueurs d'onde du domaine du proche infra-rouge et un grossissement de $\times 100$, classiquement utilisé, la tache de focalisation de la lumière a un diamètre de l'ordre de $1\mu\text{m}$. Il devient possible d'étudier soit des zones soigneusement repérées dans des objets de taille classique, hétérogénéités ou couches stratigraphiques, soit des échantillons de taille microscopique. Il suffit que ceux-ci soient de l'ordre de la dizaine de μm .

Cependant, ce mode opératoire demande des puissances laser faibles, comprises entre 2 mW et 50 μW au niveau de l'échantillon. Le temps d'obtention d'un spectre est très variable, de quelques secondes pour les molécules ayant une section efficace de diffusion importante, jusqu'à plusieurs dizaines de minutes.

V. Calculs théoriques

Les calculs théoriques ont été utilisés pour déterminer les conformations les plus stables des molécules étudiées et à partir de ces structures calculer les spectres électroniques et/ou vibrationnels. La confrontation de ces spectres théoriques avec les spectres expérimentaux permet la détermination du site de complexation impliqué dans la fixation de l'ion métallique, lorsque plusieurs sites potentiels sont en compétition au sein du même ligand.

Dans le cadre de nos études, nous avons choisi d'utiliser les méthodes de DFT (density functional theory) et TD-DFT (DFT dépendant du temps) qui sont actuellement les seules adaptées à l'étude de systèmes chimiques de grande taille en prenant en compte les effets de la corrélation électronique de manière satisfaisante.

1) Fondements de la théorie

La théorie de la fonctionnelle de la densité est une approche de la structure électronique des atomes et des molécules très utilisée depuis les années 90. Dans la théorie Hartree Fock (HF), la fonction d'onde polyélectronique est exprimée comme un déterminant de Slater construit à partir d'un ensemble de n fonctions d'onde monoélectroniques (où n représente le nombre d'électrons du système). La DFT considère également des fonctions monoélectroniques. Toutefois, alors que la théorie HF calcule la fonction d'onde totale polyélectronique, la DFT tente de calculer l'énergie électronique totale et la distribution de densité électronique globale.

L'idée de la DFT est qu'il existe une relation entre l'énergie électronique totale et la densité électronique globale. Un modèle approché, développé dans les années 1920 (modèle de Thomas-Fermi) contenait quelques éléments de base. Toutefois, les fondements de la théorie viennent d'un article de Hohenberg et Kohn en 1964 qui ont montré que l'énergie de l'état fondamental, ainsi que d'autres propriétés d'un système, sont uniquement définies par la densité électronique. Le but des méthodes DFT est de déterminer les fonctionnelles qui connectent la densité électronique $\rho(\mathbf{r})$ avec l'énergie.

La fonctionnelle énergie doit être divisée en trois parties:

- l'énergie cinétique: $T[\rho]$
- l'attraction noyau-électron $E_{Ne}[\rho]$
- la répulsion électron-électron $E_{ee}[\rho]$.

Dans le cadre de l'approximation de Born-Oppenheimer, la répulsion noyau-noyau qui est constante n'est pas prise en compte. L'énergie exacte d'un système est donc :

Équation 17 $E_{\text{exact}} = T[\rho] + E_{Ne}[\rho] + E_{ee}[\rho]$

Le terme $E_{ee}[\rho]$ est divisé en une partie de Coulomb $J[\rho]$ et une partie d'échange $K[\rho]$, qui incluent implicitement l'énergie de corrélation dans tous les termes. Les fonctionnelles $E_{Ne}[\rho]$ et $J[\rho]$ sont données par leurs expressions classiques :

$$\text{Équation 18} \quad E_{\text{Ne}}[\rho] = \sum_{A=1}^N \int \frac{Z_A \rho(\mathbf{r})}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{r}|} d\mathbf{r} \quad J[\rho] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r} d\mathbf{r}'$$

Le principe des méthodes DFT actuellement utilisées en chimie computationnelle est dû à Kohn et Sham qui ont introduit les orbitales moléculaires dans les calculs DFT.

Si on se place dans l'hypothèse d'un gaz uniforme d'électrons sans interaction, l'opérateur hamiltonien du système ne contient que deux termes qui correspondent à l'énergie cinétique des électrons et à leur interaction avec les différents noyaux. L'équation de Schrödinger peut alors être résolue exactement et la fonction d'onde associée est donnée par un déterminant de Slater construit sur des orbitales ψ_i monoélectroniques et orthonormées. L'énergie cinétique exacte peut être calculée, et elle est donnée par la relation :

$$\text{Équation 19} \quad T_S = \sum_{i=1}^n \left\langle \psi_i \left| -\frac{1}{2} \Delta_i \right| \psi_i \right\rangle$$

L'indice S souligne le fait que l'énergie est calculée d'après un déterminant de Slater.

Kohn et Sham ont également défini la densité électronique $\rho(\mathbf{r})$ d'un système comme la somme des modules au carré de l'ensemble des orbitales monoélectroniques orthonormées :

$$\text{Équation 20} \quad \rho(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^n |\psi_i(\mathbf{r})|^2$$

La clef de la théorie de Kohn-Sham est donc le calcul de l'énergie cinétique dans l'hypothèse d'électrons sans interaction d'après l'Équation 19 (dans le même sens que les orbitales HF en mécanique ondulatoire décrivent des électrons sans interaction). En réalité, les électrons interagissent, et l'Équation 19 ne donne pas l'énergie cinétique totale. La différence entre l'énergie cinétique exacte et celle calculée en supposant des orbitales sans interaction est petite. L'énergie cinétique restante est absorbée dans un terme d'échange-corrélation, et en général, l'expression de l'énergie DFT peut être écrite sous la forme:

$$\text{Équation 21} \quad E_{\text{DFT}}[\rho] = T_S + E_{\text{Ne}}[\rho] + J[\rho] + E_{\text{xc}}[\rho]$$

En égalisant E_{DFT} à l'énergie exacte précédemment déterminée, on obtient une expression qui peut être prise comme une définition de E_{xc} :

Équation 22 $E_{xc}[\rho] = (T[\rho] - T_S) + (E_{ec}[\rho] - J[\rho])$

La première parenthèse dans cette équation peut être considérée comme l'énergie cinétique de corrélation, tandis que la seconde contient à la fois l'énergie potentielle d'échange et de corrélation. L'énergie d'échange est de loin la plus grande contribution à E_{xc} .

Le challenge de la DFT est de trouver des formules correctes pour le terme d'échange-corrélation. Dans le cas où une telle fonctionnelle est disponible, le problème est donc similaire à celui rencontré avec la théorie HF: déterminer un ensemble orthonormal d'orbitales qui minimisent l'énergie. L'utilisation de la méthode variationnelle aboutit à un ensemble de pseudo équations aux valeurs propres qui mettent en jeu un opérateur effectif monoélectronique (\hat{h}_{KS}) :

Équation 23 $\hat{h}_{KS} \cdot \psi_i = E_i \cdot \psi_i$

Ces équations sont connues comme les équations de Kohn-Sham (KS), où E_i est l'énergie de l'orbitale moléculaire ψ_i .

L'opérateur \hat{h}_{KS} contient les quatre contributions à l'énergie : l'énergie cinétique et les énergies potentielles : interaction avec les noyaux, terme de Coulomb et terme d'échange-corrélation :

Équation 24 $\hat{h}_{KS} = -\frac{1}{2} \Delta - \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{|R_A - r|} + \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} dr' + V_{xc}[\rho]$

Où V_{xc} est la fonctionnelle d'échange-corrélation, reliée à l'énergie d'échange-corrélation par :

Équation 25 $V_{xc}[\rho] = \frac{dE_{xc}[\rho(r)]}{d\rho(r)}$

L'énergie électronique totale est calculée à partir de l'Équation 21.

Les orbitales KS inconnues sont généralement développées sur des bases de fonctions de façon analogue à ce qui est fait dans la méthode HF.

2) La fonctionnelle d'échange-corrélation

La fonctionnelle d'échange-corrélation est clairement la clef de l'approche de la fonctionnelle de la densité. La façon la plus facile d'obtenir cette contribution utilise **l'approximation de densité locale** (LDA, aussi appelée LSDA dans l'approximation de densité locale de spin), qui est basée sur le modèle du gaz uniforme d'électrons dans lequel la densité électronique est constante dans tout l'espace. L'énergie totale d'échange-corrélation peut donc être obtenue en intégrant sur tout l'espace :

$$\text{Équation 26} \quad E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] = \int \rho(\mathbf{r}) \cdot \varepsilon_{xc}[\rho(\mathbf{r})] \cdot d\mathbf{r}$$

où $\varepsilon_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$ est l'énergie d'échange-corrélation par électron, et est fonction de la densité du gaz uniforme d'électrons. La fonctionnelle d'échange-corrélation est obtenue par différenciation de cette expression :

$$\text{Équation 27} \quad V_{xc}[\rho] = \rho(\mathbf{r}) \frac{d\varepsilon_{xc}[\rho(\mathbf{r})]}{d\rho(\mathbf{r})} + \varepsilon_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$$

Dans l'approximation de densité locale, on suppose qu'en chaque point \mathbf{r} de la distribution électronique non-homogène (c'est-à-dire dans le système qui nous intéresse) où la densité est $\rho(\mathbf{r})$, $V_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$ et $\varepsilon_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$ ont les mêmes valeurs que dans un gaz homogène d'électrons. Autrement dit, la densité électronique réelle dans un élément de volume entourant la position \mathbf{r} est remplacée par une densité électronique constante avec la même valeur qu'en \mathbf{r} . Toutefois, cette densité électronique 'constante' est différente en chaque point de l'espace.

Plusieurs fonctionnelles ont été proposées pour le terme d'échange (la plus utilisée l'a été par Slater) et celui de corrélation (par Perdew et Zunger ; Vosko, Wilk et Nusair :VWN; ...) et pour choisir une méthode DFT, il faut combiner deux de ces fonctionnelles.

3) Les fonctionnelles avec correction de gradient

En dépit de sa simplicité, l'approximation LDA donne des résultats satisfaisants. Toutefois, il a été montré qu'elle est totalement inadéquate dans certains cas et il s'est donc avéré nécessaire de développer d'autres approches.

La méthode la plus courante est d'utiliser des fonctionnelles 'non-locales', avec correction de gradient, qui ne dépendent pas seulement de la valeur de la densité mais aussi de son gradient en chaque point de l'espace. En effet, dans un système moléculaire, la densité électronique est loin d'être uniforme dans l'espace et le gradient introduit cette variabilité spatiale. Ces corrections de gradient sont typiquement divisées en des contributions d'échange et de corrélation séparées. Une grande variété de corrections de gradient a été proposée dans la littérature.

Parmi les fonctionnelles corrigées (GGA: Generalized Gradient Approximation), les plus connues et utilisées sont celles proposées par Becke (B88) pour l'échange et par Lee, Yang et Parr (LYP) pour la corrélation.

4) Méthodes hybrides HF / DFT

Il est important de reconnaître que la théorie HF traite de façon exacte la contribution d'échange. Une option pour améliorer les méthodes DFT est donc d'ajouter à l'énergie de corrélation calculée en DFT (dans l'approximation de densité locale) une fraction de l'énergie d'échange HF. Dans une telle approche, l'énergie d'échange-corrélation est écrite comme la somme d'un terme exact d'énergie d'échange avec une composante de corrélation dans l'approximation LDA. Cette énergie d'échange exacte est obtenue à partir du déterminant de Slater construit sur les orbitales Kohn-Sham.

L'énergie d'échange-corrélation peut s'écrire sous la forme d'une combinaison linéaire:

$$\text{Équation 28 : } E_{xc} = E_{xc}^{LDA} + a_0(E_x^{\text{exact}} - E_x^{LDA}) + a_x \cdot \Delta E_x^{GC} + a_c \cdot \Delta E_c^{GC}$$

où E_x^{exact} est l'énergie d'échange exacte obtenue à partir du déterminant de Slater des orbitales Kohn-Sham, E_x^{LDA} est l'énergie d'échange dans l'approximation de densité locale proposée par Slater, ΔE_x^{GC} est la correction de gradient pour l'échange et ΔE_c^{GC} est la correction de gradient pour la corrélation. a_0 , a_x et a_c sont des coefficients empiriques fixes obtenus par paramétrage de données expérimentales.

Le choix des différentes fonctionnelles d'échange et de corrélation ainsi que des corrections de gradient aboutit à différentes expressions pour E_{xc} . Une fonctionnelle hybride très utilisée est appelée B3LYP et est constituée de la façon suivante :

$$\text{Équation 29 : } E_{xc}^{B3LYP} = (1-a_o).E_x^{LDA} + a_o.E_x^{HF} + a_x.E_x^{B88} + a_c.E_c^{LYP} + (1-a_c).E_c^{VWN}$$

Elle fait intervenir la correction de gradient de l'énergie d'échange de Becke (B88), la fonctionnelle de corrélation de Lee-Yang-Parr (avec un terme de gradient) et la fonctionnelle standard de corrélation locale de Vosko, Wilk et Nusair.

5) Applications

Les calculs effectués dans le cadre de cette thèse concernent les molécules modèles (3HF, 5HF, 3'4'diHF, Q, AC et AG). Après avoir optimisé les structures en DFT, on calcule les spectres de vibration et électroniques par méthode TD-DFT des molécules seules afin de valider le modèle utilisé. On peut alors regarder le comportement théorique de la molécule complexée avec un des trois cations métalliques que nous avons choisi d'étudier (Al(III), Pb(II) et Zn(II)).

La théorie de la fonctionnelle de densité dépendante du temps ou TD-DFT (14, 15) est une forme de DFT utilisée pour calculer les états électroniques excités et les énergies d'excitation électronique de molécules. Elle peut être vue comme une reformulation de mécanismes quantiques dépendant du temps où la variable fondamentale n'est plus la fonction d'onde mais la densité.

Les calculs ont été réalisés grâce au programme Gaussian (G03) (16). Les optimisations de géométrie ont été exécutées en prenant la base 6-31G(d,p) incluant les fonctions de polarisation afin de prendre en compte les liaisons hydrogène intramoléculaires du ligand et un pseudo-potentiel pour les métaux Pb et Zn (double- ξ LANL2DZ ou Stuttgart/Dresden (MWB78))(17, 18). La fonctionnelle d'échange-corrélation B3LYP a été choisie pour tous les calculs.

Les états excités ont été traités avec l'approximation adiabatique de la DFT-RPA. Pour reproduire un spectre UV-vis, les transitions électroniques ont été calculées pour des mono-

excitations sur les 40 premières transitions. Des effets de solvant ont été introduits par la méthode SCRF (Self Consistent Reaction Field) via le modèle PCM (Polarized Continuum Model) (19, 20).

Dans les résultats, seules les transitions présentant des valeurs de force d'oscillateur $f > 0,1$ ont été considérées. Les orbitales moléculaires impliquées dans les principales transitions électroniques calculées ont été représentées en utilisant le programme GaussView 3.00.

VI. Bibliographie

1. Yoe, J. H. & Jones, A. L. (1944) *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition* **16**, 111-115.
2. Job, P. (1928) *Annali di Chimica Applicata* **9**, 113-203.
3. Vosburgh, W. C. & Cooper, G. R. (1941) *Journal of the American Chemical Society* **63**, 437-442.
4. Specfit Global Analysis System, S. S. A., Marlborough, MA, USA.
5. Gampp, H., Maeder, M., Meyer, C. J., & Zuberbühler, A. (1985) *Talanta* **32**, 1133.
6. Gampp, H., Maeder, M., Meyer, C. J., & Zuberbühler, A. (1986) *Talanta* **33**, 943.
7. Gampp, H., Maeder, M., & Zuberbühler, A. D. (1988) *Trends Anal. Chem.* **7**, 111-113.
8. Maeder, M. & Zuberbühler, A. D. (1990) *Anal. Chem.* **62**, 2220.
9. Valeur, B. (2004) *Invitation à la fluorescence moléculaire*.
10. Yue, L., Wu, F., Liu, C., Li, W., Fu, P., Bai, Y., Wang, L., Yin, Z., & Lu, Z. (2006) *Chinese Science Bulletin* **51**, 89-96.
11. Sokolova, I. V. & Tchaikovskaya, O. N. (2006) *Atmospheric and Oceanic Optics* **19**, 220-222.
12. Sierra, M. M. D., Giovanela, M., Parlanti, E., & Soriano-Sierra, E. J. (2006) *Journal of the Brazilian Chemical Society* **17**, 113-124.
13. Susetyo, W., Carreira, L. A., Azarraga, L. V., & Grimm, D. M. (1991) *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **339**, 624-635.
14. Runge, E. & Gross, E. K. U. (1984) *Phys. Rev. Let.* **52**, 997.
15. Casida, M. E., Jamorski, C., Casida, K. C., & Salahub, D. R. (1998) *J. Chem. Phys.* **108**, 4439.
16. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery, J., J. A., Vreven, T., Kudin, K. N., Burant, J. C., *et al.* (2003) (Gaussian Inc., Pittsburgh PA).
17. Hay, P. J. & Wadt, W. R. (1985) *J. Chem. Phys.* **82**, 270.

18. Dolg, M., Wedig, U., Stoll, H., & Preuss, H. (1987) *J. Chem. Phys.* **86**, 866.
19. Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., & Barone, V. (2002) *J. Chem. Phys.* **117**, 43.
20. Tomasi, J., Cammi, R., Mennucci, B., Cappelli, C., & Corni, S. (2002) *P.C.C.P.* **4**, 5697.

Partie B

***Complexation de Al(III), Pb(II) et
Zn(II) par des molécules modèles de la
famille des polyphénols***

Chapitre III

Complexation des flavonoïdes mono- sites

Chapitre III

Complexation des flavonoïdes mono-sites

I. Introduction.....	69
II. Structure et propriétés des flavonoïdes.....	70
1) Les polyphénols.....	70
2) La famille des flavonoïdes.....	72
a. <u>Origine.....</u>	<u>72</u>
b. <u>Propriétés biochimiques et pharmacologiques.....</u>	<u>73</u>
i) <i>Propriétés biochimiques</i>	73
ii) <i>Propriétés pharmacologiques</i>	76
3) Propriétés complexantes des flavonoïdes	77
4) Propriétés spectroscopiques	77
a. <u>Spectroscopie UV-visible.....</u>	<u>77</u>
b. <u>Spectroscopies de vibration.....</u>	<u>79</u>
c. <u>Autres techniques</u>	<u>80</u>
III. Complexation de l'aluminium (III)	81
1) La 3-hydroxyflavone	81
2) La 5-hydroxyflavone	85
3) La 3',4'-dihydroxyflavone	86
4) Comparaison avec la complexation des hydroxyflavones dans le méthanol....	89

IV. Complexation du plomb (II)	90
1) La 3-hydroxyflavone	90
2) La 5-hydroxyflavone	93
3) La 3',4'-dihydroxyflavone	96
V. Complexation du zinc (II)	100
1) La 3-hydroxyflavone	100
2) La 5-hydroxyflavone	102
3) La 3',4'-dihydroxyflavone	104
VI. Conclusion	107
VII. Bibliographie	111

I. Introduction

Nous avons vu précédemment que l'étude des interactions entre les substances humiques et les métaux était très complexe du fait de la poly-fonctionnalité de ce système chimique. Une meilleure compréhension des mécanismes de complexation peut être obtenue en étudiant des molécules modèles de faible taille, molécules précurseurs/fragments de la MOS qui présentent des groupes fonctionnels identiques à ceux observés dans les substances humiques.

Pour rappel, les modèles que nous avons choisi d'étudier se divisent en deux catégories : les molécules « mono-sites » et les « multi-sites » : dans ce chapitre, nous exposerons les résultats concernant les molécules mono-sites : la 3-hydroxyflavone (3HF), la 5-hydroxyflavone (5HF) et la 3',4'-dihydroxyflavone (3'4'diHF). Leur étude a permis de :

- Déterminer la signature spectrale des complexes de ces composés avec Al(III), Pb(II) et Zn(II), en suivant le processus de complexation au moyen de la spectroscopie d'absorption électronique.
- Obtenir les stoechiométries et les constantes de formation des différents complexes formés.
- Classer les sites de complexation (α -hydroxy-carbonyle de la 3-hydroxyflavone, β -hydroxy-carbonyle de la 5-hydroxyflavone et catéchol de la 3',4'-dihydroxyflavone) selon leur capacité à fixer l'ion métallique,
- Déterminer l'influence du milieu, notamment la présence d'eau (solvant mixte méthanol/eau).

L'ensemble de ces résultats permettra par la suite (Chapitre IV) d'analyser les effets de mise en compétition des trois sites au sein d'une même structure : la quercétine.

II. Structure et propriétés des flavonoïdes

1) Les polyphénols

Les polyphénols et notamment la famille des flavonoïdes représentent une partie considérable de la matière organique des sols (1, 2). Les polyphénols constituent 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. Parmi les polyphénols les plus abondants, nous avons 6 classes de molécules (Figure 1) (1) :

- les acides benzoïques, cinnamiques ou coumarines,
 - les flavones, flavonols, et dérivés,
 - les chalcones, dihydrochalcones,
 - les aurones,
 - les anthocyanes,
 - les phénols polymérisés : c'est-à-dire les tanins (tanins condensés, tanins hydrolysables, esters de l'acide gallique et les phlorotanins (3, 4)) et les lignines (polymères constitués par trois types de monomères différents : le coniféryle, le p-coumaryle, les alcools sinapiques).
- } flavonoïdes

Les polyphénols sont présents dans diverses substances naturelles ; sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges, de tanins dans le vin rouge, de flavonoïdes dans les agrumes, et sous forme de quercétine dans le thé, le chocolat, les pommes, les oignons, les algues brunes , etc.

L'action des polyphénols au sein des plantes et de leur environnement est multiple mais encore mal connue. Les polyphénols sont connus pour former des **complexes avec certaines molécules organiques** et aussi avec certaines macromolécules. Ces associations peuvent être covalente ou non-covalente. Les tanins, par exemple, interagissent fortement avec les protéines pour former des complexes insolubles (5).

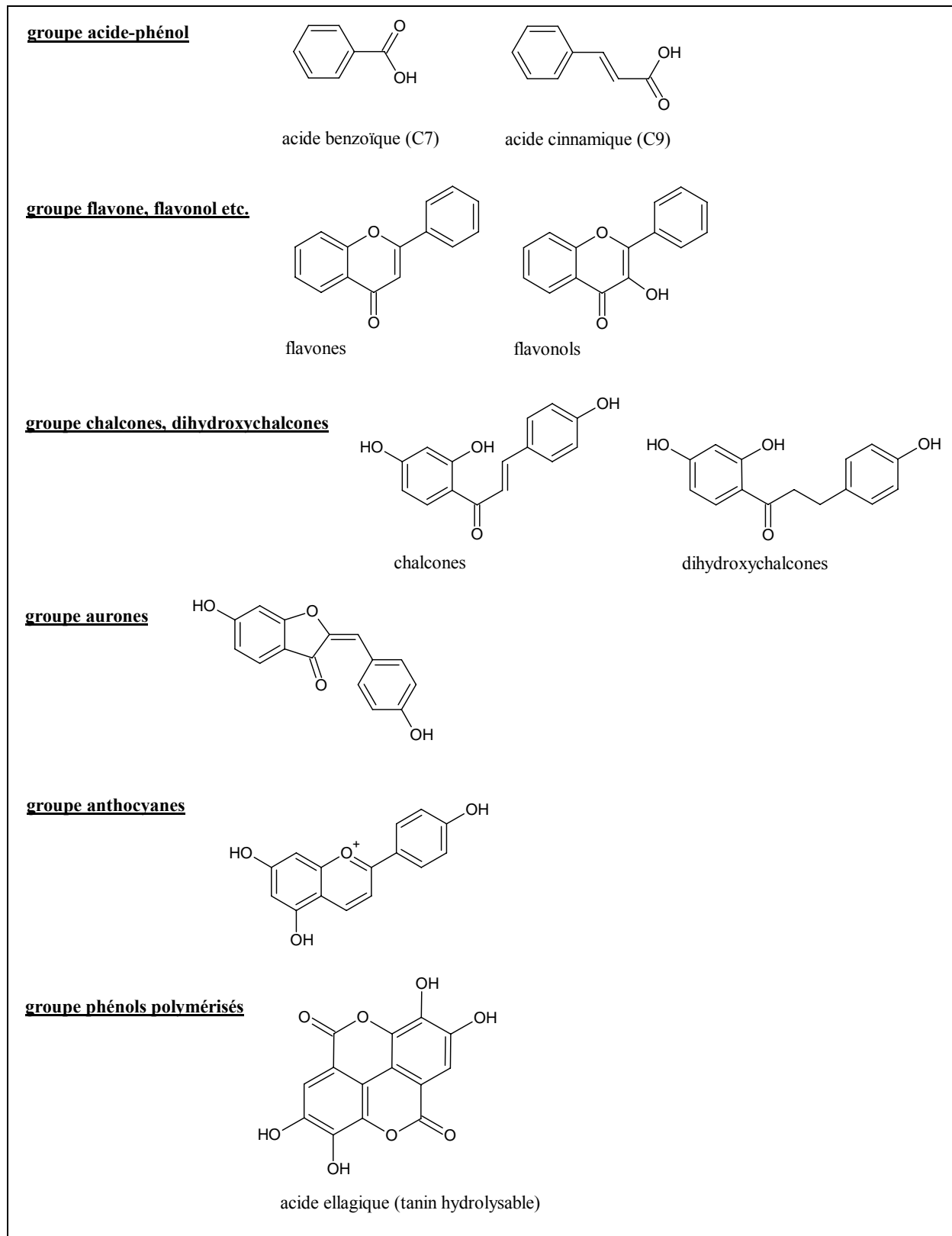


Figure 1 : Les différents grands groupes de polyphénols naturels. Une multitude de dérivés existent en fonction des substitutions notamment sur le cycle B (cf. figure 2).

Ces associations avec les protéines influencent des facteurs tels que le goût et la valeur nutritionnelle en inhibant certaines enzymes présentes dans la nourriture : la perte

d'astringence lors du mûrissement du fruit, est due à la présence de polysaccharides qui perturbent la capacité des polyphénols à se complexer aux glycoprotéines buccales, lorsqu'on goûte le fruit (2).

En présence de certains types de polysaccharides (macromolécules solubles) comme les cyclodextrines (6), les associations polyphénols-protéines peuvent être modifiées, par l'inclusion des substrats phénoliques dans la cavité du macrocycle.

De même que les flavonoïdes (cf. II Structure et propriétés des flavonoïdes 2)b.ii) Propriétés pharmacologiques), certains polyphénols de masse moléculaire élevée ont des propriétés **antioxydantes**. Les décès dus aux infarctus du myocarde sont à associer aux taux élevés de cholestérol au niveau des LDL ("Low Density Lipoproteins") circulant dans le sang. Des études ont démontré qu'une consommation importante d'antioxydants phénoliques pouvait être corrélée avec une baisse significative des décès en diminuant l'oxydation des LDL (7).

D'autre part, les propriétés antioxydantes des composés phénoliques présents dans le vin rouge (tanins), retardant la sclérose artérielle ont été proposées comme explication pour le « paradoxe français » (7, 8).

2) La famille des flavonoïdes

a. Origine

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne à trois carbones ponté par un oxygène (cycle γ -pyrone ou C) (Figure 2).

La synthèse de ce type de molécules (Figure 3) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone, une dihydrochalcone (9, 10).

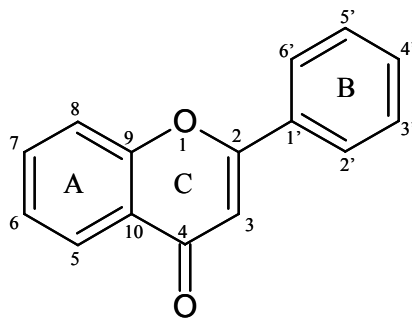


Figure 2 : Structure type des flavonoïdes. Un groupe OH en position 3 nous donne la 3-hydroxyflavone (3HF), en position 5 la 5-hydroxyflavone (5HF) et en position 3' et 4' la 3',4'-dihydroxyflavone (3'4'diHF).

Par l'action d'enzymes, cette chalcone de couleur jaune, est métabolisée en différentes classes de flavonoïdes: flavanone, aurone (jaune), flavanonol, flavone (ivoire), anthocyanidine (rouge-bleu), flavonol (jaune), catéchine... Des étapes ultérieures, surtout de glycosylation et d'acylation, amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle ils se trouvent dans la nature.

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B ainsi que sur la chaîne C3 intermédiaire. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides où une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont glycosylées.

b. Propriétés biochimiques et pharmacologiques

i) *Propriétés biochimiques*

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois... bien que certains soient plus spécifiques de certains tissus. Les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs.

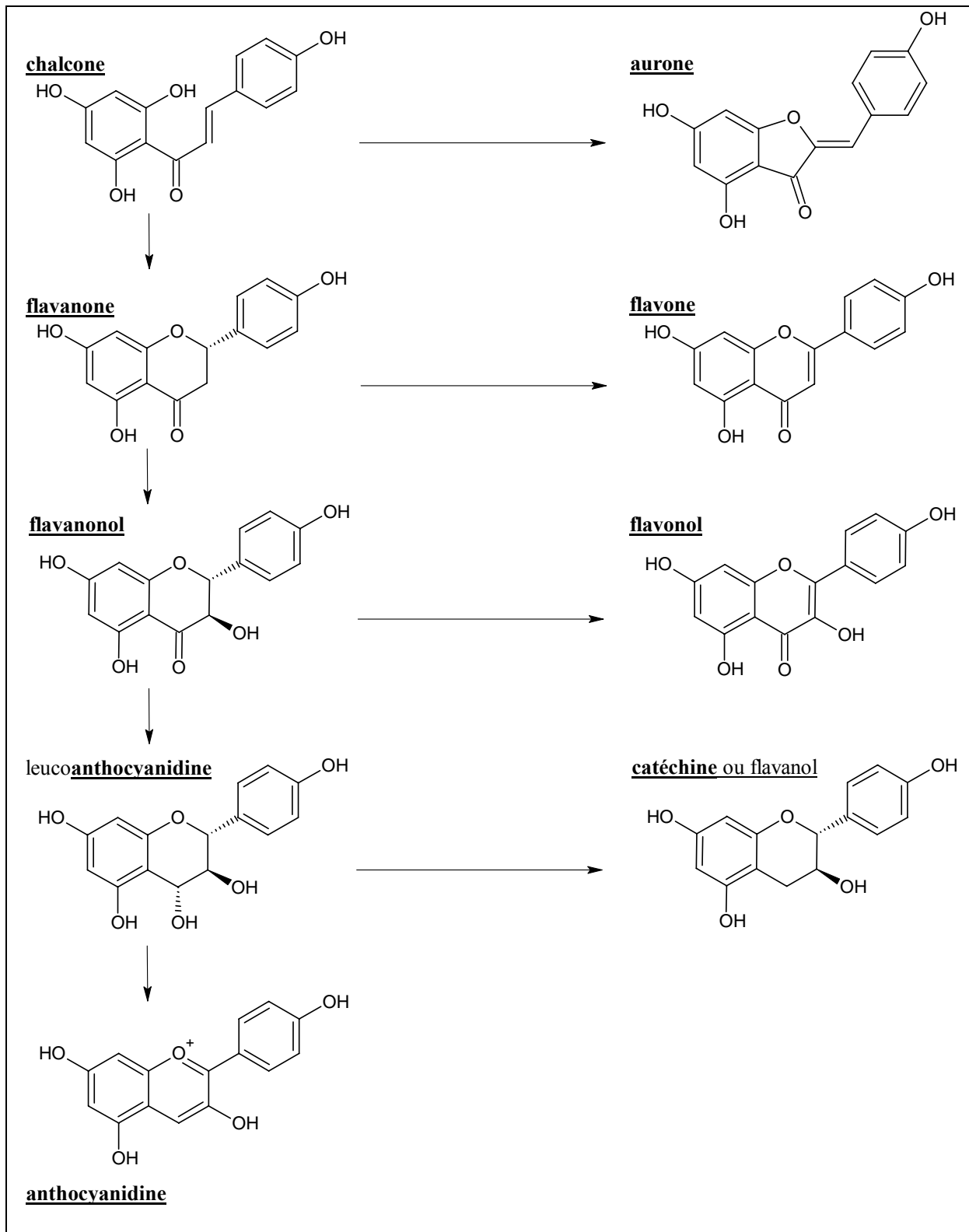


Figure 3 : Synthèse des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont des pigments naturels comme les chlorophylles (couleur verte) et les

caroténoïdes (nuances jaunes et orangées). Une de leur fonction principale est la pigmentation des plantes. Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes (Figure 4), sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge (Figure 5).



Figure 4 : Fleurs de *Clitoria ternatea*, leur couleur bleu-violet est donnée par l'anthocyane ternatine A.

Les flavones, auronnes et chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beige voire blanche, ou participent aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes. La copigmentation intensifie et stabilise la couleur dans des conditions de pH où l'anthocyane est quasiment incolore (11).

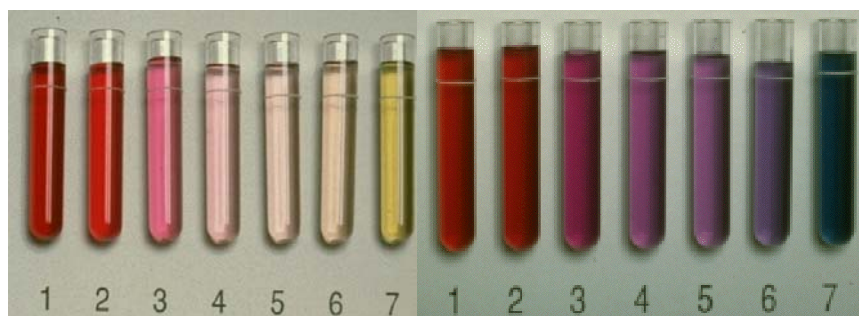


Figure 5 : Variation de la couleur en fonction du pH pour la malvine (anthocyane) (de pH = 1 à 7); à gauche : sans caféine; à droite : avec caféine (11).

Chez les végétaux, la couleur permet d'attirer les insectes afin de les charger de pollen ou de graines de façon à en assurer la dissémination nécessaire à la reproduction de l'espèce (12).

Certains insectes, telle que l'abeille, distinguent les fréquences de radiation dans le domaine ultra-violet et visible (où les flavonoïdes présentent un spectre d'absorption) et montrent des préférences pour certaines teintes. La possibilité de changer sa couleur est utilisée par les plantes pour assurer la survie de l'espèce. De plus, sans ces colorants pour les protéger des radicaux libres, ces plantes mourraient rapidement.

ii) Propriétés pharmacologiques

Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine biomédical où on leur reconnaît de multiples activités (13) :

- propriétés antioxydantes : ils diminuent la formation de radicaux libres (lutte contre le vieillissement cellulaire),
- vasculoprotectrices : les proanthocyanidols présents dans le vin rouge ont une activité protectrice contre l'infarctus du myocarde, et s'opposeraient aux processus de formation des plaques formées dans les artères (2, 7),
- anti-cancéreuses : selon une étude finlandaise les gens ayant un régime riche en flavonoïdes de fruits ou de légumes ont moins de risques de cardiopathie, cancer et autres maladies chroniques (14),
- anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, antiulcéreuses, antihépatotoxiques... (15, 16)

D'autres études n'ont pu toutefois confirmer l'effet protecteur des flavonoïdes car les étapes de digestion et absorption sont décisives et vont varier le taux de molécules utiles de 5 à 50% chez les individus. Actuellement, de nombreuses études continuent à être publiées sur les flavonoïdes pour comprendre leur mécanisme d'action et notamment leur photochimie (17).

3) Propriétés complexantes des flavonoïdes

Les processus de complexation de flavonoïdes avec des métaux sont très largement étudiés. Ces phénomènes sont reconnus pour jouer un rôle dans la coloration des plantes : la couleur des anthocyanes dépend de la structure chimique et peut varier lors de la complexation de métaux ou selon l'acidité du milieu (11). De même, l'activité antibactérienne des flavones est reliée à la capacité de complexation des métaux impliqués dans le développement bactérien (18).

En 1919, Shibata montre que la coloration bleue de certain anthocyane est due à la formation de complexes magnésium-anthocyane (la comméline) car ni le pH ni les copigments permettent d'obtenir cette couleur, la formule du complexe $(M_6F_6Mg_2)^{2-}$ ne sera révélé qu'en 1986 (19, 20). En 1957, Hayashi isole le complexe 1:4 entre un atome de magnésium, deux anthocyanes (awobanine) et deux unités flavoniques (la flavocommeline) dans des fleurs bleues de *Commelina communis* (21). En 1958, Bayer sépare une deuxième métalloanthocyane, la protocyanine isolée de *Centaurea cyanus*, qu'il décrit comme l'association d'un ion métallique trivalent lié à deux molécules de cyanine et une molécule d'acide polygalacturonique (22).

L'activité anti-oxydante des flavonoïdes est aussi liée à cette capacité complexante : les molécules de flavones chélatent les ions métalliques, catalyseurs de la formation de radicaux (23).

De plus, ces molécules sont, en partie, à l'origine de la formation de la MON et constituent donc de très bons modèles pour l'étude des différents sites de complexation. Bien que de nombreuses études soient publiées concernant les complexes métalliques des flavonoïdes, les mécanismes de complexation sont encore mal connus et très peu de données sont disponibles, notamment sur la fixation du plomb.

4) Propriétés spectroscopiques

a. Spectroscopie UV-visible

Etant donné les propriétés de colorants des flavonoïdes, l'étude par spectroscopie UV-

visible est particulièrement indiquée pour l'identification de ce type de molécules. Les formes mésomères (Figure 6) des flavones qui sont dues aux différentes délocalisations des électrons mobiles absorbent dans la zone 320-380nm (bande I) et 240-270nm (bande II) (Figure 7).

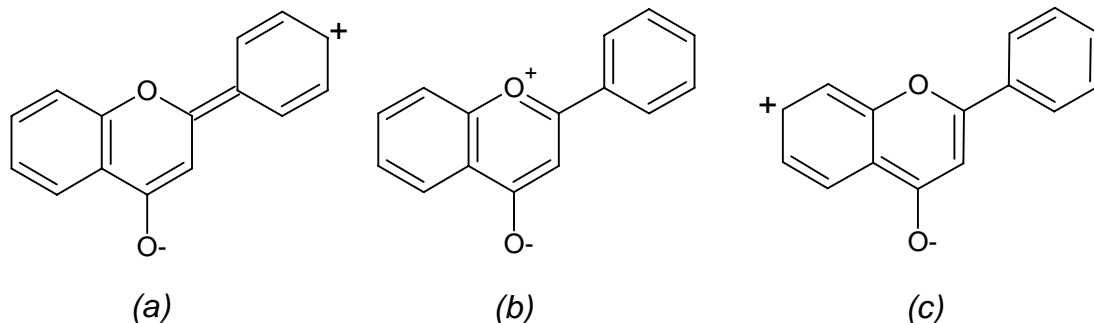


Figure 6 : Formes mésomères des flavonoïdes.

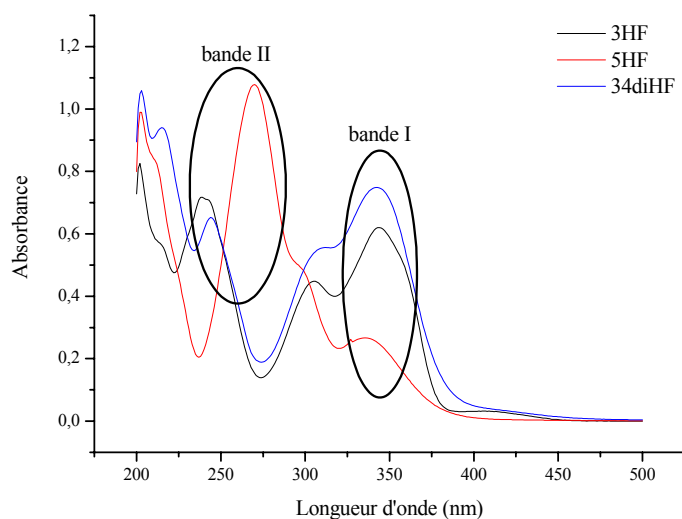


Figure 7 : Spectres UV-visible des trois hydroxyflavones dans le méthanol $C=4.10^{-5}M$. On note une ressemblance dans le spectre de la 3HF et de la 3'4'diHF ; la bande II apparaît plus sensible à la substitution que la bande I notamment sur le cycle A.

La substitution sur le noyau benzénique B modifiera la bande I de manière prépondérante et celle sur le noyau benzénique A la bande II. Les flavones possèdent également un épaulement vers 300 nm. En général, l'hydroxylation du squelette entraîne un déplacement bathochrome de la bande I et hypsochrome de la deuxième bande caractéristique (24).

Mais pour être plus juste dans les prévisions des effets sur un spectre UV-visible de la complexation, substitution ou déprotonation, il faut prendre en compte les transitions électroniques concernées pour les bandes observées. Dans des travaux précédents (25), il a été montré que toutes les transitions ont un caractère $\pi-\pi^*$; de plus nous savons désormais que c'est l'ensemble de la molécule et non un cycle particulier qui est responsable d'une transition. L'hydroxylation en 3 ou en 5 modifie beaucoup les spectres UV ; il apparaît aussi que la nature des transitions observées est différente pour chacune des flavones étudiées.

Autrefois l'aluminium était utilisé en UV-visible pour détecter la présence de groupements ortho-dihydroxyles sur des flavonoïdes (26).

b. Spectroscopies de vibration

Les spectroscopies de vibration (infrarouge ou Raman) présentent l'avantage d'identifier de faibles changements structuraux. Néanmoins, la faible solubilité des flavonoïdes rend difficile l'étude en solution de ces composés. On sait que l'on a :

- vers 1165 cm^{-1} : vibration du cycle benzénique disubstitué en méta,
- à 1360 cm^{-1} et 1200 cm^{-1} : déformation dans le plan des OH phénoliques,
- vers 1650 cm^{-1} : élongation du groupement CO du cycle C,
- enfin vers 3300 cm^{-1} : vibration d'élongation des OH libres (ou vers 3100 cm^{-1} en présence de liaisons hydrogènes).

L'étude des modifications de la fréquence d'élongation de la fonction carbonyle fournira en particulier des renseignements utiles. Effectivement, celle-ci sera plus ou moins perturbée par la complexation d'un métal en position 3 ou 5 et permettra en partie de déterminer dans le cas de flavones multi-site l'emplacement de la fixation du métal. Dans le cas de la substitution en position 3, on observe un déplacement plus important qu'en position 5 qui ne semble pas très affecté par la substitution (27). Des études ont mis en évidence que la position de cette bande était non pas due à la plus ou moins forte implication de la liaison hydrogène intramoléculaire du groupe OH adjacent mais à la compétition de différentes formes mésomères des flavonoïdes (Figure 6). Ces dernières sont en compétition pour la 3HF et la 3'4'diHF et pas pour la 5HF en raison d'une part de la sensibilité de ces formes à la polarité, et d'autre part

dans le cas de la 5HF, à la force beaucoup plus grande de la liaison hydrogène rendant la fonction carbonyle moins sensible à la polarisation (28).

L'avantage de la spectroscopie de vibration, est d'observer avec précision la structure d'un système. Lors de la complexation, il sera alors possible via cette technique d'analyser les changements structuraux afin de déterminer le mécanisme et le site de fixation du cation métallique sur une molécule qui contient plusieurs sites chélateurs possibles (la quercétine dans notre cas).

c. Autres techniques

Bien que les techniques UV-visible, Raman ou infrarouge soient les plus répandues dans l'étude des flavonoïdes, une série d'autres méthodes sont exploitées pour l'étude de ces molécules organiques.

La **RMN** constitue un moyen fréquent d'analyser la structure et les changements dû à la complexation d'ions métalliques Al(III), Cu(II), Zn(II) ou tel que Mn(II), Fe(II) ou Co(II) (29-33). Le principal problème dans l'utilisation de la RMN est le milieu de travail, les deutériums du solvant nécessaire pour l'analyse sont facilement échangeables (méthanol par exemple) et les manipulations sont relativement peu aisées. De plus, les sites de fixation sont dans notre cas constitué de groupement hydroxyle : ce qui représente un inconvénient car les protons des hydroxyles n'étant pas détectable en RMN ^1H (car on n'est susceptible de voir que les variations de spin), l'observation des complexations est rendue délicate.

Pour parer à cet inconvénient, la **RPE** est aussi souvent utilisé (32, 34, 35) : elles permettent une détection des espèces paramagnétiques. Son principe repose sur l'effet Zeeman : soumis à l'action d'un champ magnétique extérieur, les niveaux d'énergie de spin se séparent puis, sous l'action d'un second champ magnétique perpendiculaire au premier, un photon est absorbé (condition de résonance). Chaque signal est caractéristique de l'élément paramagnétique et de son environnement proche (sphère de coordinance).

D'autres moyens sont encore employés comme la voltamétrie ou toutes techniques **électrochimiques** basée sur la mesure du courant (30, 32, 34). Elle permet d'identifier et de mesurer un grand nombre de composés (cations, certains anions, composés organiques), et

notamment de voir les effets des conditions rédox sur la réactivité.

III. Complexation de l'aluminium (III)

Dans des travaux antérieurs effectués au sein de l'équipe (36-43), la complexation de l'aluminium (III) avec les flavonoïdes mono-sites a été étudiée dans le méthanol ; nous comparerons ces résultats à ceux obtenus dans les mêmes conditions pour les métaux lourds (plomb (II) et zinc (II)) à la fin du chapitre. Le paragraphe suivant expose les résultats de la complexation de l'aluminium (III) dans un solvant mixte méthanol-eau 50% v/v où le pH a été fixé à 6.

La méthode des rapports molaires sera utilisée pour cette étude. On notera R le rapport $\frac{[\text{ion métallique}]}{[\text{ligand}]}$ où l'ion métallique peut être Al(III), Pb(II) et Zn(II) et le ligand la 3HF, la 5HF et la 3'4'diHF.

La complexation très différente entre d'un côté la 3HF et la 5HF et de l'autre la 3'4'diHF, était utilisée pour identifier les molécules. De plus, le déplacement en longueur d'onde de la bande I était utilisé alors pour différencier les sites α et β -hydroxy-carbonyle (44).

1) La 3-hydroxyflavone

Lors de la complexation de l'aluminium (III) par la 3HF à pH=6, nous avons obtenu les spectres représentés sur la Figure 8 en ajoutant des quantités croissantes de solution de sels métalliques.

Le spectre de la 3HF dans un solvant méthanol-eau est caractérisé par des bandes à 343 et 308 nm (bande I) et 241 nm (bande II). L'intensité de la bande I à 343 nm de la 3HF libre diminue graduellement pour se stabiliser vers un rapport R de 1 où la réaction atteint un palier. En parallèle, deux nouvelles bandes apparaissent à des longueurs d'onde comprises entre 400 et 470 nm reflétant la formation d'au moins deux complexes.

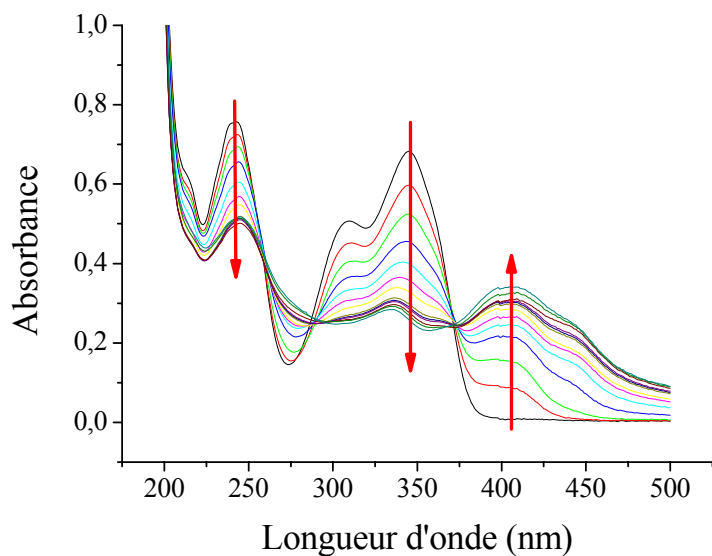


Figure 8 : Evolution des spectres UV-visible de la 3HF ($4.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un mélange MeOH/H₂O 50% v/v avec ajout de Al (III) $4.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ en fonction du rapport R de 0 à 2,5.

Figure 9 : Méthodes des rapports molaires appliquées aux spectres UV-visible de la complexation de Al(III) par la 3HF aux maxima d'absorption de la 3HF (343 nm) et de sa forme complexée (404 nm).

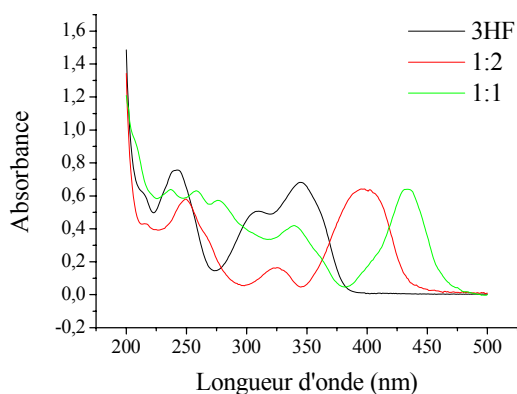
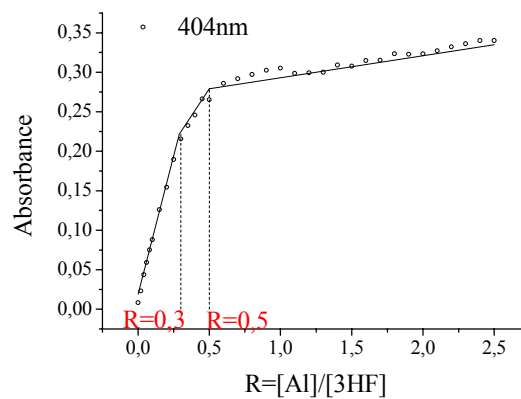
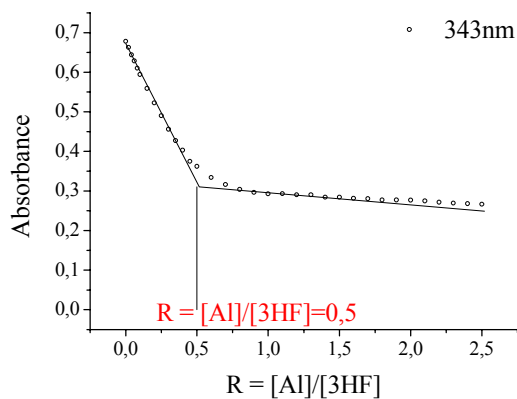


Figure 10 : Spectres UV-visible extraits au moyen de traitement chimométrique des complexes $[Al(3HF)_2]^+$ et $[Al(3HF)_2]^+$ à pH=6.

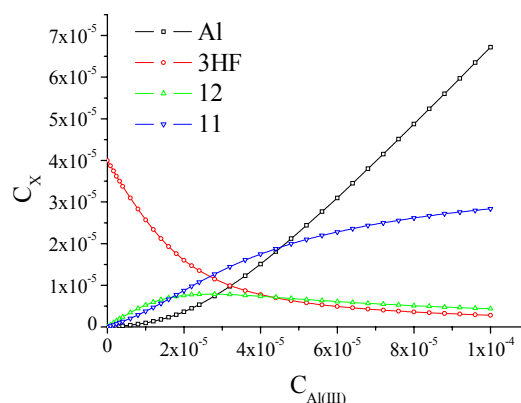


Figure 11 : Courbes de concentrations des différentes espèces au cours du dosage de complexation de Al (III) par la 3HF en milieu mixte.

On observe très nettement sur le faisceau de spectres l'apparition de deux bandes distinctes à respectivement 404 et 440 nm. Pour des quantités relativement importante de Al(III) ajouté, on observe l'apparition d'un fond continu pour des longueurs d'onde supérieures à 450 nm qui est dû à un phénomène de diffusion provoqué par un début de précipitation. La présence d'un précipité d'hydroxyde d'aluminium peut être exclu, car les concentrations en Al(III) utilisées sont trop faibles ($\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$ se forme en trop faible concentration dans nos conditions expérimentales, Figure 12). Il peut donc s'agir de la précipitation du complexe qui présenterait une solubilité plus faible que le ligand libre dans la solution méthanol/eau. Dans le traitement numérique du faisceau de spectres, ce fond sera pris en considération.

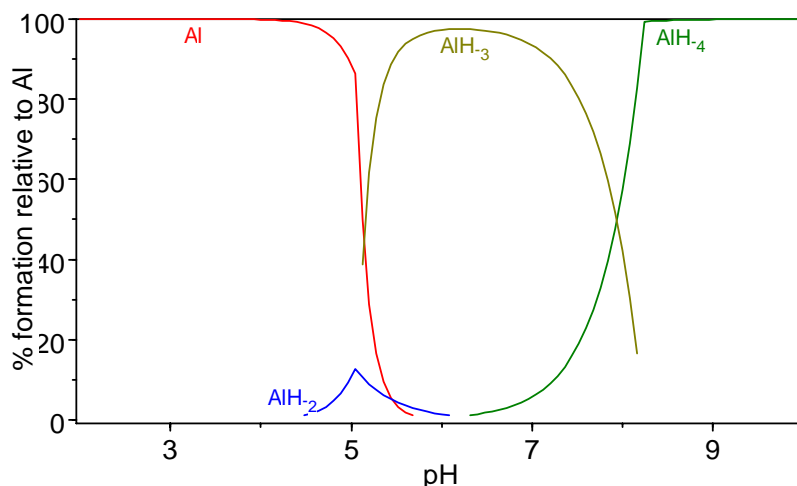


Figure 12 : Spéciation de l'aluminium en solution (réalisée à l'aide du logiciel Hyperquad Simulation and Speciation (HySS) (45). Les formes moléculaires sont données par la formule Al_xH_y : AlH_{-1} correspond à $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, AlH_{-2} à $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, AlH_{-4} à $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ et Al_3H_{-4} à $\text{Al}_3(\text{OH})_4^{5+}$. La concentration totale en ions Al^{3+} est 4.10^{-5}M .

La stoechiométrie des complexes est obtenue à partir de la méthode des rapports molaires (Figure 9) en traçant l'absorbance aux maxima d'absorption du ligand libre ou du complexe formé avec le métal en fonction du rapport R. L'aluminium (III) forme ici avec la 3HF des complexes de stoechiométrie 1:3 , 1:2 et 1:1 (respectivement $R = 0,33$; 0,5 et 1).

L'analyse par traitement numérique (méthode EFA –Evolving Factor Analysis-) permet l'extraction que de trois spectres d'espèces pures majoritaires (la forme libre et deux

formes complexées). Le modèle qui permet le meilleur ajustement avec les données expérimentales montre la présence prédominante des complexes 1:2 et 1:1. Les spectres de ces espèces sont représentés sur la Figure 10. La valeur des constantes de formation est respectivement pour les complexes $[Al(3HF)_2]^+$ et $[Al(3HF)]^{2+}$: $\log\beta_{1:2} = 9,91 \pm 0,15$ et $\log\beta_{1:1} = 5,17 \pm 0,12$. Le complexe $[Al(3HF)_3]^0$ doit être une espèce minoritaire, présente en très faible concentration au tout début du dosage et qu'il est impossible de mettre en évidence par le traitement numérique.

La Figure 11 présente la variation des concentrations des différentes espèces au cours du dosage. Pour des faibles quantités d'Al(III) ajoutées ($R < 0,4$) le complexe 1:2 est majoritaire. A partir d'un rapport R de 0,5 la concentration du complexe 1: 2 diminue au profit de la formation du complexe 1:1. Pour un rapport $R=2,5$, il reste 7% de ligand libre en solution.

Précédemment, il a été montré que la 3HF présentait une grande capacité à se complexer avec Al(III) quelque soit le milieu grâce à la formation de l'ion flavylum (Figure 13) très stable de part de son caractère aromatique (44).

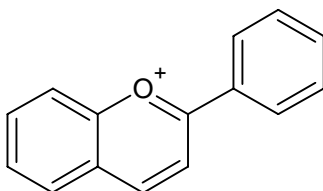


Figure 13 : Structure du cation flavylum.

Dans le méthanol pur, la 3HF forme un complexe de stoechiométrie 1:2 lors de l'ajout d'Al(III) (36). Il faut noter la différence de stoechiométrie obtenue entre les deux milieux ; des stoechiométries plus élevées sont obtenues dans un solvant mixte méthanol-eau à pH=6 (formation d'un complexe 1:3 en très faible concentration). Cependant le pouvoir de complexation dans ce milieu est plus faible. En effet, pour un rapport $R=1$, la réaction de complexation est terminée et il reste moins de 10% de ligand libre en solution dans le méthanol alors qu'en milieu mixte à pH=6 pour ce même rapport il reste plus de 20% de

ligand libre.

2) La 5-hydroxyflavone

Du point de vue structural, en raison de la grande force de la liaison hydrogène rendant la fonction carbonyle moins sensible à la polarité que les autres mono-sites, la 5HF présente généralement un pouvoir chélatant moins élevé que la 3HF (37).

La famille de spectres résultant de la complexation d'Al(III) par la 5HF montre de faibles variations d'intensité des bandes I (339 nm) et II (270 nm) du composé libre (Figure 14). L'intensité de la bande I diminue au profit d'une nouvelle bande qui apparaît vers 400 nm. Celle-ci se forme dès l'ajout d'aluminium (III) en solution ; enfin un léger effet hypsochrome (quelques nm) est observé sur la bande II. La présence d'un point isobestique à 370 nm indique la formation d'un seul complexe.

La méthode des rapports molaires montre clairement la formation d'une espèce de stoechiométrie 1:2 et de formule $[Al(5HF)_2]^+$ (Figure 15). De plus, on peut observer la formation d'un composé 1:10 ($R=0.1$) : celui-ci correspond à la formation d'oligomère. Cependant, cette espèce se forme qu'en très faible quantité et un spectre caractéristique de cette espèce n'a pas pu être extrait du faisceau de spectres enregistrés. La valeur calculée de la constante de formation du complexe est : $\log\beta_{1:2} = 8,37 \pm 0,03$.

Dans le méthanol pur, la 5HF forme un complexe 1:1 avec Al(III) entraînant un déplacement de la bande I de 61nm et de la bande II de 23nm. Dans le solvant mixte, le complexe est de stoechiométrie différente, le spectre d'absorption est lui aussi très différent du spectre du complexe 1:1 dans le méthanol (déplacement de 65nm de la bande I et de seulement quelques nanomètres de la bande II).

Même si la stoechiométrie du complexe obtenue dans le solvant mixte est supérieure à celle observée dans le méthanol pur, la complexation dans ce milieu est favorisée. A titre d'exemple, pour un rapport molaire $R = 2,5$, la quasi-totalité du ligand est impliquée dans la formation du complexe dans le méthanol alors que 44% de ligand reste en solution sous forme libre dans le milieu mixte.

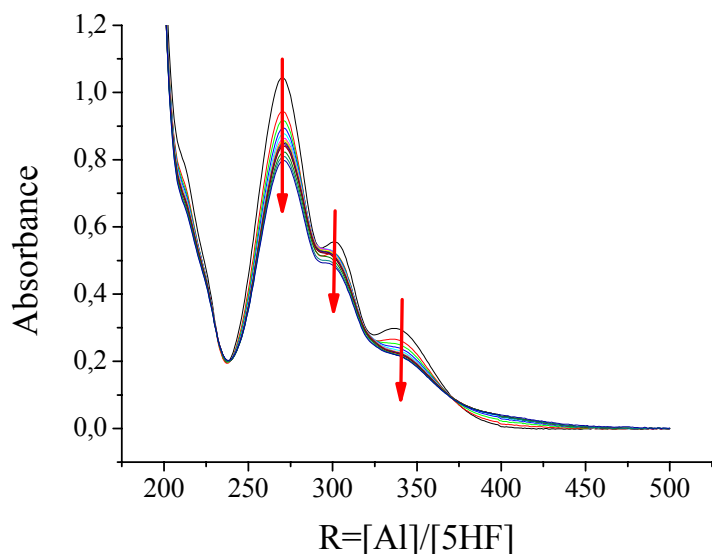
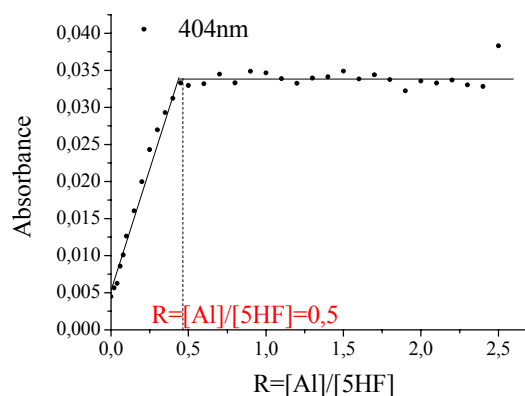
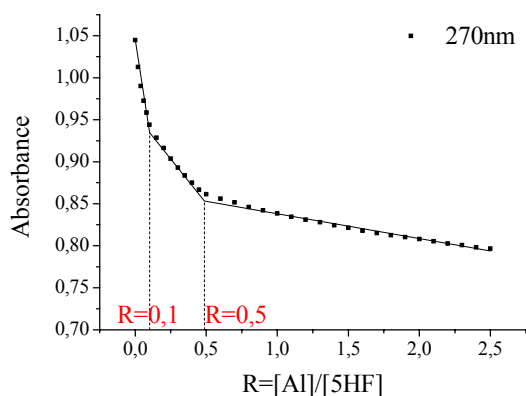


Figure 14 : Evolution des spectres UV-visible de la 5HF (4.10^{-5} mol.L $^{-1}$) dans un mélange MeOH/H $_2$ O 50% v/v avec l'ajout de Al (III) 4.10^{-4} mol.L $^{-1}$ en fonction du rapport R, de 0 à 2,5.

Figure 15 : Méthodes des rapports molaires appliquées à la complexation de Al(III) par la 5HF aux maxima en longueur d'onde de la 5HF (270 nm) et de la forme complexée (404 nm).



De plus, Al(III) s'avère moins complexé par la 5HF que par la 3HF dans le mélange méthanol/eau, puisque la quantité de complexes mesurée en fin de dosage est beaucoup plus faible. Il faut noter qu'aucun fond n'est apparu sur le faisceau de spectre de la 5HF, ce qui peut s'expliquer par la plus faible concentration de complexe et ce qui confirmerait l'hypothèse d'une plus faible solubilité du complexe que du ligand en présence d'eau.

3) La 3',4'-dihydroxyflavone

Le spectre de la 3'4'diHF en solution dans un solvant mixte méthanol-eau à pH=6 présente une double bande d'absorption à 341-308 nm (bande I), une bande à 243 nm (bande

II) ainsi qu'un épaulement à 212 nm. Dans ce solvant mixte, l'ajout croissant d'ions métalliques Al(III) provoque l'apparition de nouvelles bandes (Figure 16).

Au début du dosage, on observe un point isobestique à 363 nm, alors qu'en fin de dosage un autre point isobestique est localisé à 390 nm. Cependant, il est difficile de discerner dans le faisceau des maxima correspondant à deux complexes distincts. La méthode des rapports molaires appliquée au faisceau de spectres met en évidence des complexes de stoechiométrie 1:2 et 1:1 (Figure 17). Des analyses numériques ont permis d'extraire les spectres des complexes et d'obtenir les constantes de formation de $[\text{Al}(3'4'\text{diHF})_2]^-$ et $[\text{Al}(3'4'\text{diHF})]^+$: $\log\beta_{1:2} = 9,24 \pm 0,07$ et $\log\beta_{1:1} = 4,85 \pm 0,04$. L'évolution de la concentration des différentes espèces en fonction de la concentration en Al(III) ajouté montre que les deux complexes se forment simultanément dès le début du dosage (Figure 19). Ce constat est surprenant à la vue du point isobestique observé à 363 nm; cependant, les spectres des deux complexes (Figure 18) étant très voisins au niveau des maxima d'absorption, il est envisageable que la formation simultanée de deux espèces dont les spectres sont très proches donne lieu à l'observation d'un point isobestique. Jusqu'à un rapport molaire $R = 0,3$, les complexes $[\text{Al}(3'4'\text{diHF})_2]^-$ et $[\text{Al}(3'4'\text{diHF})]^+$ se forment dans les mêmes proportions, ce n'est qu'après ce rapport que le complexe 1:1 devient prédominant. Pour un rapport $R = 1$, il reste 25 % de ligand libre en solution.

Il faut noter que l'on observe sur le faisceau de spectres, pour des valeurs importantes de concentration en Al(III) ajouté, un fond vers les grandes longueurs d'onde. Une fois de plus, cela est en accord avec une formation importante de complexes et par conséquent un début de précipitation.

Ces résultats contredisent certaines observations selon lesquelles il a souvent été constaté que la fonction catéchol nécessitait un milieu alcalin pour pouvoir complexer. Par la suite, il a été montré que la nécessité d'un pH élevé provient du fait qu'un des hydroxyles se déprotone pendant une étape de la chélation avant que le métal ne se fixe sur la molécule et que dans ces conditions, la structure catécholate est particulièrement stabilisée (46).

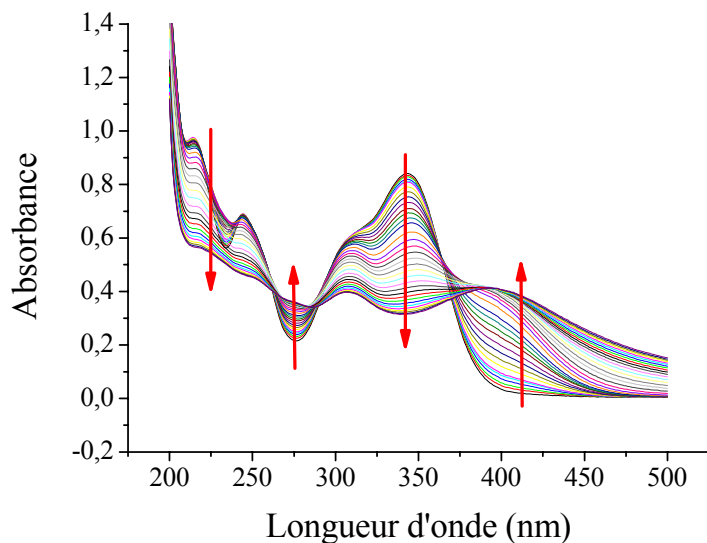


Figure 16 : Evolution des spectres UV-visible de la 3'4'diHF 6.10^{-5} mol.L⁻¹ dans un solvant mixte 50 % V/V MeOH/H₂O avec ajout de Al(III) 6.10^{-4} mol.L⁻¹ du rapport R = 0 à 2,5.

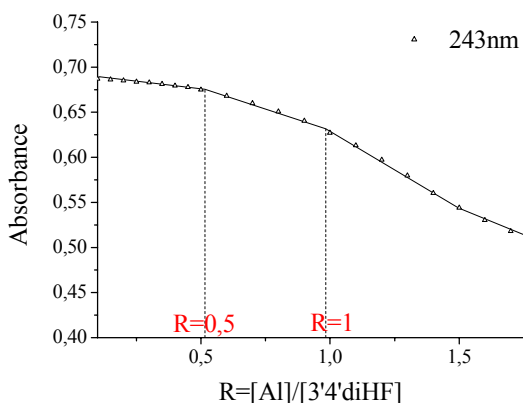


Figure 17 : Méthode des rapports molaires appliquée à la complexation de Al(III) par la 3'4'diHF aux maximum en longueur d'onde de la 3'4'diHF.

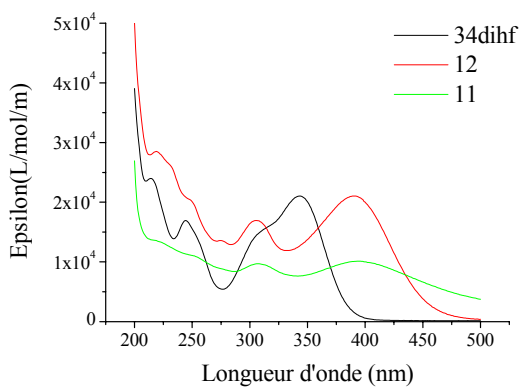


Figure 18 : Spectres UV-visible extraits au moyen de traitement chimiométrique des complexes $[Al(34diHF)_2]^+$ et $[Al(34diHF)]^+$ à pH=6.

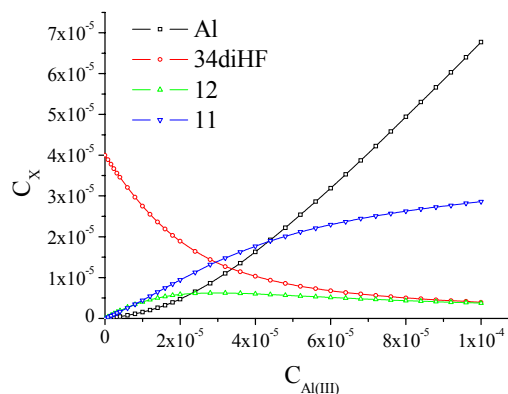


Figure 19 : Courbes de distribution des concentrations des différentes espèces au cours du dosage de complexation de Al(III) par la 3'4'diHF en milieu mixte.

Comparativement à cette complexation de Al(III) par la 3'4'diHF, dans certains cas, les auteurs observent des complexes 1:3 (milieu MeOH en présence de NaOMe où les deux hydroxyles en 3' et 4' sont déprotonés) ou 1:2 (milieu MeOH en présence de KOAc où seule la fonction hydroxyle en 4' est déprotonée) (47) voire seulement un complexe 1:1 (milieu MeOH pur) (36) suggérant la très forte influence du milieu, et notamment du pH, sur l'observation des diverses stoechiométries.

4) Comparaison avec la complexation des hydroxyflavones dans le méthanol

Les principaux résultats obtenus préalablement pour la complexation de l'aluminium (III) avec les flavonoïdes mono-sites dans le méthanol (36) ainsi que ceux obtenus à pH=6 dans un solvant mixte méthanol-eau, sont réunis dans le Tableau 1.

Al	Méthanol			pH=6		
	Al:L	$\Delta\lambda$ (nm)	$\log\beta$	Al:L	$\Delta\lambda$ (nm)	$\log\beta$
3HF				1:3		
	1:2	58	12,3	1:2	61	9,91
				1:1	97	5,17
5HF				1:2	67	8,37
	1:1	61	6,5			
3'4'diHF				1:2	46	9,24
	1:1	42	6,7	1:1	50	4,85

Tableau 1 : Stoechiométries des chélates formés et déplacements spectraux de la bande I lors de la complexation de l'aluminium par la 3HF, la 5HF et la 3'4'diHF dans le méthanol et dans un solvant mixte méthanol-eau à pH=6.

Le déplacement $\Delta\lambda$ montré dans ce tableau est celui de la bande I (# 340 nm pour le ligand libre). Pour un ligand donné, $\Delta\lambda$ est quasiment le même (aux effets de solvant près) pour un complexe de même stoechiométrie, dans les deux milieux. Cependant, la complexation des hydroxyflavones dépend fortement du solvant : les espèces formées ne sont pas les mêmes, les stoechiométries sont plus élevées en présence d'eau, à pH=6. Ces différences reflètent un mécanisme dépendant des conditions du milieu tant au niveau des effets de solvatation que

des effets de pH (déprotonation). Cependant le classement du pouvoir de fixation croissant des divers fonctions chélatantes reste identique dans les deux milieux :



Dans des publications antérieures, le déplacement engendré par la complexation de l'aluminium était utilisé pour identifier le flavonoïde présent en solution. Nous voyons ici que ce raisonnement n'est pas valable car les déplacements spectraux sont beaucoup trop proches.

IV. Complexation du plomb (II)

Le plomb (II) représente un des polluants principaux de l'ère industrielle. Sa toxicité et sa persistance en font une préoccupation environnementale importante.

Dans ce paragraphe, nous étudierons la complexation des flavonoïdes mono-sites précédentes par ajout de PbCl_2 en milieu méthanoïque pur et dans un solvant mixte méthanol-eau à $\text{pH}=6$.

1) La 3-hydroxyflavone

Dans le méthanol

Les spectres correspondant à la complexation de la 3HF dans le méthanol sont présentés sur la Figure 20.

L'intensité de la bande I, située à 344 nm, de la 3HF libre diminue avec la quantité de Pb(II) ajouté, simultanément une nouvelle bande apparaît à 405 nm. Au cours de l'ajout d'ions métalliques, l'intensité de la bande à 243 nm augmente. La présence d'un point isobestique à 365nm montre l'existence de deux espèces absorbantes en équilibre. La courbe des rapports molaires (évolution de l'absorbance en fonction de R) tracée à 344nm (λ_{Amax} du ligand libre) et 405 nm (λ_{Amax} de la forme complexée) met en évidence une stoechiométrie 1:1 pour le complexe (Figure 21), soit un complexe $[\text{Pb}(3\text{HF})]^+$.

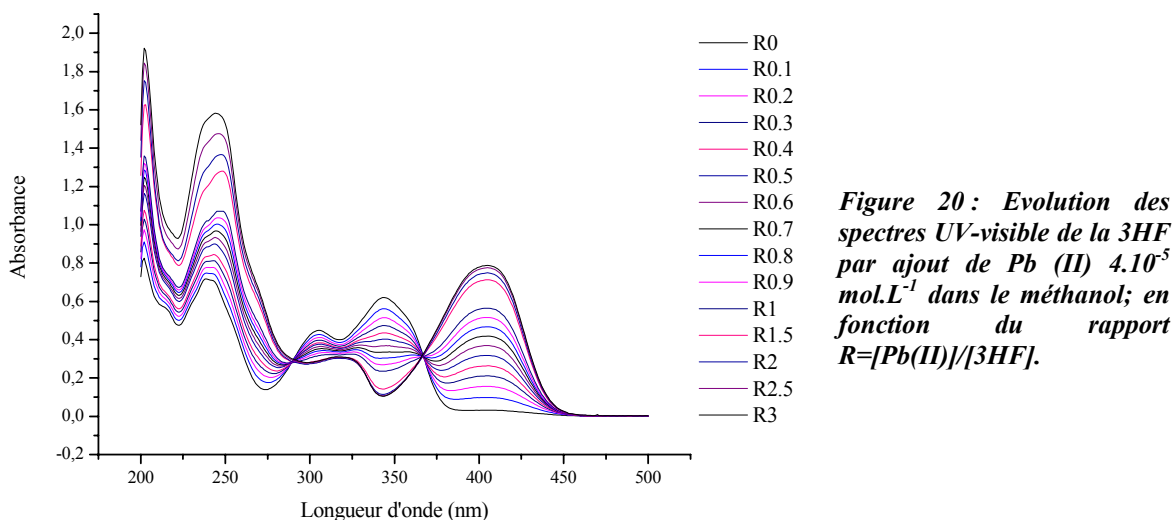


Figure 20 : Evolution des spectres UV-visible de la 3HF par ajout de Pb (II) 4.10^{-5} mol.L⁻¹ dans le méthanol; en fonction du rapport $R=[Pb(II)]/[3HF]$.

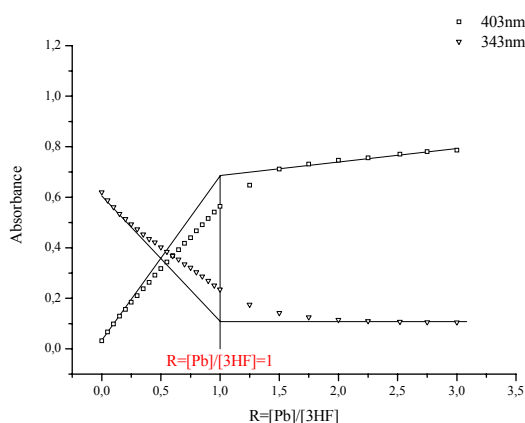


Figure 21 : Méthode des rapports molaires appliquée aux spectres UV de la complexation de Pb(II) par la 3HF au maximum en longueur d'onde de la 3HF (343 nm) et du complexe (403nm).

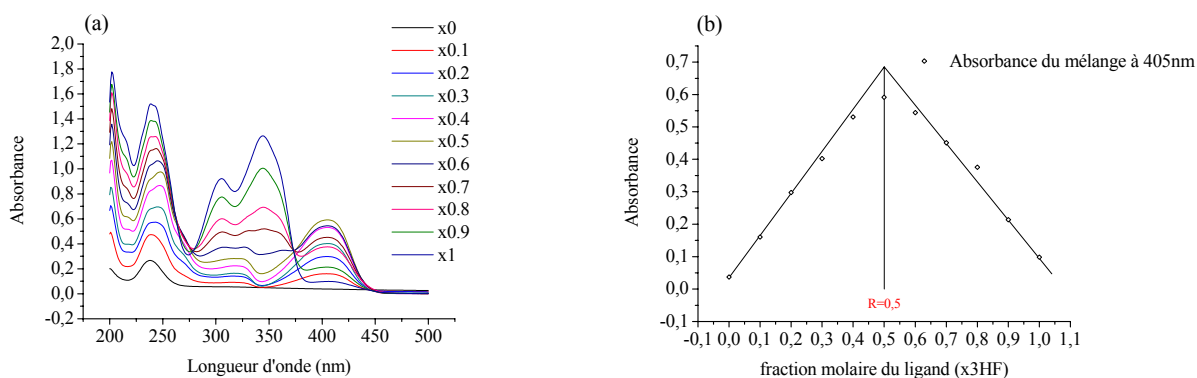


Figure 22 : (a) Spectres UV-visible du mélange 3HF/Pb(II) dans le MeOH en fonction de la fraction molaire du ligand ; $C_{3HF}+C_{Pb}=4.10^{-5}$ mol.L⁻¹. (b) Variation de l'absorbance du mélange 3HF/Pb(II) en fonction de la fraction molaire de la 3HF à la longueur d'onde 405nm (maximum du complexe formé).

La méthode de Job (ou méthode des variations continues) a confirmé ce résultat (Figure 22). De plus par cette approche, la forme de la fonction de Job est caractéristique de la formation d'un seul complexe.

Pour estimer la constante de stabilité du complexe, un traitement numérique des spectres électroniques a été effectué à l'aide du logiciel Specfit. Le modèle donnant les meilleurs ajustements avec les données expérimentales donne une constante de stabilité : $\log\beta_{1:1} = 4,97 \pm 4.10^{-6}$.

En milieu mixte, à pH=6

L'ajout de plomb (II) à une solution de 3HF dans un solvant mixte eau/méthanol à pH=6 engendre des modifications du spectre de la flavone libre (Figure 23).

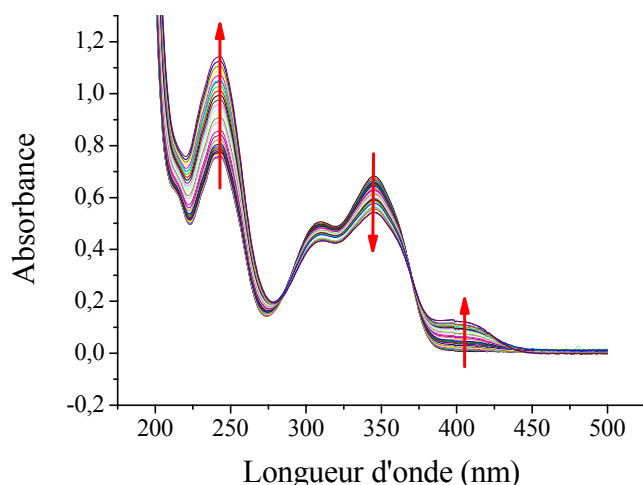


Figure 23 : Evolution des spectres UV-visible de la 3HF $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans un solvant mixte MeOH/H₂O 50% V/V par ajout de Pb (II) $6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ du rapport $R=[Pb]/[3HF]$ 0 à 2,5.

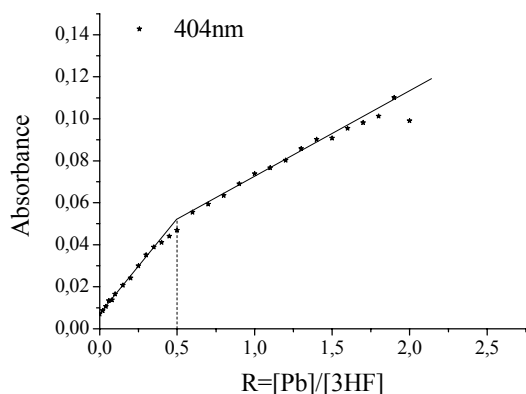


Figure 24 : Méthode des rapports molaires appliquée aux spectres UV de la complexation de Pb(II) par la 3HF au maximum d'absorbance de la forme complexée (404 nm).

On observe des effets similaires à la complexation réalisée dans le méthanol : l'intensité de la bande I, située à 344 nm, de la 3HF libre diminue avec la quantité de Pb(II) ajoutée, simultanément une nouvelle bande apparaît à 405 nm. Au cours de l'ajout de Pb(II), l'intensité de la bande autour de 243 nm augmente également. La présence d'un point isobestique à 365 nm indique l'existence de seulement deux espèces absorbantes en équilibre (le ligand libre et un complexe). La courbe des rapports molaires tracée à 404 nm (λ_{\max} de la forme complexée) permet de déterminer une stoechiométrie 1:2 pour ce complexe (Figure 24), soit un complexe de formule $[\text{Pb}(\text{3HF})_2]$. Le modèle numérique nous permet d'associer à cette espèce une constante de stabilité : $\log\beta_{1:2} = 7,73 \pm 0,09$.

En comparant les faisceaux de spectres de la Figure 20 et de la Figure 23, on observe des similitudes dans la position des bandes bien que les solvants soient différents. Ce fait est d'autant plus étonnant que les complexes formés présentent des stoechiométries différentes. Le spectre du complexe 1:1 dans le méthanol est donc très voisin de celui du complexe 1:2 dans le solvant mixte à pH=6. Cependant si une stoechiométrie plus élevée est observée dans le solvant mixte, il apparaît évident que la complexation est réduite par la présence d'eau. En effet, si on considère par exemple le rapport 2,5 ; la quasi-totalité de la 3HF libre a disparu en solution dans le méthanol alors que 76% de 3HF est toujours présent en solution dans le solvant mixte.

2) La 5-hydroxyflavone

Dans le méthanol

La complexation entre le plomb (II) et la 5-hydroxyflavone apparaît très différente de celle avec la molécule 3HF. Ici, la forme générale du spectre du ligand libre est peu modifiée par l'addition de Pb(II). Il n'y a pas de modification des bandes I et II du spectre ; même si une légère augmentation de l'absorbance, plus ou moins importante selon la longueur d'onde, est observée (Figure 25). Toutefois, une nouvelle bande apparaissant à 241 nm différencie le spectre du complexe de celui de la 5HF.

La méthode des rapports molaires donne une stoechiométrie 1:1 pour le complexe de la 5HF, menant à un chélate $[\text{Pb}(\text{5HF})]^+$ (Figure 26).

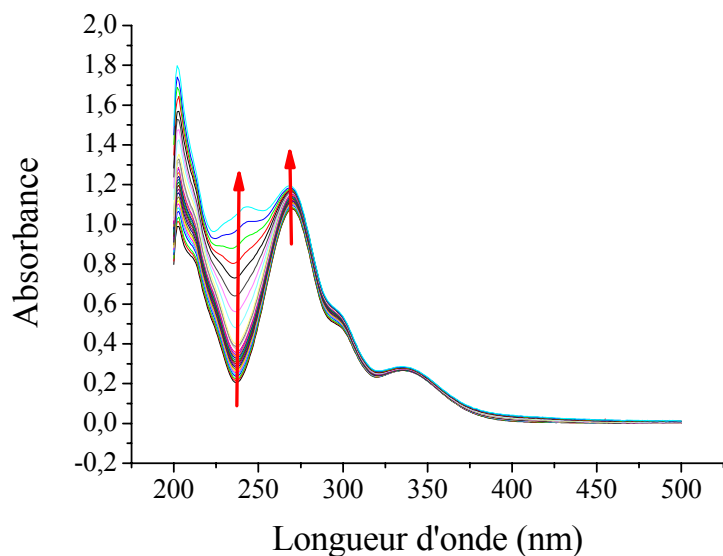


Figure 25 : Evolution des spectres UV-visible de la 5HF $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans le MeOH avec ajout de Pb(II) $6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ du rapport $R = 0$ à 5.

Figure 26 : Méthodes des rapports molaires appliquées aux spectres UV-visible de la complexation de Pb(II) par la 5HF aux maxima en longueur d'onde de la 5HF (270nm) et de sa forme complexée (243nm).

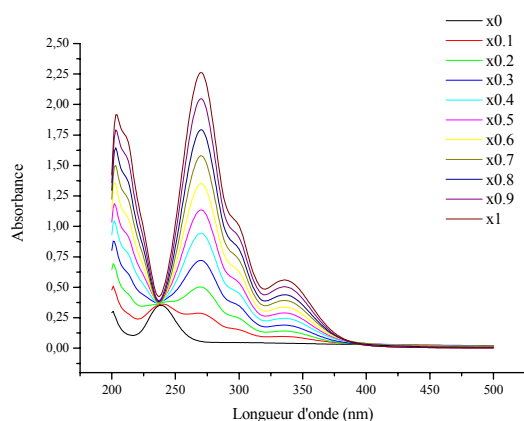
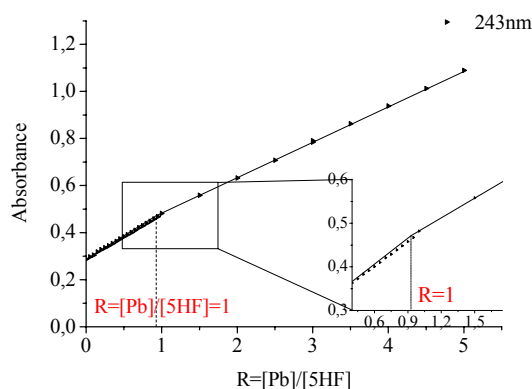
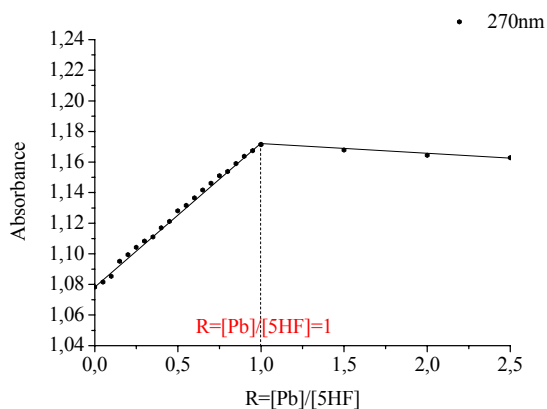


Figure 27 : Spectres UV-visible du mélange 5HF/Pb dans le MeOH en fonction de la fraction molaire de 5HF ; la somme des concentrations de la 5HF et de Pb étant constante $C(5HF+Pb)=4.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

La méthode des variations continues quant à elle, ne permet pas d'aboutir à un résultat concluant quant à la détermination de la stoechiométrie (Figure 27) étant donné les trop

faibles changements spectraux intervenus au cours de la complexation et l'absence d'une bande caractéristique du complexe formé.

Le traitement des spectres avec le programme de Specfit a permis de déterminer la constante de stabilité de ce complexe : $\log\beta_{1:1} = 4,51 \pm 3.10^{-2}$. Ainsi, la comparaison des constantes de stabilité dans le méthanol indique que le complexe obtenu avec la molécule de 5HF est légèrement moins stable que celui formé avec la 3HF.

A pH=6 dans un solvant mixte méthanol-eau

Dans le cas de la 5HF contrairement à celui de la 3HF, la complexation de Pb(II) par la flavone ne provoque pas les mêmes effets sur le spectre UV-visible du ligand libre dans le méthanol pur et dans le solvant mixte à pH=6 (Figure 28).

Dans le cas présent, la bande à 270 nm relative à la 5HF diminue en intensité et subit un léger effet hypsochrome (non constaté dans le méthanol) ; de même il n'y a pas de nouvelle bande qui apparaît lorsque l'on ajoute Pb(II).

L'analyse par la méthode des rapports molaires révèle l'existence de complexes de stoechiométrie 1:10 et 1:2 (Figure 29), c'est-à-dire un complexe de plus haute stoechiométrie que dans le méthanol (1:1).

Le modèle d'analyse de données a permis d'attribuer au complexe une valeur de constante de formation de $\log\beta_{1:2} = 7,12 \pm 0,18$.

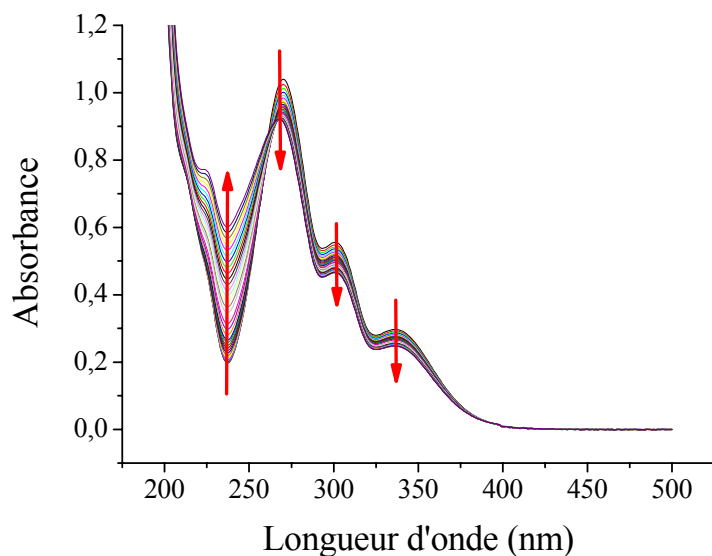
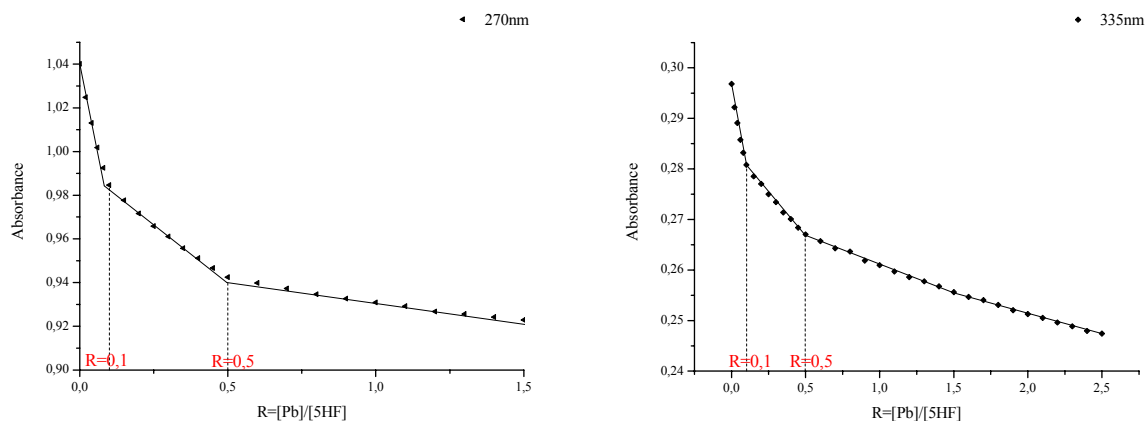


Figure 28 : Evolution des spectres UV-visible de la 5HF $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans un solvant mixte 50% V/V MeOH/H₂O par ajout de Pb(II) $6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ du rapport R = 0 à 2,5.

Figure 29 : Méthodes des rapports molaires appliquées aux spectres UV-visible de la complexation de Pb(II) par la 5HF aux maxima en longueur d'onde de la 5HF (270nm) et de sa forme complexée Pb:5HF (335 nm).



3) La 3',4'-dihydroxyflavone

Dans le méthanol

Lors de la complexation de Pb(II) par la 3'4'diHF dans le méthanol, les spectres représentés sur la Figure 30 ont été enregistrés en ajoutant des quantités croissantes de chlorure de plomb.

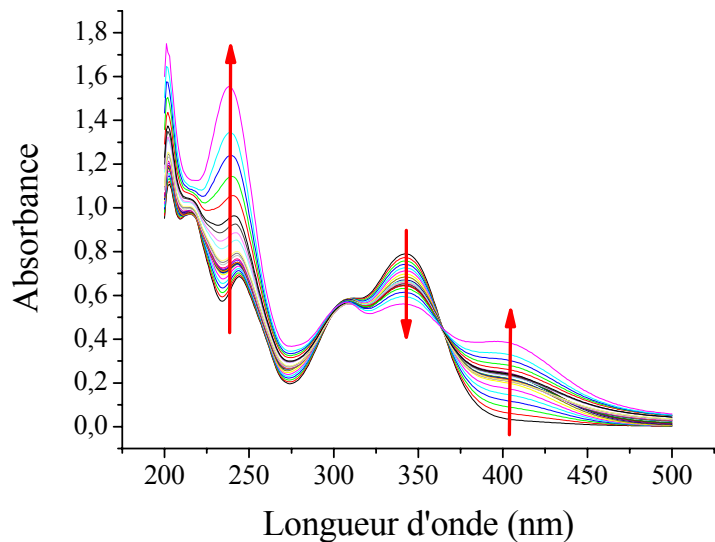


Figure 30 : Evolution des spectres UV-visible de la 3'4'diHF 6.10^{-5} mol.L⁻¹ dans MeOH par ajout de Pb(II) 6.10^{-4} mol.L⁻¹ du rapport R = 0 à 5.

Figure 31 : Méthodes des rapports molaires appliquées aux spectres UV-visible de la complexation de Pb(II) par la 3'4'diHF aux maxima d'absorption de la 3'4'diHF (342 nm) et de ses formes complexées (405nm).

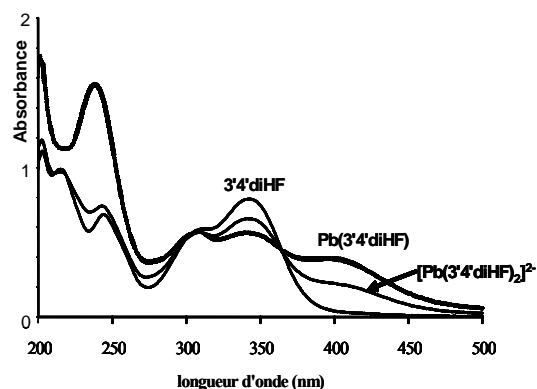
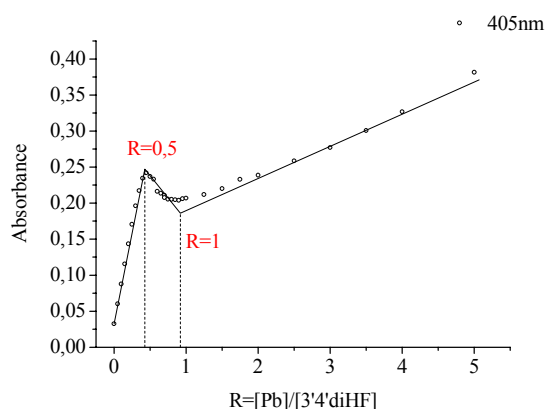
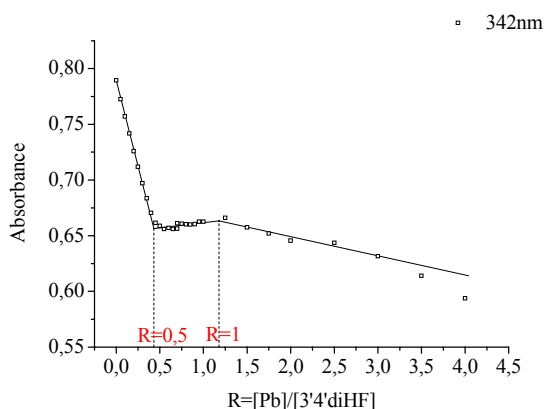


Figure 32 : Spectres UV-Visible de la flavone libre et des deux complexes de la 3'4'diHF extraits en utilisant la méthode EFA.

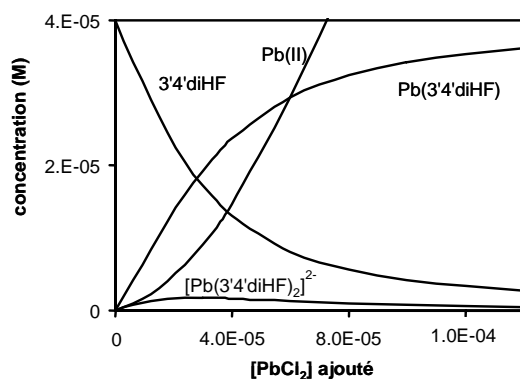


Figure 33 : Courbes de distribution des concentrations des différentes espèces au cours du dosage de complexation de Pb(II) par la 3'4'diHF dans le méthanol.

Le premier spectre obtenu en l'absence de Pb(II) est caractéristique du ligand libre dans la solution de méthanol et présente des bandes à 342, 306, 244 et à 213 nm. L'addition d'une quantité croissante de Pb(II) à la solution de 3'4'diHF induit une diminution de l'intensité de la bande à 343 nm relative au flavonoïde libre et l'apparition d'une nouvelle bande située à 399 nm dont l'intensité augmente avec la quantité de sel métallique. La série de spectres ne présente pas de point isobestique clairement défini, ce qui signifie que plusieurs espèces coexistent en solution. Les résultats de la méthode des rapports molaires à 342 et à 405nm (Figure 31) présentent deux cassures de pente pour des valeurs R égales à 0.5 et 1, indiquant la formation de deux complexes de stoechiométrie 1:2 et 1:1.

À partir des spectres d'UV-visible, la détermination du nombre d'espèces absorbantes a été estimée par la méthode EFA. Trois composants distincts se sont avérés correspondre à la 3'4'diHF libre et à ses deux formes complexées $[\text{Pb}(\text{3'4'diHF})_2]^{2-}$ et $\text{Pb}(\text{3'4'diHF})$. Les spectres d'absorption électroniques de ces différentes espèces pures sont présentés Figure 32.

Les spectres des deux espèces complexées sont très proches notamment dans le domaine des grandes longueurs d'onde, cependant, une bande intense située à 237 nm caractérise $\text{Pb}(\text{3'4'diHF})$. À partir de ces spectres d'espèces pures, les constantes de stabilité ont été estimées et le meilleur modèle donne respectivement : $\log\beta_{1:2} = 8,82 \pm 0,15$ et $\log\beta_{1:2} = 5,09 \pm 0,10$ pour $[\text{Pb}(\text{3'4'diHF})_2]^{2-}$ et $\text{Pb}(\text{3'4'diHF})$. Les variations de concentration des différentes espèces en fonction de la quantité de plomb(II) ajoutée sont illustrées sur la Figure 33.

Les courbes montrent que les deux complexes sont formés simultanément dès le début de l'addition de Pb(II), cependant l'espèce $\text{Pb}(\text{3'4'diHF})$ est prédominante. Si la formation du complexe 1:2 est minoritaire, elle est suffisante pour avoir un rôle significatif dans le mécanisme de complexation du Pb(II) par la 3'4'diHF, en particulier en présence d'une faible quantité de plomb.

Dans un solvant mixte, à pH=6

Le spectre de la 3',4'-dihydroxyflavone présente la bande I à 341 nm avec un épaulement vers 310 et la bande II à 243 nm. En milieu mixte à pH=6, l'ajout d'une solution

de plomb (II) affecte peu la bande I tandis que l'intensité des bandes dans la zone 200-250 nm augmente (Figure 34). De plus aucune nouvelle bande n'apparaît.

La forme complexée entre la 3'4'diHF et Pb(II) est constitué d'un ion Pb(II) coordonné à deux de 3'4'diHF (Figure 35) identique à celle de la complexation dans le méthanol. La valeur associée de constante de stabilité du complexe vaut : $\log\beta_{1:2} = 7,98 \pm 0,20$.

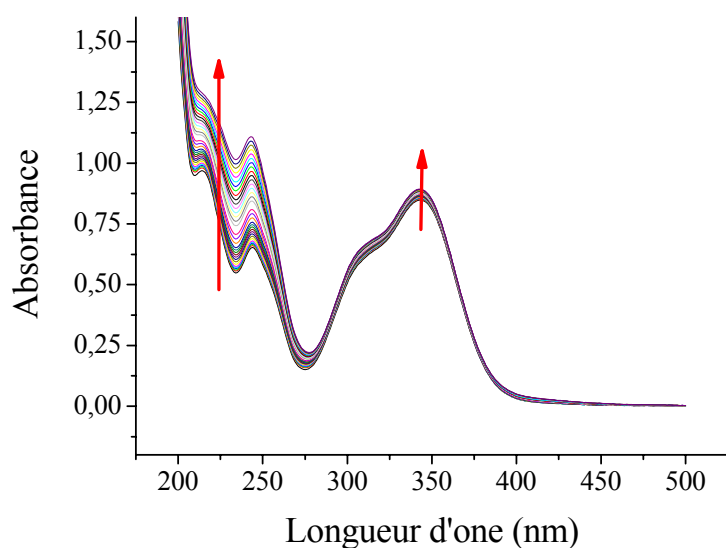
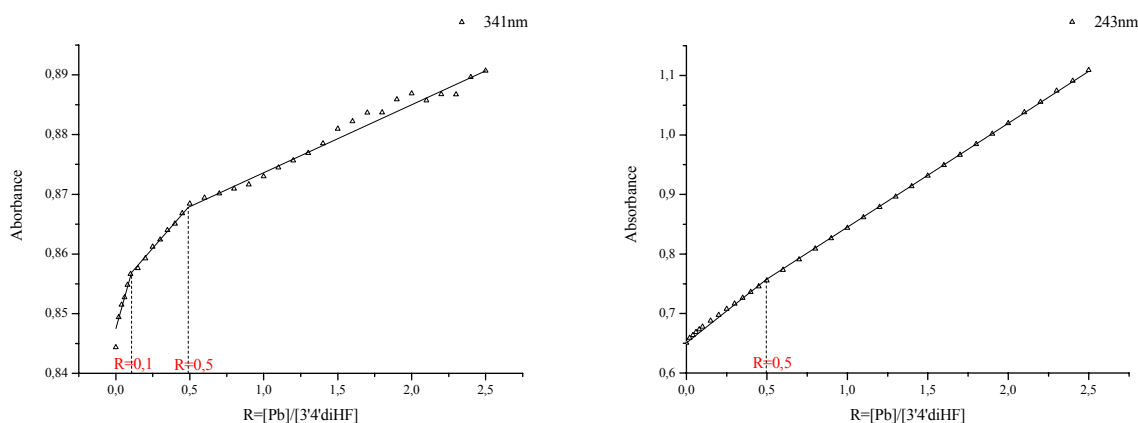


Figure 34 : Evolution des spectres UV-visible de la 3'4'diHF $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans un solvant mixte MeOH/H₂O 50% V/V par ajout de Pb(II) $6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ du rapport R=0 à 2,5.

Figure 35 : Méthodes des rapports molaires appliquées aux spectres UV-visible de la complexation de Pb(II) par la 3'4'diHF aux maxima d'absorption de la 3'4'diHF (341 nm) et de ses formes complexées (243nm).



Si les formules des complexes sont identiques dans les 2 solvants, le faisceau de spectres UV-visible est très différent. La bande de la forme complexée dans le méthanol à 410 nm est peu visible dans le spectre du chélate à pH=6. Ce fait s'explique non pas parce que les

spectres de $[\text{Pb}(3'4'\text{diHF})_2]^{2-}_{\text{MeOH}}$ et $[\text{Pb}(3'4'\text{diHF})_2]^{2-}_{\text{MeOH-H}_2\text{O}}$ sont différents mais parce que le fort déplacement de la bande I est provoquée de façon majoritaire par la formation du chélate $[\text{Pb}(3'4'\text{diHF})]^{0}_{\text{MeOH}}$ non mis en évidence à pH=6.

V. Complexation du zinc (II)

Dans cette dernière partie concernant la complexation de Zn(II), pour des raisons de concision, seuls les spectres UV-visible illustrant l'évolution du processus de complexation lors de dosage sont présentés.

1) La 3-hydroxyflavone

L'ajout d'une solution de ZnCl_2 à une solution de 3HF dans le méthanol et dans un solvant mixte eau/méthanol à pH=6 engendre des changements du spectre de la flavone (Figure 36).

Dans le méthanol

On observe une diminution de la bande I relative à la 3HF libre à 344 nm et l'apparition simultanée d'une bande à 408nm. L'absorption dans la zone inférieure à 275 nm augmente. En traçant les courbes des rapports molaires à 344 nm (λ_{max} de la 3HF) et à 408 nm (λ_{max} du complexe), des espèces de stoechiométrie 1:3 et 1:1 sont mis en évidence cependant la forme $[\text{Zn}(3\text{HF})_3]^-$ est présente en trop faible quantité pour pouvoir extraire le spectre UV-visible. D'ailleurs les points isobestiques à 286 nm et à 369 nm nous révèlent que la 3HF est en équilibre avec un seul complexe ($\text{Zn}(3\text{HF})^+$). A l'aide des techniques chimométriques, différents modèles ont été testés avec les formes complexées découvertes auparavant. Ainsi, seul le complexe 1:1 a été extrait avec une valeur de constante de formation $\log\beta_{1:1} = 6,60 \pm 0,10$.

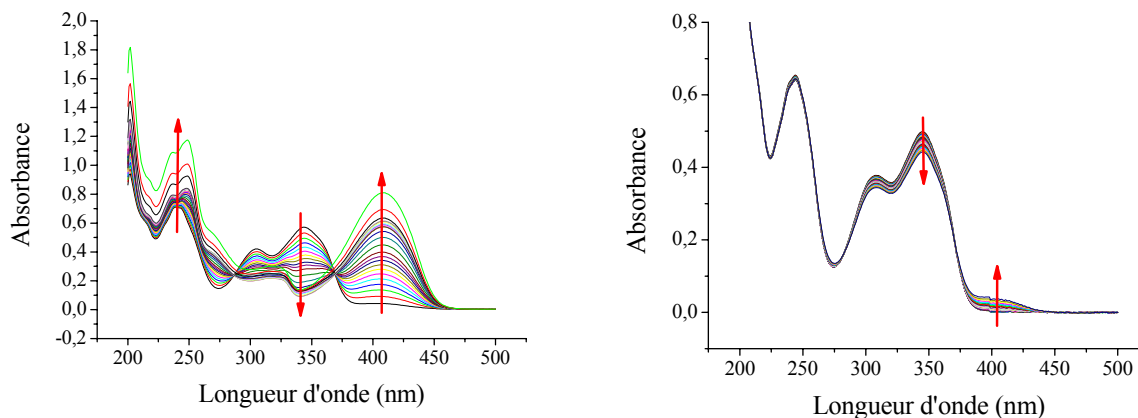


Figure 36 : Evolution des spectres UV-visible de la 3HF $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ par ajout de Zn(II) $6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (a) dans MeOH du rapport $R = 0$ à 5. (b) dans un solvant mixte 50 % V/V MeOH/H₂O du rapport $R = 0$ à 2,5.

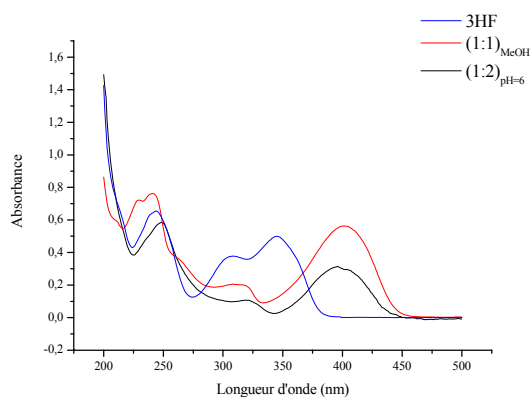


Figure 37 : Spectre expérimental de la 3HF, et spectres extraits par traitement numérique du complexe $[\text{Zn}(3\text{HF})]^+$ dans le méthanol et $\text{Zn}(3\text{HF})_2$ en milieu mixte à $\text{pH}=6$.

Le pouvoir chélateur du site α -hydroxy-carbonyle vis-à-vis de Zn(II) est donc plus important que vis-à-vis de Pb(II) ($\log \beta_{3\text{HF-Pb}} = 4.97$). Par ailleurs, l'aluminium (III) donne avec la 3HF un complexe 1:2.

A pH=6 dans un solvant mixte méthanol-eau

Les modifications du spectre sont nettement moins visibles (Figure 36). Nous observons comme pour la complexation dans le méthanol, une diminution de la bande I à 344 nm et l'apparition d'une nouvelle bande à 408 nm. A l'opposé, nous ne remarquons aucun changement dans la zone UV du spectre ($< 270 \text{ nm}$). Les stoechiométries relevées à 344 et 408 nm sont 1:2 et 1:1. Toutefois la formation de complexe étant réduite dans ce milieu, le premier complexe $\text{Zn}(3\text{HF})_2$ est prépondérant. Le spectre de celui-ci est présenté Figure 37.

Au vu des courbes de concentrations des espèces en fonction de l'ajout de métal (non présentés), on observe que même si à pH=6 le complexe 3HF-Zn est de plus haute stoechiométrie que celui dans le méthanol, la flavone se complexe mieux en milieu méthanoïque car une plus grande quantité de complexe est formée pour un rapport molaire donné. De plus, les espèces complexées dans les 2 milieux ont des spectres similaires étant donné que les transitions électroniques concernées n'affectent pas le métal. La valeur de $\log \beta$ $\text{Zn}(\text{3HF})_2$ vaut dans ce cas $7,31 \pm 0,07$.

Ici, le classement de l'affinité des métaux pour le groupe α -hydroxy-carbonyle est différent : **Al(III) > Pb(II) > Zn(II)**.

2) La 5-hydroxyflavone

Dans la complexation du zinc (II), le comportement de la 5HF est différent en milieu MeOH et en milieu mixte à pH=6.

Dans le méthanol

La Figure 38(a) illustre l'apparition d'une nouvelle bande à 402 nm alors que l'intensité de la bande I (337 nm) diminue avec l'addition de Zn(II). L'intensité de la zone dans les basses longueurs d'onde (< 300 nm) augmente légèrement effaçant l'épaule à 275 nm.

Les espèces mises en évidence par la méthode des rapports molaires sont de stoechiométrie 1:3 $[\text{Zn}(\text{5HF})_3]^-$ et 1:1 $[\text{Zn}(\text{5HF})]^+$. Toutefois la présence de points isobestiques à 251 et 360 nm implique que seul un complexe est en équilibre avec la forme 5HF. L'analyse par chimométrie met en évidence que le spectre du complexe $[\text{Zn}(\text{5HF})]^+$ est déterminant pour le bon ajustement entre le modèle théorique et les spectres expérimentaux ; à l'opposé, le spectre de l'espèce $[\text{Zn}(\text{5HF})_3]^-$ est moins capital car le complexe n'est présent qu'en début de réaction et dans des quantités 1000 fois inférieures aux autres composés et des tests ont montré que quelque soit le spectre choisi pour cette espèce le modèle converge avec de bonnes valeurs de déviation.

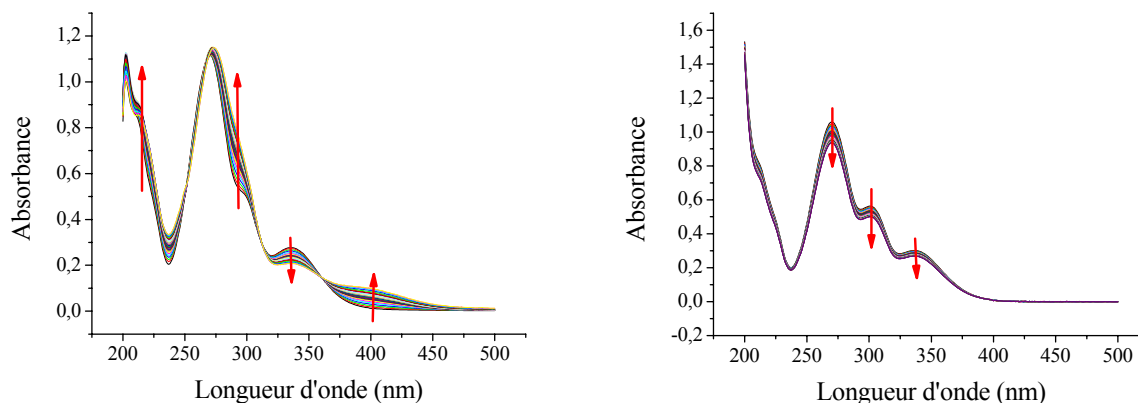


Figure 38 : Evolution des spectres UV de la 5HF $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ par ajout de Zn (II) $6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (a) dans MeOH du rapport $R = 0$ à 5. (b) dans un solvant mixte 50 % V/V MeOH/H₂O du rapport $R = 0$ à 2,5.

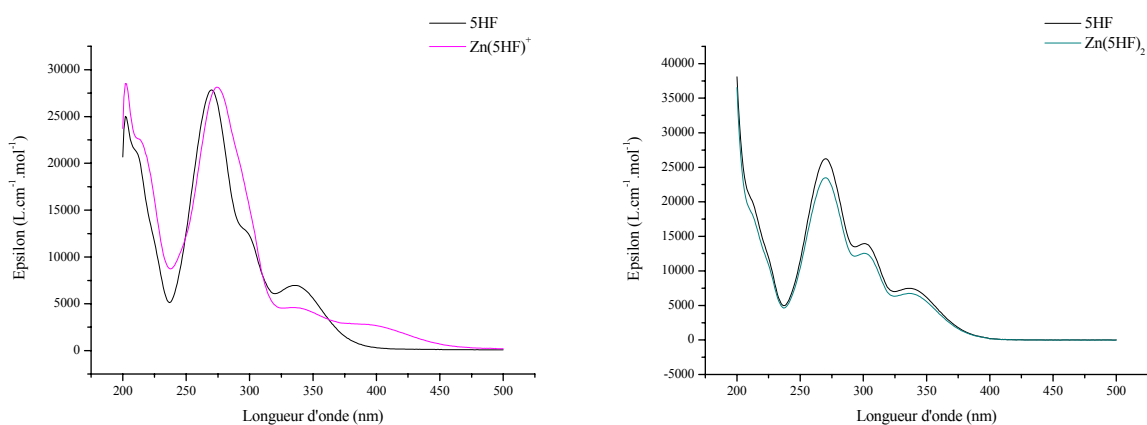


Figure 39 : Spectre expérimental de la 5HF, et spectres extraits par traitement numérique du complexe $[Zn(5HF)]^+$ dans le méthanol et $Zn(5HF)_2$ dans le solvant mixte à $pH=6$.

C'est la raison pour laquelle des points isobestiques sont observés et que l'on peut extraire correctement qu'un seul spectre de complexe ($[Zn(3HF)]^+$ cf. Figure 39) avec une valeur de $\log\beta$ valant $5,33 \pm 0,07$. Cette valeur est plus faible que celle obtenue dans le cas de la 3HF dans le même solvant indiquant que la fonction β -hydroxy-carbonyle a un pouvoir chélatant vis à vis du zinc plus faible que la fonction α -hydroxy-carbonyle.

Si on réalise le classement de l'affinité des métaux pour le groupe β -hydroxy-carbonyle dans le méthanol, nous avons dans l'ordre : **Al(III) > Zn(II) > Pb(II)**. Cet ordre est le même que celui du groupement α -hydroxy-carbonyle de la 3HF : le comportement dans le méthanol des deux flavones est proche pour les ions métalliques considérés.

Dans un solvant mixte, à pH = 6

Dans la complexation en milieu mixte, le spectre de la 5HF n'a pas du tout les mêmes modifications qu'en milieu méthanoïque (Figure 38(b)). Aucune nouvelle bande n'apparaît et l'intensité des trois principales bandes à 270, 300 et 338 nm de la flavone libre diminuent. A l'aide de la méthode des rapports molaires, on met en évidence un complexe de stoechiométrie 1:2 $Zn(5HF)_2$. L'extraction du spectre du complexe par la méthode EFA nous donne le spectre présenté Figure 39 : celui-ci ne diffère qu'au niveau des intensités des bandes d'absorption et pas au niveau des positions des transitions impliquant que les orbitales moléculaires concernées par celles-ci ne mettent pas en jeu l'atome de zinc. La valeur de la constante de formation ainsi obtenue est $\log\beta_{1,2} = 7,75 \pm 0,02$.

Ici, le classement de l'affinité des métaux pour le groupe β -hydroxy-carbonyle dans le solvant mixte MeOH-H₂O 50% v/v est le même que l'ordre établi dans le méthanol : **Al(III) > Zn(II) > Pb(II)**. Cependant si la classification est la même, les stoechiométries des complexes sont supérieures à pH=6 en présence d'eau.

3) La 3',4'-dihydroxyflavone

Le comportement de la 3'4'diHF est similaire à celui de la 5HF. La Figure 40 illustre les modifications de spectre de l'hydroxyflavone au cours de la complexation avec le zinc (II) dans le méthanol et en milieu mixte à pH=6.

Dans le méthanol

L'intensité de la bande I diminue en faveur de l'apparition d'une bande autour de 406 nm caractéristique du complexe formé entre le zinc et la 3'4'diHF. La position des autres bandes est peu modifiée par l'ajout de Zn(II). La méthode des rapports molaires met en évidence deux complexes de stoechiométrie 1:3 $[Zn(3,4diHF)_3]^{4-}$ et 1:1 $Zn(3'4'diHF)$.

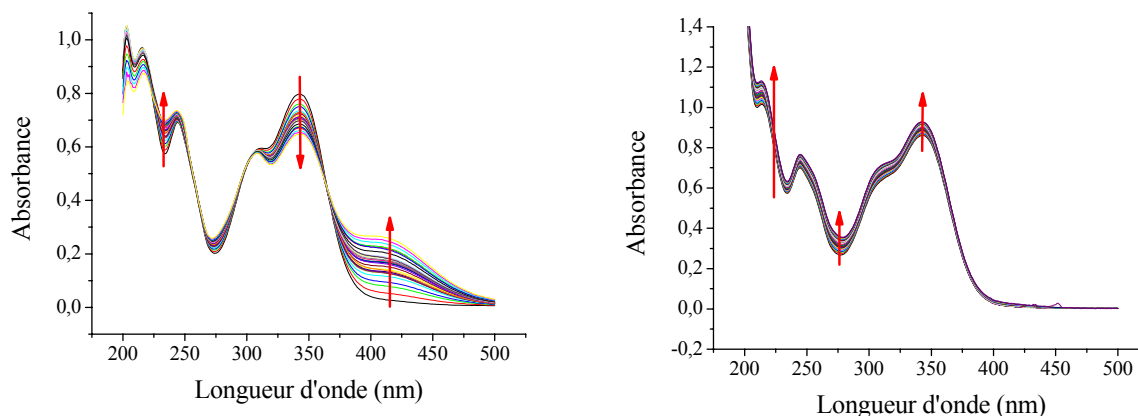


Figure 40 : Evolution des spectres UV de la 3'4'diHF $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ par ajout de Zn (II) $6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (a) dans MeOH du rapport $R = 0$ à 5. (b) dans un solvant mixte 50 % V/V MeOH/H₂O du rapport $R = t 0$ à 2,5.

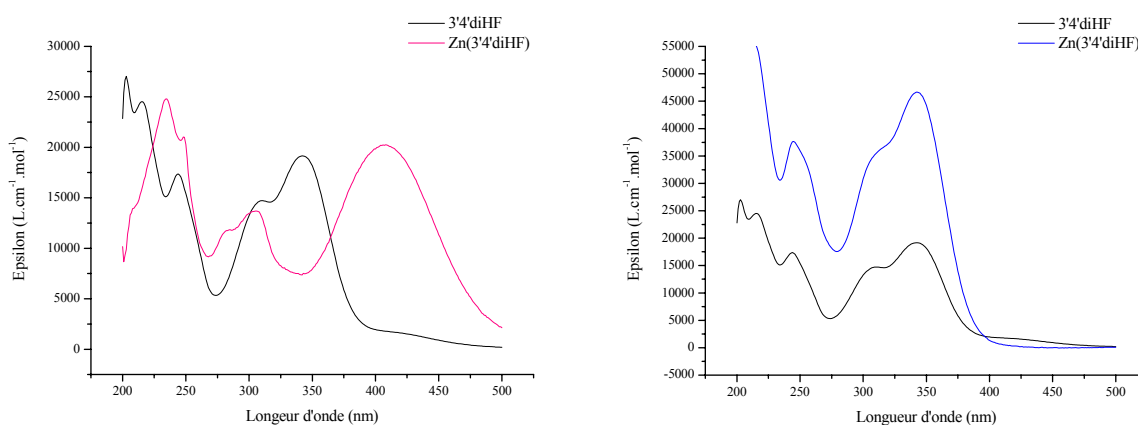


Figure 41 : Spectre expérimental de la 3'4'diHF, et spectres extraits par traitement numérique du complexe Zn(3'4'diHF) dans le méthanol et $[Zn(3'4'diHF)_2]^{2+}$ à pH=6.

Des traitements numériques ont permis de montrer que le premier complexe est en trop faible quantité et par conséquent le spectre de cette espèce ne peut pas être extrait. Le spectre du complexe Zn(3'4'diHF), est présenté sur la Figure 41 et la valeur de la constante de formation de cette espèce est $\log \beta_{1:2} = 5,19 \pm 0,09$.

En ce qui concerne l'affinité des 3 groupements chélateurs pour le zinc (II), le site α -hydroxy-carbonyle présente la plus grande facilité à piéger Zn(II) dans le méthanol, tandis que les groupes β -hydroxy-carbonyle et catéchol ont des pouvoirs proches ($\log\beta = 5,33$ et $5,19$ respectivement). Pour le catéchol, la classification de l'affinité des métaux est la suivante : **Pb(II) > Al(III) > Zn(II)**.

A pH=6 en milieu mixte

Dans ce milieu, la complexation de la 3'4'diHF par le zinc (II) est une fois de plus très différente du point de vue spectral à celle dans le méthanol (Figure 40). Là où les formes complexées ne présentent pas de bandes caractéristiques : l'ajout de Zn(II) à la solution de flavone entraîne une légère augmentation de l'intensité sur toute la zone inférieure à 375nm. La stoechiométrie trouvée pour le complexe est 1:2 soit une espèce $[Zn(3'4'diHF)_2]^{2-}$. Le spectre du complexe obtenu par des méthodes numériques (Figure 41) n'est pas très différent de celui de la 3'4'diHF. La position des transitions est quasiment la même dans les grandes longueurs d'onde et subit un faible effet bathochrome dans la zone UV. La constante de formation obtenue a pour valeur $\log\beta_{1:2} = 10,54 \pm 0,45$.

Ici, le classement de l'affinité des métaux pour le groupe catéchol dans le solvant mixte MeOH-H₂O 50% v/v est le suivant : **Zn(II) > Al(III) > Pb(II)**. Le zinc présente maintenant la plus grande capacité à être complexée par la 3'4'diHF alors qu'il avait la plus faible dans MeOH. Des considérations électroniques concernant l'ion Zn²⁺ doivent être à l'origine du fait que seul la complexation avec le zinc soit perturbée par le changement de solvant. L'ordre de l'affinité des 3 sites pour le zinc dans ce milieu est : **catéchol > β-hydroxy-carbonyle > α-hydroxy-carbonyle**. La différence marquante ici est que le groupe α-hydroxy-carbonyle se retrouve en dernière position, là où dans le méthanol il était le plus complexant : la présence d'eau doit déstabiliser l'ion flavylum, intermédiaire reconnu dans le mécanisme de chélation de la 3HF.

VI. Conclusion

L'étude de la complexation des flavonoïdes mono-sites a permis de mettre en évidence de nombreux résultats : dans un premier temps les stoechiométries et les constantes de stabilité ont été trouvées pour la chélation des trois hydroxyflavones avec les trois ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II) et dans deux milieux différents (MeOH et MeOH-H₂O à pH=6) (Tableau 2 page suivante).

Quel que soit le ligand, la stoechiométrie du complexe formé dans le méthanol pur est inférieure à celle obtenue dans le mélange eau/méthanol à pH = 6. La complexation de l'ion métallique s'accompagne de la déprotonation des fonctions hydroxyles du ligand, et par conséquent une augmentation de pH facilite cette déprotonation et conduit à des complexes de stoechiométrie plus élevée. Cette constatation a été reportée à de nombreuses reprises pour des ligands analogues, qui présentent notamment un groupement catéchol (44). Dans notre cas, le pH apparent de la solution de méthanol pur est inférieur à 6, et la solution de méthanol pur est plus "acide" que la solution mixte de pH = 6, ce qui explique la différence de stoechiométrie des complexes formés dans ces deux milieux.

Quel que soit le ligand, pour une quantité donnée d'ion métallique ajoutée, le pourcentage de ligand libre est toujours supérieur dans le solvant mixte que dans le méthanol pur. La complexation de l'ion métallique est donc plus importante dans le méthanol pur que dans le solvant mixte à pH = 6. Cela se vérifie pour des complexes ayant des stoechiométries identiques dans les deux milieux, la constante de formation du complexe dans le méthanol pur est toujours supérieure à celle calculée dans le solvant mixte. La présence d'eau a pour conséquence d'inhiber partiellement la complexation du cation métallique. L'hydratation du cation et/ou du ligand libre diminue le pouvoir complexant des fonctions étudiées. D'ailleurs des expériences complémentaires, à pH et rapport molaire constants, ont montrées qu'une augmentation du pourcentage d'eau (de 0 à 50%) dans la solution diminuait de manière sensible la quantité de complexes formés (48).

Dans un solvant donné, le pouvoir de complexation des différents sites chélateurs vis-à-vis d'un ion métallique peut être comparé. Plus la stoechiométrie des complexes obtenus est élevée, plus la fonction est complexante. A stoechiométrie égale, le complexe qui présente la

constante de formation la plus élevée comporte le site chélateur ayant la plus grande affinité pour l'ion métallique.

Ces données permettent de réaliser une classification des trois sites de chélation (α -hydroxy-carbonyle de la 3-hydroxyflavone, β -hydroxy-carbonyle de la 5-hydroxyflavone et catéchol de la 3',4'-dihydroxyflavone) selon leur pouvoir de complexation et pour chacun des ions métalliques dans un milieu déterminé. Ainsi il est possible dans les différents milieux de proposer le classement suivant:

MeOH : Al : α -hydroxy-carbonyle > catéchol > β -hydroxy-carbonyle

Pb : catéchol > α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle

Zn : α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle \geq catéchol

MeOH-H₂O : Al : α -hydroxy-carbonyle > catéchol > β -hydroxy-carbonyle

Pb : catéchol > α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle

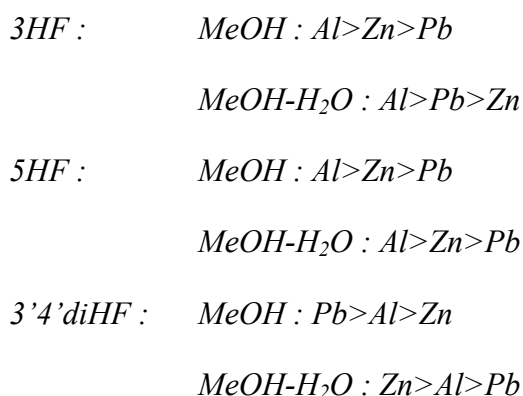
Zn : catéchol > β -hydroxy-carbonyle > α -hydroxy-carbonyle

Pour l'aluminium(III) et le plomb(II), nous avons conservation du classement des fonctions à l'opposé du cas du zinc(II) où nous avons pour un milieu exactement l'inverse de l'ordre établi pour l'autre solvant. Nous mettons en évidence ici que le solvant influe beaucoup sur l'ion Zn(II) et moins sur Al(III) et Pb(II).

Aluminium (III)	λ_{\max} (nm)	MeOH			MeOH-H₂O			
		M:L	λ_{\max} (nm)	log(β)	M:L	λ_{\max} (nm)	log(β)	
3HF 5HF 3'4'diHF	344	1:3			1:3			
		1:2	402	12,3	1:2	404	9,91	
	1:1	397	6,5	1:1	440	5,17		
	1:2			1:2	404	8,37		
	1:1	384	6,7	1:2	390	9,24		
	1:1			1:1	394	4,85		
Plomb (II)	3HF	344	1:2	405	7,73			
	5HF	270*	1:1	405	4,97	1:2	267*	7,12
	3'4'diHF	342	1:1	268*	4,51	1:2	-	7,98
			1:2	399	8,82			
			1:1		5,09			
Zinc (II)	3HF	344	1:3			1:2	404	7.31
			1:1	408	6.60	1:1		
	5HF	335	1:3			1:2	-	7.75
			1:1	402	5.33			
	3'4'diHF	342	1:3			1:2	-	10.54
			1:1	406	5.19			

Tableau 2 : Stoechiométries et constantes de stabilité de la chélation des trois hydroxyflavones avec Al(III), Pb(II) et Zn(II), dans deux milieux (MeOH et MeOH-H₂O à pH = 6). Les λ_{\max} indiquées sont celles de la bande I des flavonoïdes sauf dans le cas de la complexation de Pb(II) par la 5HF où ce sont celles de la bande II étant donné leur plus forte implication dans les changements spectraux observés (valeurs marquées de *). Les cases grisées désignent la molécule la plus complexante pour la complexation d'un ion métallique donné dans un solvant fixé.

Pour chaque molécule, il est possible de classer les ions métalliques en fonction de leur affinité pour la fonction chélatante:



On observe évidemment que le comportement des trois fonctions étudiées est très différent selon l'ion métallique impliqué dans le processus de complexation.

Dans le méthanol : en ce qui concerne les systèmes Al(III) ou Zn(II)-hydroxyflavones, c'est le site α -hydroxy-carbonyle qui présente la plus grande affinité pour le métal et donne des complexes de stoechiométrie plus élevée. Le changement du cation par Pb(II) dans le système provoque une inversion du pouvoir de chélation des fonctions catéchol et α -hydroxy-carbonyle.

Dans le solvant mixte : l'influence du métal n'est pas la même en milieu MeOH-H₂O que dans le méthanol pur. Il est évident que les effets de solvant et du cation métallique sont étroitement corrélés. Ainsi on retrouve dans ce solvant les mêmes classements pour Al(III) et Pb(II), ions qui ne semblent pas être perturbés par le changement de conditions ; en revanche Zn(II) qui l'est beaucoup, a un classement où le catéchol devient le site le plus complexant.

L'ensemble de ces résultats permet de situer à la fois le rôle du solvant et d'avoir le classement des trois sites de fixation des flavones selon leur capacité. De plus ces données constituent un élément de comparaison pour la suite (Chapitre IV) où nous verrons alors l'effet de mise en compétition des trois sites au sein d'une même structure : la quercétine.

VII. Bibliographie

1. Goodwin, T. W. & Editor (1988) *Plant Pigments*.
2. Haslam, E. (1989) *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*.
3. Glombitza, K. W. & Gerstberger, G. (1985) *Phytochemistry (Elsevier)* **24**, 543-551.
4. Porter, L. J. (1989) *Methods in Plant Biochemistry* **1**, 389-419.
5. Spencer, C. M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S. H., Goulding, P. N., Magnolato, D., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1988) *Phytochemistry* **27**, 2397-2409.
6. Stoeckel, C., Dangles, O., & Brouillard, R. (1995) *Colloques - Institut National de la Recherche Agronomique* **69**, 191-192.
7. Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Teissedre, P. L. (1995) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 890-894.
8. Leake, D. S. (2001) *Nutrition (New York, NY, United States)* **17**, 63-66.
9. Grisebach, H. (1982) *Anthocyanins Food Colors*, 69-92.
10. Heller, W. & Forkmann, G. (1994) *Flavonoids*, 499-535.
11. Terahara, N., Oda, M., Matsui, T., Osajima, Y., Saito, N., Toki, K., & Honda, T. (1996) *Journal of Natural Products* **59**, 139-144.
12. Harborne, J. B. & Williams, C. A. (2000) *Phytochemistry* **55**, 481-504.
13. Middleton, E., Jr. (1996) *International Journal of Pharmacognosy* **34**, 344-348.
14. Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., & Aromaa, A. (2002) *American Journal of Clinical Nutrition* **76**, 560-568.
15. Li, Y., Fang, H., & Xu, W. (2007) *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **7**, 663-678.
16. Nowakowska, Z. (2007) *European Journal of Medicinal Chemistry* **42**, 125-137.
17. Pegg, R. B., Amarowicz, R., Naczki, M., & Shahidi, F. (2007) *ACS Symposium Series* **956**, 140-158.
18. D'Mello, J. P. F. & Editor (1997) *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*.
19. Goto, T., Tamura, H., Kawai, T., Hoshino, T., Harada, N., & Kondo, T. (1986) *Annals*

- of the New York Academy of Sciences* **471**, 155-173.
20. Shibata, K., Shibata, Y., & Kasiwagi, I. (1919) *Journal of the American Chemical Society* **41**, 208-220.
 21. Hayashi, K., Abe, Y., & Mitsui, S. (1958) *Proc. Japan Acad.* **34**, 373-378.
 22. Bayer, E. (1958) *Chemische Berichte* **91**, 1115-1122.
 23. Younes, M. & Siegers, C. P. (1981) *Planta Medica* **43**, 240-244.
 24. Ribereau-Gayon, P. (1968) *The Phenolic Compounds of Plants*.
 25. Vrielynck, L., Cornard, J. P., & Merlin, J. C. (1997) *Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends, [European Conference on Spectroscopy of Biological Molecules], 7th, Madrid, 1997*, 561-562.
 26. Geissman, T. A. & Jurd, L. (1955) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **56**, 259-263.
 27. Lebreton, P. & Chopin, J. (1963) *Spectrochimica Acta* **19**, 2099-2112.
 28. Looker, J. H., Hanneman, W. W., Kagal, S. A., Dappen, J. I., & Edman, J. R. (1966) *Journal of Heterocyclic Chemistry* **3**, 55-60.
 29. Le Nest, G., Caille, O., Woudstra, M., Roche, S., Guerlesquin, F., & Lexa, D. (2004) *Inorganica Chimica Acta* **357**, 775-784.
 30. Jungbluth, G., Ruhling, I., & Ternes, W. (2000) *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **9**, 1946-1952.
 31. de Souza, R. F. V. & De Giovanni, W. F. (2005) *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **61**, 1985-1990.
 32. Zhou, J., Wang, L., Wang, J., & Tang, N. (2001) *Transition Metal Chemistry* **26**, 57-63.
 33. Calabro, M. L., Tommasini, S., Donato, P., Raneri, D., Stancanelli, R., Ficarra, P., Ficarra, R., Costa, C., Catania, S., Rustichelli, C., *et al.* (2004) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **35**, 365-377.
 34. Le Nest, G., Caille, O., Woudstra, M., Roche, S., Burlat, B., Belle, V., Guigliarelli, B., & Lexa, D. (2004) *Inorganica Chimica Acta* **357**, 2027-2037.
 35. Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A. E. M. F., & Rietjens, I. M. C. M. (2001) *Free Radical Biology & Medicine* **31**, 869-881.
 36. Boudet, A.-C. (1999) (USTL, Lille), p. 287.
 37. Cornard, J.-P. & Merlin, J.-C. (2003) *Journal of Molecular Structure* **651-653**, 381-

- 387.
38. Cornard, J.-P. & Merlin, J.-C. (2002) *Journal of Inorganic Biochemistry* **92**, 19-27.
39. Cornard, J. P. & Merlin, J. C. (2002) *Polyhedron* **21**, 2801-2810.
40. Cornard, J.-P. & Merlin, J.-C. (2001) *Journal of Molecular Structure* **569**, 129-138.
41. Cornard, J.-P., Boudet, A.-C., & Merlin, J.-C. (2001) *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **57**, 591-602.
42. Boudet, A.-C., Cornard, J.-P., & Merlin, J.-C. (2000) *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **56**, 829-839.
43. Cornard, J.-P., Boudet, A.-C., & Merlin, J.-C. (1999) *Journal of Molecular Structure* **508**, 37-49.
44. Jurd, L. & Geissman, T. A. (1956) *Journal of Organic Chemistry* **21**, 1395-1401.
45. Hyperquad Simulation and Speciation (2000) (Protonic Software).
46. Markham, K. R. & Mabry, T. J. (1968) *Phytochemistry (Elsevier)* **7**, 1197-1200.
47. Porter, L. J. & Markham, K. R. (1970) *Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic* **2**, 344-349.
48. Rasmiwetti "Etude par spectroscopie moléculaire et modélisation de la complexation de la fonction catéchol par l'aluminium (III)" (thèse, 2002) (USTL, Lille).

Chapitre IV

Complexation par une flavone multi-site : la quercétine

Chapitre IV

Complexation par une flavone multi-site : la quercétine

I. Introduction.....	115
II. Complexation par la quercétine dans le méthanol.....	116
1) Complexation du plomb (II).....	116
a. <u>Stoechiométries et constantes de formation.....</u>	<u>116</u>
b. <u>Etude théorique du complexe 1:1.....</u>	<u>119</u>
c. <u>Analyse vibrationnelle.....</u>	<u>122</u>
2) Complexation du zinc (II).....	123
3) Comparaison des capacités complexantes des métaux Al(III), Pb(II) et Zn(II) envers la quercétine dans le méthanol.....	126
III. Complexation de la quercétine à pH=6.....	127
1) Suivi de la complexation de Al(III) par la quercétine.....	127
2) Suivi de la complexation de Pb(II) par la quercétine.....	129
3) Suivi de la complexation de Zn(II) par la quercétine.....	131
IV. Conclusion	133
V. Bibliographie	135

I. Introduction

L'étude, en milieu méthanoïque, de la complexation du cation Al(III) par la quercétine (Q) et des trois flavones mono-sites possédant séparément les sites du premier ligand a été effectuée précédemment au sein de l'équipe (1).

Les résultats concernant les flavones mono-sites (2-5), notamment les stoechiométries et les constantes de formation des complexes formés, ont permis d'établir un classement du pouvoir de chélation des trois sites vis-à-vis de l'ion Al(III) : α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle > catéchol.

Ensuite l'étude du système quercétine-Al(III) dans le méthanol a mis en évidence que parmi les trois sites en compétition, le premier site impliqué dans la fixation de l'ion est le site qui présente le pouvoir complexant le plus important lorsqu'il est étudié individuellement (1). Ces premières conclusions sont très encourageantes pour extrapoler le raisonnement fait à partir de molécules de faible taille à d'autres plus complexes qui mettent en jeu plusieurs fonctions en compétition.

Dans ce chapitre, nous verrons si les mêmes conclusions peuvent être observées dans le cas de la complexation du plomb (II) et du zinc (II) en rapprochant les données concernant la quercétine avec ceux obtenus dans le chapitre précédent portant sur les flavonoïdes mono-sites. Nous analyserons également l'impact des conditions physico-chimiques du milieu en réalisant comme précédemment les complexations en milieu méthanolique et mixte MeOH-H₂O 50/50 à pH = 6.

II. Complexation par la quercétine dans le méthanol

Un récapitulatif des données concernant la complexation de l'aluminium (III) par les flavones mono-sites et la quercétine dans le méthanol sera exposé à la fin du paragraphe afin de comparer les résultats avec ceux obtenus pour la complexation de Pb(II) et Zn(II).

1) Complexation du plomb (II)

a. Stoechiométries et constantes de formation

Le spectre électronique de la quercétine est caractérisé par les deux bandes typiques des flavonoïdes situées à 372 nm (bande I) et à 255 nm (bande II) avec un épaulement à 269 nm (Figure 1). L'addition d'une solution de chlorure de plomb à la quercétine provoque une forte diminution de l'intensité de la bande I au profit d'une nouvelle bande à 429 nm. L'intensité de la bande II augmente et subit un léger déplacement vers le rouge ; une nouvelle bande apparaît également dans cette zone à 235 nm. A des rapports R élevés (supérieurs à 2,5), la bande I subit un effet bathochrome jusqu'à 455 nm.

L'apparition successive de ces deux bandes (429 et 455 nm) illustre la formation d'au moins deux complexes avec le plomb (II).

La méthode des rapports molaires appliquée à 429 nm (longueur d'onde de la 1^{ère} forme complexée observée) (Figure 2) nous indique la formation d'un complexe de stoechiométrie 1:1 ; cette même méthode tracée à 455 nm (longueur d'onde de la 2^{nde} forme complexée) montre deux inflexions à des valeurs de rapport de 0,5 et 2 : révélant respectivement la formation de complexes de stoechiométrie 1:2 et 2:1.

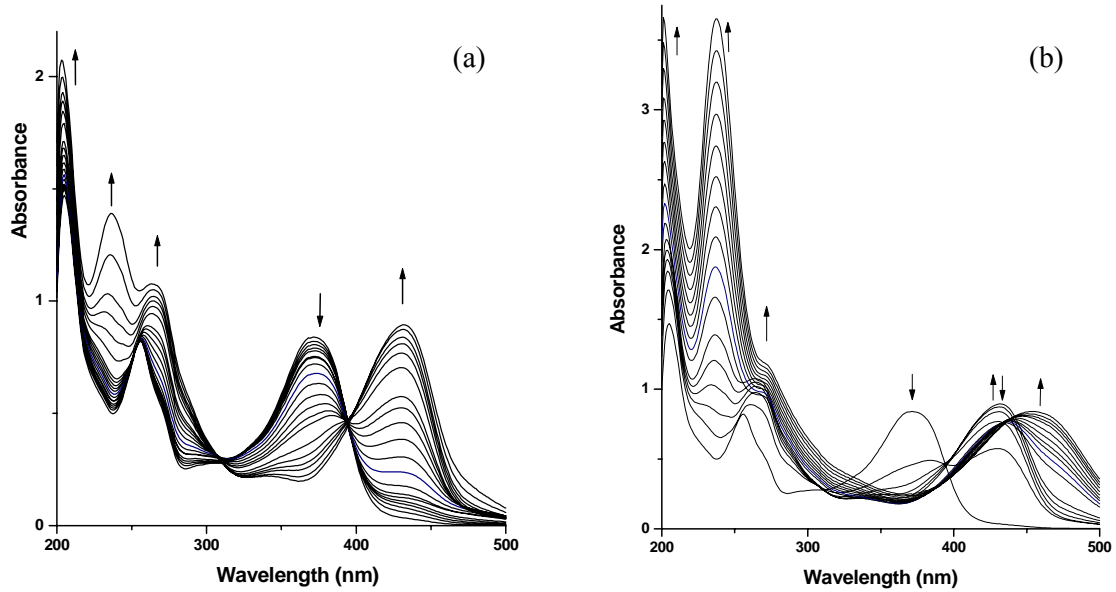


Figure 1 : Evolution du spectre UV-visible de la quercétine 4.10^{-5} mol/L lors de la chélation du plomb (II) dans le méthanol pour des rapports molaires R compris entre 0 et 5 (a) et 4 et 15 (b).

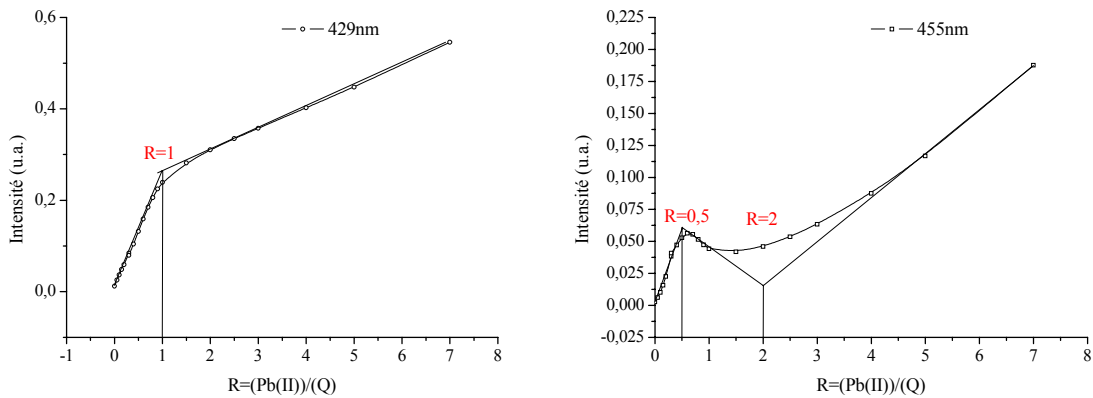


Figure 2 : Courbes des rapports molaires pour la complexation du plomb (II) par la quercétine dans le méthanol aux maxima d'absorption des deux formes complexées (429 et 455 nm).

L'application de la méthode EFA (6) confirme la présence de quatre espèces absorbantes : la quercétine et ses trois complexes 1:2, 1:1 et 2:1. Les constantes de formation de ces trois complexes ont été obtenues en appliquant des traitements numériques à partir des faisceaux de

spectres UV-visible. Les meilleurs résultats d'ajustement correspondent aux valeurs de constantes suivantes : $\log\beta_{1:2} = 7,71 \pm 0,43$, $\log\beta_{1:1} = 4,87 \pm 0,04$ et $\log\beta_{2:1} = 8,23 \pm 0,05$.

Les courbes de variation des concentrations des espèces absorbantes en fonction de la quantité de PbCl_2 ajouté sont données Figure 3. Il apparaît clairement que le complexe majoritaire est celui de composition 1:1 qui pour un rapport R de 2, représente 75% de la distribution de quercétine toutes espèces confondues. Les deux autres complexes (1:2 et 2:1) sont formés dans de moindre proportion : la concentration du complexe 1:2 qui est formé dès le premier ajout de sel métallique ne dépasse jamais 1%. Quant au complexe de stoechiométrie 2:1, il n'est formé qu'à partir d'un rapport de 0,2 et sa concentration augmente au dépend de celle de l'espèce 1:1.

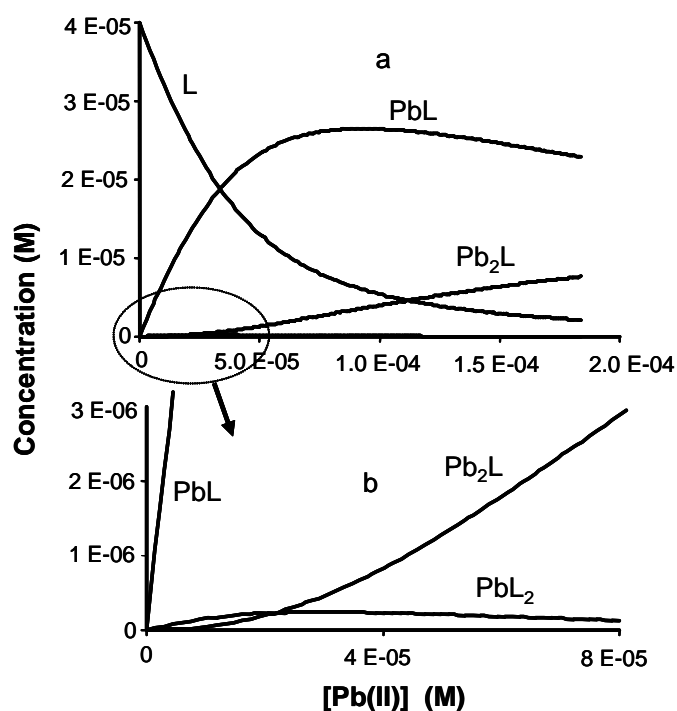


Figure 3 : Courbes de distribution des espèces impliquées lors du dosage de la quercétine par le plomb pour des rapports R allant de 0 à 5 (a) et de 0 à 2 (b).

A partir de toutes ces observations, un mécanisme de complexation peut être proposé : dans un premier temps, les complexes 1:2 et 1:1 se forment simultanément impliquant chacun le même premier site de fixation, ensuite un ion métallique se fixe à un second site (formation de

l'espèce 2:1). Etant donné que le composé Pb_2L se forme pour des concentrations en plomb élevées, la capacité complexante du 1^{er} site est bien supérieure à celle du second.

Dans la littérature, de nombreuses études ont été menées sur le pouvoir chélatant des sites α -hydroxy-carbonyle, β -hydroxy-carbonyle et du catéchol (7) et d'après celles-ci la fonction impliquée en 1^{er} dans le mécanisme de complexation de la quercétine est soit la fonction α -hydroxycarbonyle soit la fonction catéchol (8). D'après ces mêmes études, le site β -hydroxy-carbonyle n'est jamais impliqué dans la complexation de la flavone. De plus, en observant le déplacement provoqué par la complexation sur la bande I (ici 52 nm), il s'avère que les sites α -hydroxy-carbonyle de la molécule 3-hydroxyflavone (61 nm) et catéchol de la 3',4'-dihydroxyflavone (57 nm) donnent des déplacements du même ordre de grandeur, contrairement à la fonction β -hydroxy-carbonyle de la 5-hydroxyflavone où la bande I ne se déplace pas (cf. Chapitre III).

b. Etude théorique du complexe 1:1

Une étude théorique a été menée sur le complexe 1:1, qui est l'espèce formée prédominante, afin de connaître le site impliqué en premier dans la complexation de Pb(II) par la quercétine. Nous nommerons pour la suite : **Q** la quercétine, **PbQ** le complexe formé entre une molécule de quercétine et un ion Pb (II) fixé sur le site catéchol du ligand et **PbQ⁺** le complexe obtenu lorsque le métal est coordonné à la fonction α -hydroxy-carbonyle.

L'optimisation des géométries de Q, PbQ, PbQ⁺ a été réalisée par DFT et à partir de la structure la plus stable de chacune de ces entités, les longueurs d'onde des transitions électroniques (Figure 4) ont été calculées par un traitement TD-DFT. Pour tous les calculs, la fonctionnelle B3LYP associée à la base 6-31G(d,p), a été utilisée. L'introduction des effets de solvants (IEF-PCM) est indispensable pour reproduire de façon correcte le spectre d'absorption. Le pseudo-potential Lanl2dz a servi pour décrire l'atome de plomb des deux complexes.

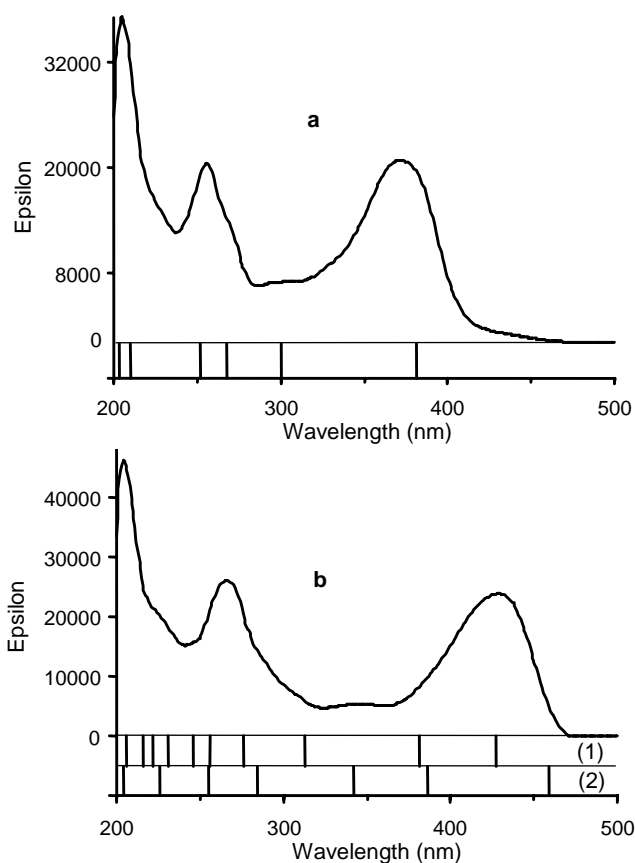


Figure 4 : Spectres expérimentaux UV-visible de la quercétine (a) et de son complexe 1:1 (b) dans le méthanol ; les lignes verticales représentent les positions des transitions électroniques calculées ((1) : avec Pb(II) coordonné au site catéchol ; (2) : au site 3-hydroxy-carbonyle).

Le spectre de la quercétine est bien reproduit sur l'ensemble des longueurs d'onde au niveau des positions des transitions, seule la position de la bande I caractéristique de la flavone a été calculé un peu trop haute (381 nm au lieu de 372 nm). Le spectre du complexe 1:1 présenté Figure 4 a été obtenu par extraction à l'aide du logiciel Specfit. Les positions calculées de la bande observée expérimentalement à 429 nm du complexe pour PbQ (427 nm) et PbQ⁺ (459 nm) montrent clairement que le premier site impliqué dans cette complexation est le catéchol.

A la fois pour la quercétine et son complexe, la transition responsable de la bande caractéristique à 372 et 429 nm met en jeu les orbitales HOMO (highest occupied molecular orbital) et LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) de manière prépondérante. La Figure 5 illustre les orbitales moléculaires frontières de Q et PbQ ainsi que leurs énergies.

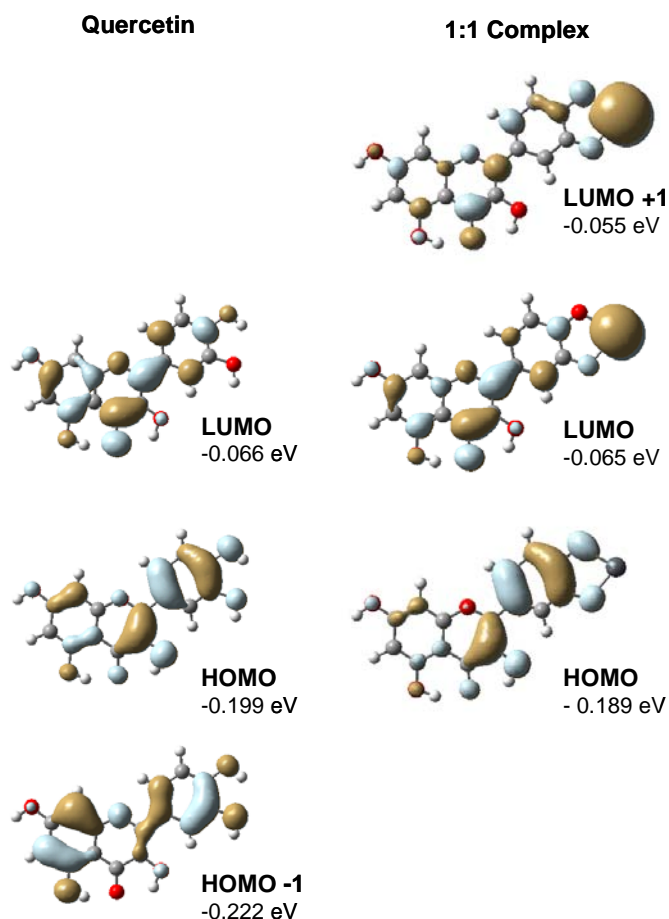


Figure 5 : Représentation des orbitales moléculaires calculées pour la quercétine et son complexe 1:1 avec le plomb (II) coordonné au catéchol.

Pour la quercétine, la densité de charge de l'HOMO est principalement localisée sur le cycle B alors que la LUMO a une densité répartie sur l'ensemble du composé : la transition HOMO \rightarrow LUMO est ici un transfert de charge du cycle B vers le reste de la molécule. Dans le cas du complexe PbQ, l'HOMO et la LUMO ont la même distribution des charges sur le ligand mais la LUMO présente une importante contribution de l'orbitale 6p du plomb. La transition HOMO \rightarrow LUMO est alors un transfert de charge ligand-métal qui est à l'origine de l'effet bathochrome observé sur le spectre UV-visible.

c. Analyse vibrationnelle

Une seconde validation de la coordination du plomb sur la fonction catéchol de la quercétine est obtenue au moyen de la spectroscopie de vibration Raman. La Figure 6 présente les spectres FT-Raman de la quercétine en présence ou non d'une solution de chlorure de plomb.

Sur le spectre de la quercétine, l'élongation de la liaison C=O du cycle C de la quercétine se situe expérimentalement à 1656 cm^{-1} , celle-ci n'est pas modifiée par la complexation. Cette vibration est calculée à 1656 cm^{-1} pour PbQ et 1647 cm^{-1} pour PbQ⁺. La non-implication de cette liaison C=O signifie que ni la fonction α -hydroxy-carbonyle ni la fonction β -hydroxy-carbonyle n'est engagée dans le complexe 1:1 entre la quercétine et Pb(II). Il apparaît donc que le catéchol soit la seule fonction impliquée. De plus, dans la zone $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, nous voyons apparaître deux bandes à 1470 et 1447 cm^{-1} qui sont attribuées aux élongations asymétrique et symétrique des liaisons C-O du catéchol.

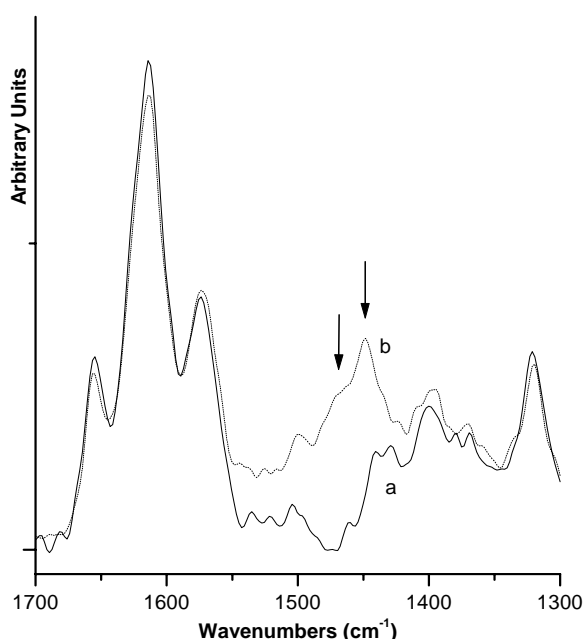


Figure 6 : Spectres FT-Raman d'une solution de quercétine 10^{-3} M (a) et d'un mélange quercétine 10^{-3} M / PbCl_2 5.10^{-4} M (b) dans le méthanol.

En conclusion, la combinaison des données expérimentales et des calculs théoriques nous a permis de comparer les pouvoirs chélateurs des trois sites potentiels de complexation de la quercétine vis-à-vis de Pb(II). Les différents résultats collectés nous permettent d'émettre le mécanisme de réaction suivant (Figure 7). Ces résultats montrent également que le classement des sites présents sur les trois flavonoïdes mono-sites (catéchol > α -hydroxy-carbonyl > β -hydroxy-carbonyl) vis-à-vis de Pb(II) est conservé dans le cas de la quercétine c'est-à-dire lorsqu'il sont mis en compétition au sein d'une même structure.

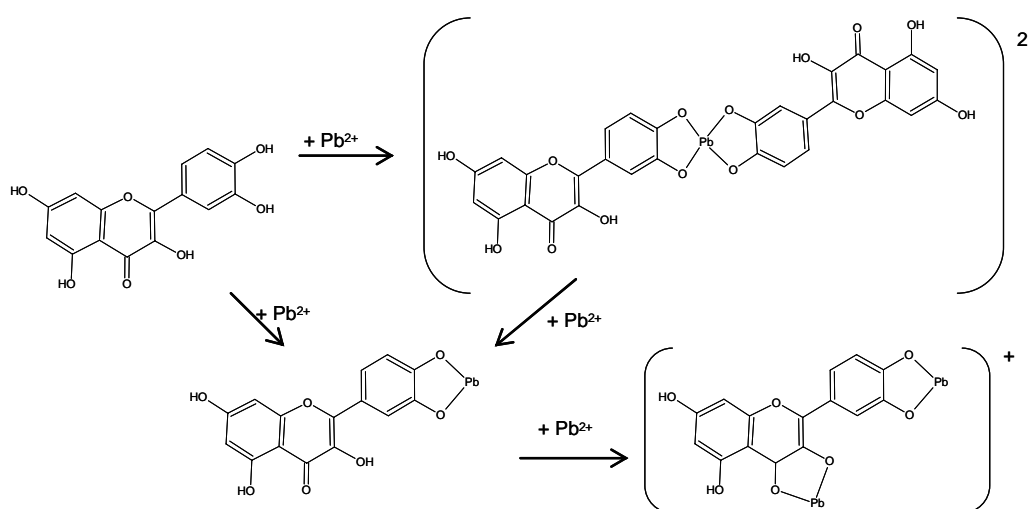


Figure 7 : Mécanisme proposé pour la complexation du Pb(II) par la quercétine dans le méthanol.

2) Complexation du zinc (II)

La complexation de Zn(II) par la quercétine dans le méthanol a été suivie par spectroscopie UV-visible pour des rapports molaires R allant de 0 à 5. La série de spectres réalisés pour les différents rapports de concentration (Figure 8) montre une diminution de l'intensité de la bande à 372 nm relative à la quercétine libre et l'apparition d'une nouvelle bande à 428 nm attribuable à la forme complexée de la quercétine avec Zn(II).

La présence de points isobestiques à 255, 295 et 391 nm sur l'intégralité de la gamme des rapports molaires nous indique la présence d'un unique complexe en équilibre avec la quercétine. Une stoechiométrie 1:1 a été déterminée par la méthode des rapports molaires (Figure 9).

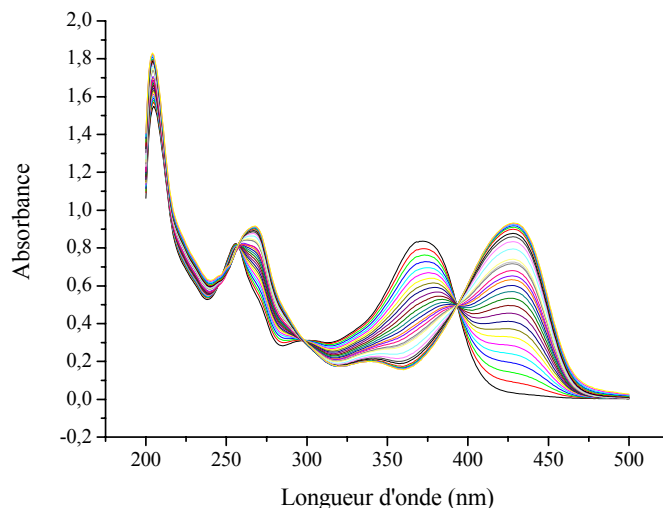


Figure 8 : Evolution du spectre d'absorption UV-visible de la quercétine $4.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ pour différents rapports $[\text{Zn(II)}]/[\text{Q}]$ de 0 à 5.

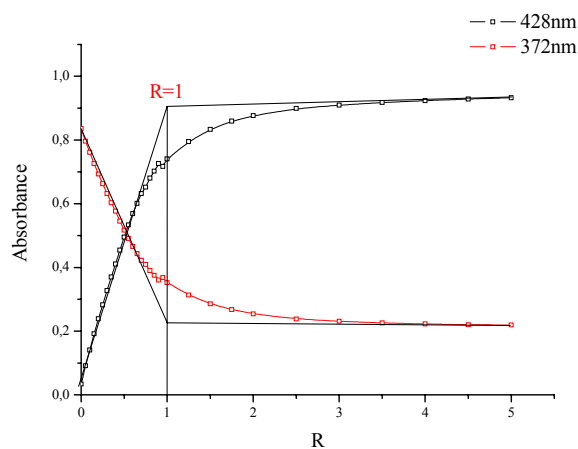


Figure 9 : Méthode des rapports molaires appliquée à la complexation du zinc (II) par la quercétine dans le méthanol ($4.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) aux maxima d'absorption de la molécule libre et du complexe ($\lambda_{\text{max}} = 372 \text{ nm}$ et 428 nm).

La valeur calculée de la constante de formation du complexe 1:1 est ici de $\log\beta_{1:1} = 5,91 \pm 0,07$. Elle correspond à l'ajustement réalisé avec les spectre extraits présentés Figure 10.

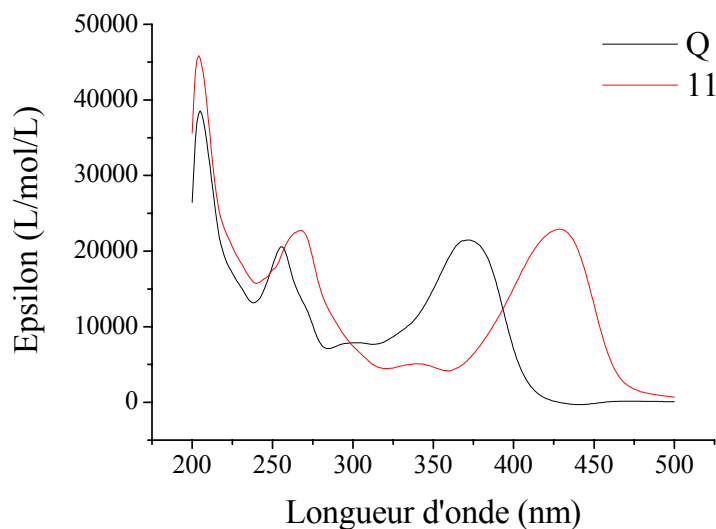


Figure 10 : Spectres expérimentaux UV-visible de la quercétine et de son complexe 1:1 avec le zinc (II) dans le méthanol 4.10^{-5} mol/L.

La proximité des maxima des complexes formés avec Zn(II) et Pb(II), respectivement à 428 nm et 429 nm, ne signifient pas dans notre cas que l'espèce métallique n'intervient pas dans la transition électronique responsable de l'absorption dans les grandes longueurs d'onde. Effectivement, il a été montré que l'orbitale 6p du plomb contribuait fortement à la LUMO et que la transition de la bande caractéristique du complexe (HOMO \rightarrow LUMO) est alors un transfert de charge ligand-métal.

Le complexe Zn:Q étant de stoechiométrie 1:1, le site de chélation impliqué peut être au choix l'un des trois sites étudiés précédemment (α -hydroxy-carbonyle, β -hydroxy-carbonyle ou catéchol). Cependant la stoechiométrie et la valeur des constantes de formation des complexes des flavonoïdes mono-sites (Tableau 1 en conclusion) permettent de dire que la fixation du zinc(II) a lieu sur la fonction α -hydroxy-carbonyle de la quercétine. De plus, des études réalisées par spectroscopie RMN ont montré que ce site serait celui impliqué prioritairement dans la complexation de Zn(II) par la quercétine (9).

L'étude théorique de la chélation de Zn(II) par la quercétine a déjà été abordée dans la littérature. Une étude réalisée dans le méthanol (10) met en évidence, par couplage des

techniques RMN, infrarouge, UV-visible et fluorescence, des complexes 1:3, 3:2 et 2:1 où le 1^{er} site engagé serait le α -hydroxy-carbonyle (comme dans le cas de la complexation de Al(III)). Au vu des stoechiométries formées, des déplacements spectraux engendrés par la complexation, la présente étude confirme bien ici l'implication du site **α -hydroxy-carbonyle** dans la complexation de Zn(II) par la quercétine en milieu mixte.

3) Comparaison des capacités complexantes des métaux Al(III), Pb(II) et Zn(II) envers la quercétine dans le méthanol

Précédemment, l'étude des flavones mono-sites (chapitre III) a permis de classer les trois sites étudiés selon leur capacité à fixer un des ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II) dans le méthanol (3-5, 11).

- **Al(III)** : α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle > catéchol
- **Pb(II)** : catéchol > α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle
- **Zn(II)** : α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle > catéchol

Dans l'analyse de la complexation du ligand multi-site, la connaissance du premier site de la quercétine impliqué dans la chélation de chacun des ions métalliques (le site α -hydroxycarbonyle pour la fixation de Al(III) et Zn(II) et le catéchol pour Pb(II)) a montré clairement que celui-ci correspond à la fonction qui présente le pouvoir complexant le plus important lorsque que ces fonctions sont étudiées de manière indépendante. Ceci permet d'affirmer que pour un métal donné, le classement de sites chélateurs pris indépendamment les uns des autres est conservé lorsque ces sites sont en compétition au sein d'une molécule de structure identique. Il est important également de souligner qu'un classement de différents sites en fonction de leur pouvoir complexant vis-à-vis d'un ion métallique n'est pas extrapolable aux autres ions. Dans nos études, l'aluminium (III) se révèle être plus complexé par la quercétine que le plomb (II) ou le zinc (II).

Cette étude a été réalisée dans le méthanol, cependant, comme il l'a été montré précédemment, il apparaît qu'en solution aqueuse, les conditions de pH et de solvation influencent considérablement le mécanisme de complexation. Ainsi, nous verrons l'impact

d'un changement de milieu en se plaçant désormais dans un solvant mixte MeOH-H₂O 50% v/v où le pH est fixé à 6.

III. Complexation de la quercétine à pH=6

De manière similaire à l'étude qui vient d'être effectuée avec la quercétine dans le méthanol, la complexation des cations métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II) par cette flavone multi-site a été suivie par spectroscopie UV-visible dans un solvant mixte MeOH-H₂O 50% v/v à pH=6.

1) Suivi de la complexation de Al(III) par la quercétine

Les interactions entre Q et Al(III) ont été examinées précédemment dans la littérature cependant aucune expérience n'a été réalisée dans un solvant proche d'un milieu réactionnel naturel. Ainsi en milieu méthanoïque (10, 12, 13), la formation des espèces 1:3 et 2:1 (pour des grandes quantités d'Al(III) ajoutées) ont été mises en évidence ; les auteurs ont montré qu'un site catéchol et un site α -hydroxy-carbonyle sont impliqués dans ce complexe. Il est également démontré que le site β -hydroxy-carbonyle n'est jamais concerné dans la fixation de l'ion métallique.

L'ajout d'aluminium à la solution de quercétine 6.10^{-5} mol/L à pH = 6 provoque de nombreux changements sur le spectre de la flavone. La bande I à 370 nm diminue en intensité tandis qu'apparaissent deux nouvelles bandes à 432 nm (dès le début de l'ajout d'Al(III)) et 475 nm (à partir d'un rapport R = 0,3). La bande II à 255 nm diminue en intensité également au cours du dosage tandis que l'épaule à 267 nm subit un déplacement bathochrome à 272 nm. La présence de plusieurs points isobestiques fournit des renseignements sur le mécanisme de réaction. En effet, d'un rapport R = 0 à 0,3 ; un point isobestique est visible à 390 nm, celui-ci est corrélé avec l'apparition d'une bande à 432 nm. Puis d'un rapport 0,3 à 1, il n'y a plus de point remarquable mais une bande à 475 nm commence à faire son apparition ; enfin à partir de R=1, un nouveau point isobestique apparaît à 410 nm. Les observations

montrent que deux complexes au minimum se forment avec des maxima d'absorption situés à 435 et 475 nm.

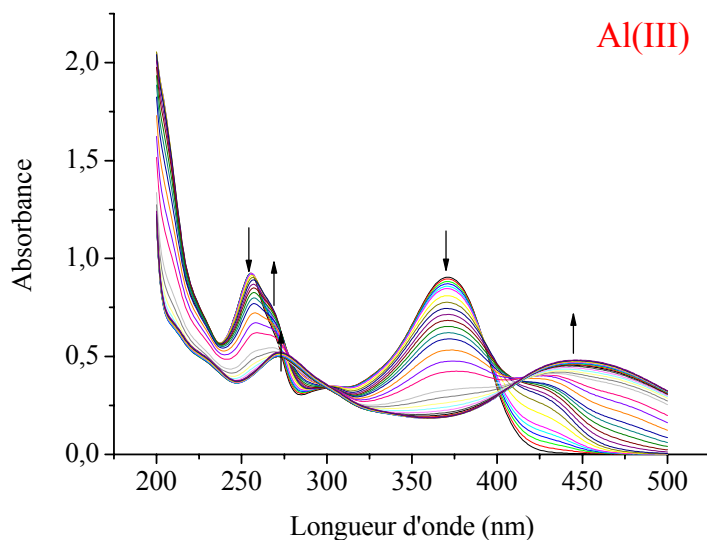


Figure 11 : Evolution des spectres UV-visible de Q ($4.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un mélange MeOH/H₂O 50% v/v avec ajout de Al (III) $4.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ en fonction du rapport R de 0 à 2,5.

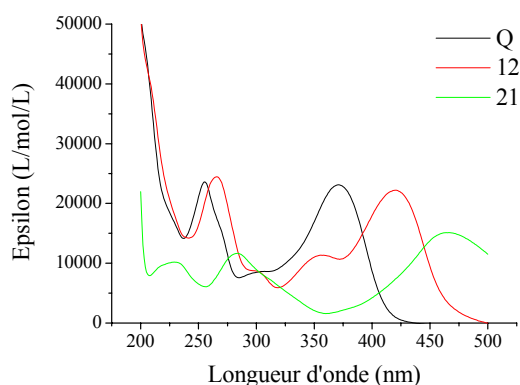


Figure 12 : Spectres UV-visible extraits au moyen de traitement chimiométrique des complexes 1:2 et 2:1 à pH=6.

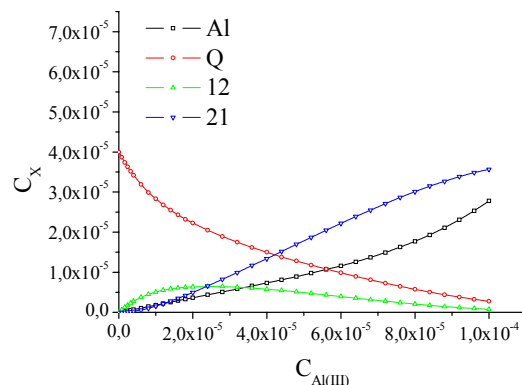


Figure 13 : Courbes de concentrations des différentes espèces au cours du dosage de complexation de Al (III) par la quercétine en milieu mixte.

La méthode des rapports molaires appliquées au faisceau de spectres UV-visible de la complexation, mets en évidence des stoechiométries 1:3, 1:2 et 2:1. Parmi les flavonoïdes mono-sites, seule la 3-hydroxyflavone forme une espèce complexée ayant cette stoechiométrie (Tableau 1). Néanmoins les analyses chimiométriques nous indiquent que le 1^{er} complexe (1:3) n'est pas formé en assez grande quantité pour pouvoir en extraire le spectre

UV-visible à partir du faisceau ; ainsi le meilleur modèle aboutit à trouver les spectres présentés Figure 12. Le spectre du complexe de stoechiométrie 1:2 a un maximum à 418 nm et le complexe 2:1 à 463 nm (comme l'analyse des spectres UV-visible le prévoyait). La variation des concentrations des différentes espèces au cours du dosage (Figure 13) montre qu'en début de réaction la forme 1:2 est très dominante (expliquant le 1^{er} point isobestique. Jusqu'à un rapport de 0,5 la quantité de complexe 1:2 est supérieure à celle du 2:1 puis celui-ci devient à son tour prépondérant.

Lors de l'étude des flavonoïdes mono-sites, il a été mis en évidence que seule la 3-hydroxyflavone qui possède le site α -hydroxy-carbonyl forme des complexes de stoechiométrie 1:3 et 1:2 comme la quercétine : le premier site impliqué au niveau de la quercétine est donc la fonction **3-hydroxy-4-carbonyl**.

De plus une publication récente montre par spectroscopies RMN et infrarouge que dans le méthanol, un complexe 1:3 est formé et que le 1^{er} site impliqué est la fonction α -hydroxy-carbonyl (10).

Si nous faisons un parallèle avec notre étude de la quercétine dans le méthanol, la formation de deux complexes a été soulignée : une forme 1 :2 (avec un maximum observé à 428 nm) et 2 :1 (maximum observé à 456 nm). A pH = 6, les stoechiométries mises en évidence sont les mêmes et les maxima se situent respectivement à 418 et 463 nm). Etant donné la proximité des maxima des complexes et en considérant les effets de solvant : l'implication de la fonction α -hydroxy-carbonyl en premier est confirmée ainsi que celle du catéchol en second site dans le complexe 2:1.

2) Suivi de la complexation de Pb(II) par la quercétine

Malgré son intérêt environnemental évident, la chélation du plomb (II) est beaucoup moins traitée dans les articles que celle de Al(III) ou Zn(II). Selon une étude récente (7), la flavone forme un chélate 1:2 dans un solvant éthanol-eau, où il engage le groupement catéchol. Dans nos conditions, la complexation de la quercétine par le plomb (II) modifie peu le spectre du ligand (Figure 14).

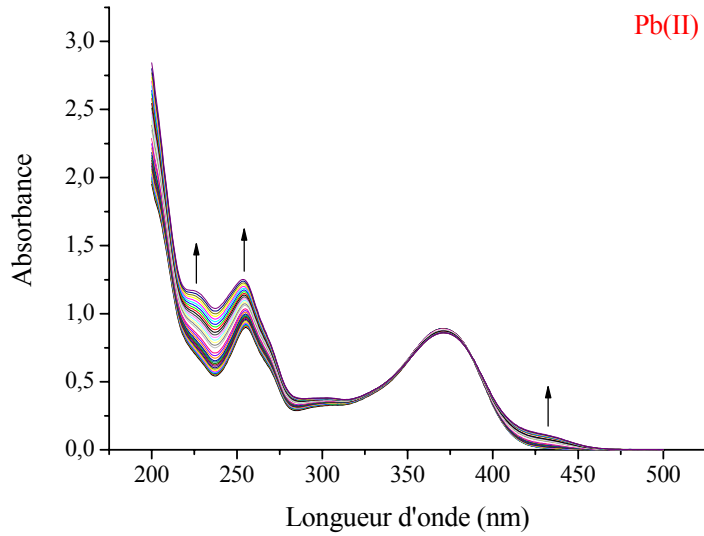


Figure 14 : Evolution des spectres UV-visible de Q ($4.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un mélange MeOH/H₂O 50% v/v par ajout de Pb(II) $4.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ en fonction du rapport R de 0 à 2,5.

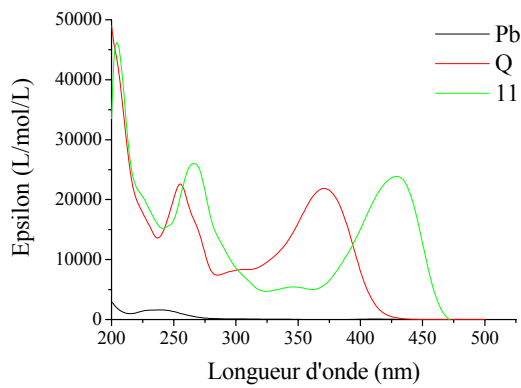


Figure 15 : Spectres UV-visible expérimentaux de Pb(II), Q et de son complexe 1:1 à pH=6.

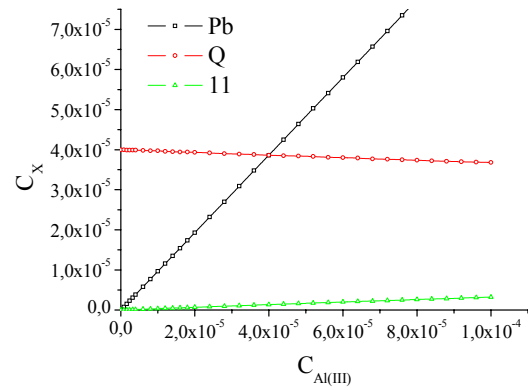


Figure 16 : Courbes de concentrations des différentes espèces au cours du dosage de complexation de Pb(II) par Q en milieu mixte.

La bande caractéristique à 370 nm n'est pas affectée mais une nouvelle bande à 227 nm émerge: cette partie du spectre est caractéristique de la complexation du plomb (II) par la fonction catéchol ou β -hydroxy-carbonyle (cf. Chapitre III). Cependant, autour de 430 nm une nouvelle bande est également visible, et seule une substitution sur le catéchol peut combiner ces deux effets. La fonction **catéchol** de la quercétine semble donc être celle impliquée dans la composition du complexe entre la quercétine et le Pb(II).

La stoechiométrie obtenue par la méthode des rapports molaires est 1:2 (de même que pour tous les mono-sites étudiés à pH = 6, cf. Tableau 1) et 1:1. Comme il a été souvent constaté, le premier complexe de haute stoechiométrie se forme en trop faible quantité et les méthodes

classiques d'analyse de données ne permette d'extraire que les spectres des espèces prépondérantes (Figure 15). Le spectre UV-visible du complexe 1:1 se caractérise par un maximum à 428 nm, cette espèce ne se forme qu'en faible proportion comme l'indique la distribution des différentes espèces au cours du dosage (Figure 16) : à un rapport 1 seul 5% de la quercétine est engagée dans la complexation de l'ion Pb(II). La quercétine présente donc une capacité à chélater Al(III) plus grande que Pb(II).

3) Suivi de la complexation de Zn(II) par la quercétine

La complexation du zinc (II) a largement été étudiée dans la littérature. Bien que peu d'études aient été réalisées dans un solvant où l'eau est présente pour des raisons de solubilité, certains auteurs (8) trouvent que Zn(II) forme avec la quercétine un complexe 1:1 à pH = 4 où le site catéchol serait impliqué. Deux autres études (9, 14) réalisées dans des milieux mixtes tris-DMSO et tris-éthanol mettent en évidence un complexe 2:1 où les sites 3-hydroxy-4-carbonyl et catéchol sont engagés. Enfin, une dernière étude du système Q/Zn(II) effectuée en milieu éthanol en présence d'eau, souligne la composition d'une forme 1:2 dans laquelle le catéchol est concerné.

Les publications disponibles offrent une gamme de stoechiométries de complexes étendue. Cependant, jamais le site β -hydroxy-carbonyl n'est cité dans la composition des complexes de la quercétine et de Zn(II). La forte influence du solvant explique en partie ces divers résultats.

De même que pour la complexation de Pb(II), l'ajout de zinc (II) perturbe peu le spectre de la quercétine (Figure 17). Aucune nouvelle bande ni aucun déplacement de bande n'apparaît, seule une légère augmentation d'intensité sur l'ensemble du spectre se produit. Lors de l'étude des flavonoïdes mono-sites, la 3',4'-dihydroxyflavone qui possède la fonction catéchol était la seule à avoir un tel comportement ; qui plus est, la quercétine forme également avec le zinc (II) en milieu mixte, à pH = 6, un complexe 1:2 (Tableau 1) : le **catéchol** est donc ici aussi le site qui est mis en jeu dans la complexation du zinc par la quercétine.

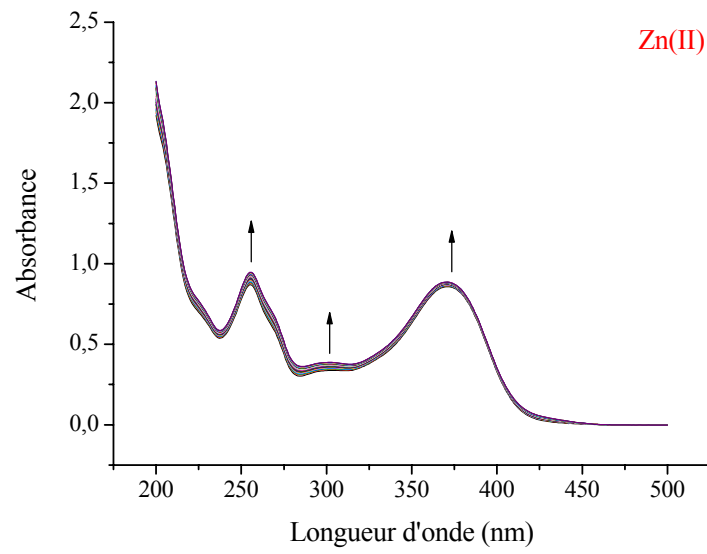


Figure 17 : Evolution des spectres UV-visible de la Q ($4.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un mélange MeOH/H₂O 50% v/v avec ajout de Al (III) $4.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ pour des rapports R de 0 à 2,5.

IV. Conclusion

Dans le chapitre précédent, trois flavonoïdes mono-sites ont été étudiés ; la 3-hydroxyflavone qui possède le site chélateur α -hydroxyflavone, la 5-hydroxyflavone le site β -hydroxyflavone et la 3',4'-dihydroxyflavone la fonction catéchol. Dans ce chapitre, la complexation des métaux par la quercétine qui possède les trois sites précédents en compétition est analysée. Les principaux résultats sont exposés dans le tableau suivant.

Les analyses de la complexation des mono-sites ont permis de classer les fonctions selon leur pouvoir de complexation.

Dans le MeOH

Al(III) : α -hydroxy-carbonyle > catéchol > β -hydroxy-carbonyle

Pb(II) : catéchol > α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle

Zn(II) : α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle > catéchol

Dans un solvant mixte MeOH-H₂O 50% v/v à pH=6

Al(III) : α -hydroxy-carbonyle > catéchol > β -hydroxy-carbonyle

Pb(II) : catéchol > α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle

Zn(II) : catéchol > β -hydroxy-carbonyle > α -hydroxy-carbonyle

Sans revenir sur les effets dus à l'ion métallique ou au milieu qui ont été discuté chapitre III, l'étude de la quercétine a montré que le premier site impliqué dans sa complexation était toujours celui qui possède la plus grande capacité individuelle. Toutefois, ce fait n'est vrai qu'avec un ion métallique et dans un milieu donné.

Dans des conditions données, il est donc tout à fait envisageable d'extrapoler des résultats obtenus sur des molécules modèles à une macromolécules présentant différents site de fixation des métaux en compétition.

	λ_{\max}	MeOH									MeOH-H2O								
		Al			Pb			Zn			Al			Pb			Zn		
		M:L	λ_{\max}	site	M:L	λ_{\max}	site	M:L	λ_{\max}	site	M:L	λ_{\max}	site	M:L	λ_{\max}	site	M:L	λ_{\max}	site
3HF	344	1:2	402	3	1:1	405	3	1:1	408	3	1:3	404	3	1:2	404	3	1:2	404	3
5HF	270/339	1:1	397	5	1:1	268/241	5	1:1	402	5	1:2	404	5	1:2	267	5	1:2	-	5
3'4'diHF	343	1:1	384	cat.	1:1	399	cat.	1:1	406	cat.	1:2	390	cat	1:2	-	cat	1:2	-	cat
Q		1:2	428	3	1:2	-		1:1	428	3	1:3	-	3	1:2	418	3	1:2	428	cat
		2:1	456	3+cat.	2:1	455	cat.+3				2:1	463	3+cat.						

Tableau 1 : Récapitulatif des données concernant la complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) par les flavonoïdes mono et multi-sites dans un solvant MeOH et MeOH-H2O 50% v/v à pH=6. Les longueurs d'onde sont exprimées en nanomètre. Les colonnes « site » indiquent pour la quercétine la ou les fonctions impliquées dans la chélation de l'ion métallique. Les cases grisées (une par colonne) correspondent au mono-site qui possède le pouvoir chélatant le plus grand des trois.

V. Bibliographie

1. Cornard, J.-P. & Merlin, J.-C. (2002) *Journal of Inorganic Biochemistry* **92**, 19-27.
2. Cornard, J.-P. & Merlin, J.-C. (2003) *Journal of Molecular Structure* **651-653**, 381-387.
3. Cornard, J.-P. & Merlin, J.-C. (2001) *Journal of Molecular Structure* **569**, 129-138.
4. Cornard, J.-P., Boudet, A.-C., & Merlin, J.-C. (2001) *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **57**, 591-602.
5. Boudet, A.-C., Cornard, J.-P., & Merlin, J.-C. (2000) *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **56**, 829-839.
6. Specfit Global Analysis System (1993-2002), ed. Spectrum Software Associates.
7. Zhou, J., Wang, L., Wang, J., & Tang, N. (2001) *Transition Metal Chemistry* **26**, 57-63.
8. Esparza, I., Salinas, I., Santamaria, C., Garcia-Mina, J. M., & Fernandez, J. M. (2005) *Analytica Chimica Acta* **543**, 267-274.
9. Le Nest, G., Caille, O., Woudstra, M., Roche, S., Guerlesquin, F., & Lexa, D. (2004) *Inorganica Chimica Acta* **357**, 775-784.
10. de Souza, R. F. V. & De Giovani, W. F. (2005) *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **61**, 1985-1990.
11. Cornard, J. P. & Merlin, J. C. (2002) *Polyhedron* **21**, 2801-2810.
12. Porter, L. J. & Markham, K. R. (1970) *Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic*, 1309-1313.
13. Porter, L. J. & Markham, K. R. (1970) *Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic* **2**, 344-349.
14. Le Nest, G., Caille, O., Woudstra, M., Roche, S., Burlat, B., Belle, V., Guigliarelli, B., & Lexa, D. (2004) *Inorganica Chimica Acta* **357**, 2027-2037.

Chapitre V

Complexation des acides chlorogénique et gallique

Chapitre V

Complexation des acides chlorogénique et gallique

I. Introduction.....	137
II. Complexation de l'acide chlorogénique.....	138
1) Complexation de Al(III).....	141
2) Complexation de Pb(II).....	144
3) Complexation de Zn (II)	148
4) Détermination du site impliqué dans la complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) de l'acide chlorogénique.....	151
a. <u>Calculs théoriques des spectres de l'acide chlorogénique et de ses complexes</u>	<u>151</u>
b. <u>Spectroscopie Raman des complexes de l'acide chlorogénique</u>	<u>155</u>
III. Complexation de l'acide gallique.....	157
1) Complexation de Al(III).....	158
a. <u>Etude spectroscopique</u>	<u>158</u>
b. <u>Analyse théorique du complexe 1:1 entre l'acide gallique et l'aluminium (III)</u>	<u>161</u>
2) Complexation de Pb(II).....	164
3) Complexation de Zn (II)	167
4) Spectroscopie Raman des complexes de l'acide gallique	168
IV. Conclusion	170

V. Bibliographie	172
-------------------------------	------------

I. Introduction

L'étude de modèles de la matière organique des sols a de multiples intérêts : non seulement, elle permet d'avoir une information, comme nous l'avons montré précédemment, sur la nature des sites de fixation des espèces polluantes mais elle est aussi prédictive dans le comportement de molécules plus complexes. Dans cette partie, nous présentons l'étude de deux autres composés polyphénoliques : les acides chlorogénique et gallique (Figure 1) dans le but de mieux appréhender l'effet de compétition des sites acides et catéchol au sein d'une même structure dans la complexation des ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II) et ainsi d'avoir des données préliminaires aux études de compétition entre acide humique et molécule organique de faible poids moléculaire (Chapitre VIII).

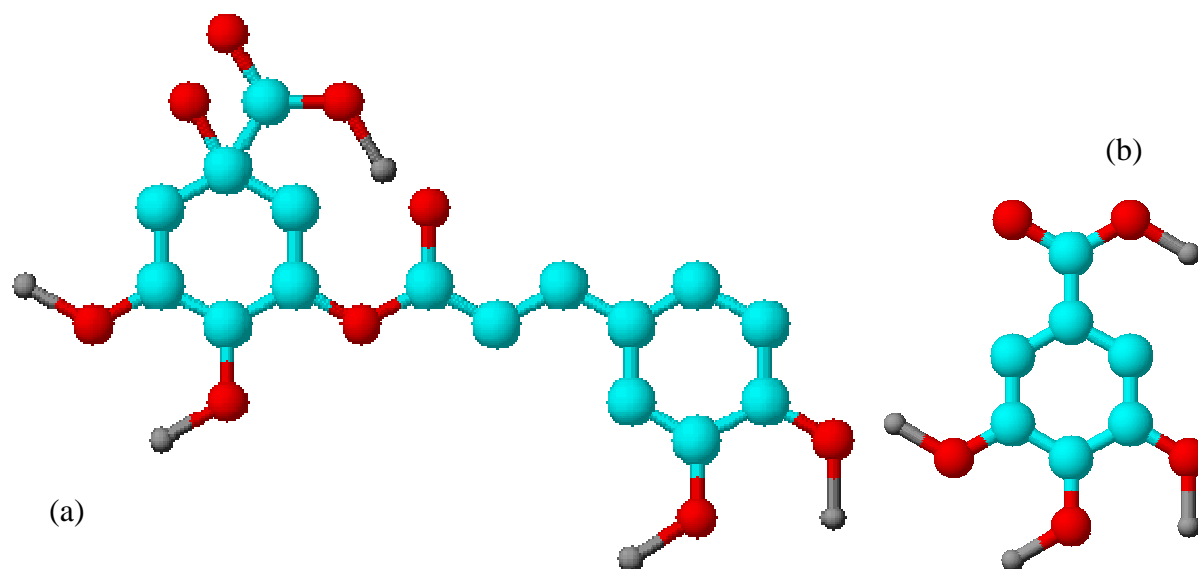


Figure 1 : Structures des acides chlorogénique (a) (seul le cycle de droite est aromatique) et gallique (b).

II. Complexation de l'acide chlorogénique

L'acide chlorogénique (AC) fait partie de la famille des acides cinnamiques de formule $C_6H_5-CH=CHCOOH$ (Figure 2). Ses esters de méthyle, d'éthyle et de benzyle sont odorants et recherchés.

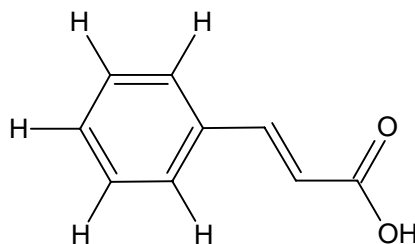


Figure 2 : Formule de l'acide cinnamique.

Les acides cinnamiques possèdent par ailleurs des propriétés antiseptique et antifongique, connues dès la période précolombienne (où ils étaient utilisés dans le processus de momification). Cette famille de molécule est très répandue dans les plantes. Le plus connu d'entre eux est l'acide caféique (acide cinnamique possédant deux fonctions hydroxyles en méta et para). Les acides chlorogéniques sont une sous-famille de cette première, et sont constitués d'acides trans-cinnamique et quinique (acide 1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexanecarboxylique). L'acide chlorogénique ou acide 3-cafféoyl-quinique est le composé le plus fréquent de cette famille (1) ; il est reconnu pour être un élément essentiel du métabolisme des plantes et par conséquent un vecteur de transport de polluants (2).

La spectroscopie des acides cinnamiques tel que l'acide chlorogénique est connue depuis longtemps. Cette famille de composé présente une bande d'absorption en UV-visible vers 230-330 nm (245 et 325 nm pour l'acide chlorogénique en milieu neutre et 265 et 373nm en milieu basique) (3). Les pKa successifs de l'acide chlorogénique ont été redéterminés en décomposant les données UV-visible en fonction du pH (présentées Figure 3). Ainsi les valeurs présentées dans le Tableau 1 ont été obtenues en traitant les données spectrales par le logiciel Specfit (4). La Figure 4 donne les spectres extraits par chimiométrie des différentes formes protonées de l'acide chlorogénique.

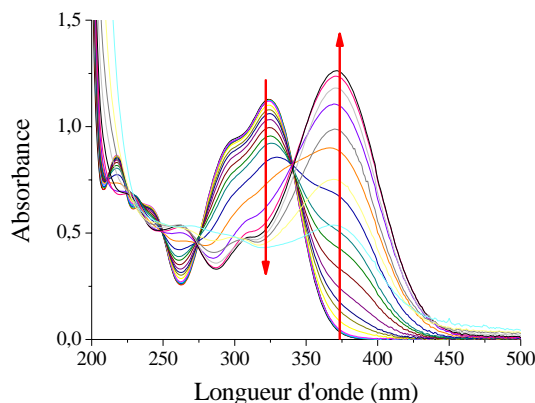


Figure 3 : Spectres de l'acide chlorogénique en fonction du pH, force ionique 0,1 mol/L, $[AC] = 6.10^{-5}$ mol/L (pH de 4,24 à 12).

	dans ce travail	dans la littérature
pK(COOH)	3,52	3,359 ^a 3,35 ^b 3,35 ^c 3,37 ^d
pK(OH1)	8,68	8,251 ^a 8,21 ^b 8,3 ^c 8,27 ^d
pK(OH2)	11,82	12,3 ^a 12,5 ^b 11,5 ^c 12,06 ^d

Tableau 1 : Valeurs des pKa de l'acide chlorogénique trouvés expérimentalement (1^{ère} colonne) et dans la littérature (2^{ème} colonne) : les valeurs de pKa ayant le même indice sont issues d'une même expérience publiée dans la littérature (5-8). La fonction hydroxyle notée OH1 est celle en para, OH2 en méta.

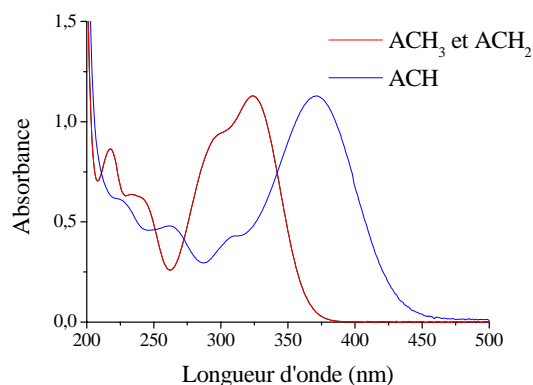


Figure 4 : Spectres expérimentaux des formes de l'acide chlorogénique : ACH₃ désigne l'acide chlorogénique protoné, ACH₂ l'espèce monodéprotoné sur la fonction acide et ACH la forme bidéprotonée sur le carboxyle et l'hydroxyle en para.

Les spectres des deux 1^{ères} formes (l'acide chlorogénique totalement protoné et monodéprotoné sur la fonction acide) sont identiques, la troisième (l'espèce bidéprotonée) présente un maximum à 371 nm ; la forme totalement déprotonée de AC n'est pas accessible car une dégradation de la molécule est observée pour des pH supérieurs à 10 : on note une diminution de l'intensité de la bande à 371 nm et l'apparition simultanée d'un fond sur le spectre d'absorption.

Les valeurs de pKa précédemment obtenues ont permis d'évaluer la distribution des différentes formes protonées de l'acide chlorogénique en utilisant un logiciel commercial Hyss (Hyperquad Simulation and Speciation) (9). La Figure 5 présente l'évolution des quantités des 4 espèces issues de l'acide protoné.

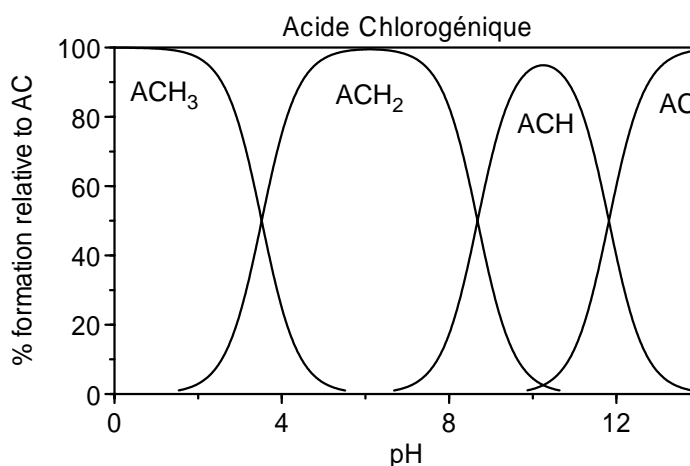


Figure 5 : Distribution des espèces de l'acide chlorogénique (9). ACH₃ est l'abréviation utilisé pour l'acide protoné, ACH₂ pour l'acide monodéprotoné sur la fonction carboxyle, ACH bidéprotoné sur le carboxyle et l'hydroxyle en para et AC pour la molécule entièrement déprotonée. La concentration de AC vaut 6.10^{-5} M.

En milieu aqueux à pH = 6, la forme monodéprotonée sur la fonction carboxylique de l'acide chlorogénique est très largement prépondérante.

1) Complexation de Al(III)

La complexation de l'aluminium (III) permet de différencier les divers composés cinnamiques ayant un groupement catéchol en position 3,4 grâce au décalage en longueur d'onde induit. Mais si les hydroxyles de la fonction catéchol sont substitués par des méthoxyles, la complexation ne le permet plus. Les effets bathochromes de la chélation avec Al(III) sont faibles : $\Delta\lambda = 32$ et 3 nm dans le méthanol ou l'éthanol (10), le site catéchol apparaît alors comme le site de formation du complexe. Des observations similaires ont été faites par RMN, où le déplacement chimique est significatif d'une complexation sur le catéchol et démontre également la présence d'espèces d'hydroxydes d'aluminium (11).

Dans notre cas dans un milieu aqueux à pH = 6, le spectre UV-visible de l'acide chlorogénique (Figure 6) est caractérisé par une bande intense localisée à 323 nm avec un épaulement à 295 nm et par une série de bandes entre 200 et 250 nm (à 217, 233 et 240 nm).

L'ajout d'une solution de chlorure d'aluminium à l'acide chlorogénique (Figure 6) provoque de fortes modifications du spectre de la molécule : la complexation se fait en deux temps :

jusqu'au rapport $R = \frac{[Al(III)]}{[AC]}$ de 0,6, les bandes à 217, 240 et 323 nm diminuent en intensité

en faveur de l'apparition de nouvelles bandes situées à 228, 263 et 350 nm. De plus, dans cette 1^{ère} partie un point isobestique à 336 nm montre la formation d'un seul complexe en équilibre avec la molécule libre. Au-delà de cette valeur de rapport, l'intensité de la bande à 350 nm diminue en faveur d'une autre bande dans les grandes longueurs d'onde autour de 370 nm. On constate pour des rapports élevés l'apparition d'un fond sur les spectres caractéristique de la diffusion due à la précipitation des espèces formées.

L'application de la méthode des rapports molaires, à 323 nm (Figure 7) met en évidence des complexes de stoechiométries 1:3, 1:2 et 2:1. Toutefois le premier complexe de stoechiométrie 1:3 n'est pas extrait du faisceau spectral par les méthodes chimiométriques appliquées pour l'obtention des spectres d'espèces pures ; celui-ci se forme en trop faible quantité.

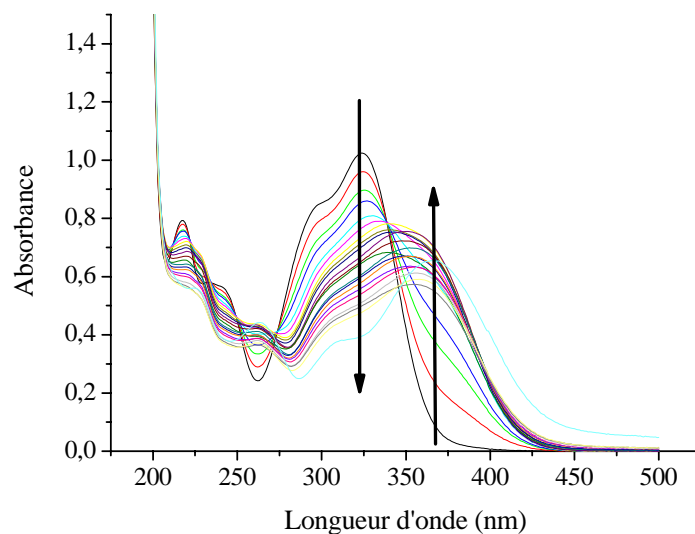


Figure 6 : Evolution des spectres UV-visible de l'acide chlorogénique $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans l'eau à $\text{pH} = 6$ par ajout de métal $\text{Al(III)} 6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ pour des rapports $[\text{Al}]/[\text{AC}]$ de 0 à 3,7.

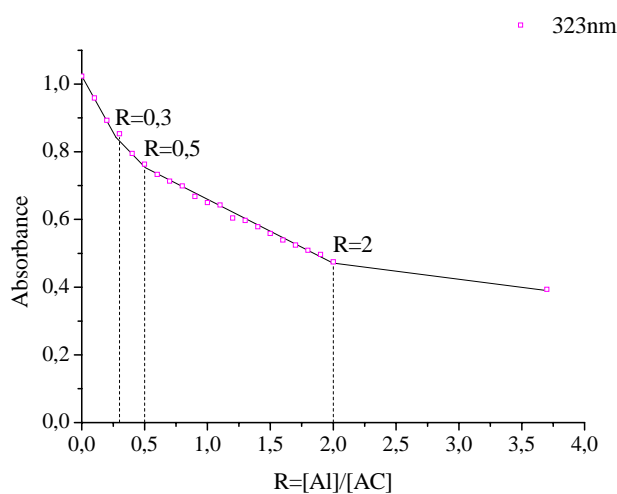


Figure 7 : Méthodes des rapports molaires appliquées aux spectres UV de la complexation de Al(III) par l'acide chlorogénique au maximum d'absorption du ligand libre (323 nm).

Les spectres des deux complexes de l'acide chlorogénique avec l'aluminium (III) montrent des maxima localisés respectivement à 358 et 395 nm pour les formes complexées Al(AC)_2 et $\text{Al}_2(\text{AC})$ (Figure 8). La valeur de ces maxima correspond bien aux changements observés sur le faisceau de spectres.

À partir des spectres d'espèces pures, les constantes de stabilité ont été estimées et le meilleur modèle donne respectivement : $\log\beta_{1:2} = 8,76 \pm 0,16$ et $\log\beta_{2:1} = 4,06 \pm 0,11$ pour $\text{Al}(\text{AC})_2$ et $\text{Al}_2(\text{AC})$. Les variations de concentration des différentes espèces par rapport à la quantité d'aluminium (III) ajoutée sont illustrées Figure 9.

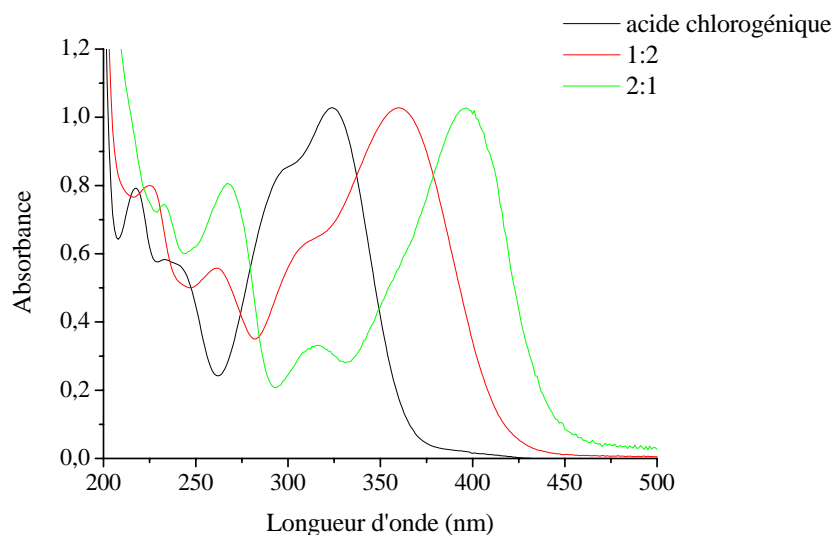


Figure 8 : Spectres UV-visible extraits du ligand libre et des complexes normalisés $\text{Al}(\text{AC})_2$ et $\text{Al}_2(\text{AC})$ à $\text{pH}=6$.

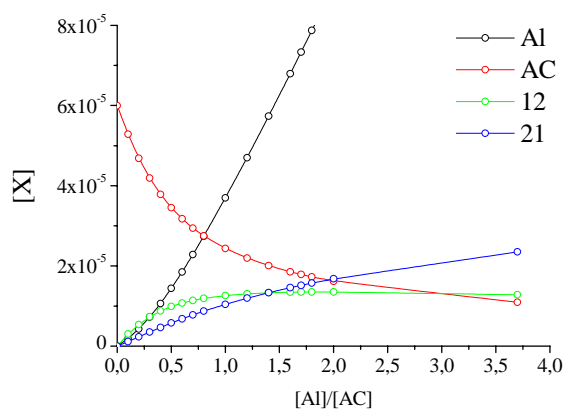


Figure 9 : Courbes de distribution des concentrations des différentes espèces au cours du dosage de l'acide chlorogénique par l'aluminium (III) à $\text{pH} = 6$.

Les courbes montrent bien que les deux complexes ne se forment pas dès le début de l'addition d'aluminium (III). La complexation du ligand n'apparaît qu'en faible quantité puisqu'à un rapport R de 1, seul 60% de l'acide est complexé. L'espèce 1:2 est prédominante dès le début de la réaction de dosage ; mais si la formation du complexe 2:1 est secondaire, elle dépasse celle du 1^{er} complexe à partir d'un rapport R = 1,5. Toutefois, la forme 1:2 a un rôle significatif dans le mécanisme de complexation de Al(III) en présence d'une faible quantité d'aluminium (III).

2) Complexation de Pb(II)

Les interactions entre l'acide chlorogénique et le plomb (II) sont peu étudiées dans la littérature ; beaucoup de publications relient les deux éléments (l'acide étant vu ici comme un élément issu du thé ou de plantes cultivées) cependant à ce jour aucune étude n'a donné les constantes de formation de ces complexes ni leurs stoechiométries.

La complexation du plomb (II) par l'acide chlorogénique à pH = 6 provoque peu de changements du spectre UV-visible de la molécule (Figure 10).

La bande caractéristique à 323 nm est peu affectée par l'ajout de plomb (II), seule une faible diminution d'intensité est à noter. En revanche la zone des courtes longueurs d'onde 200-250 nm est celle où se produisent les modifications les plus importantes : une très forte augmentation d'intensité vers 225 nm modifie l'allure du spectre notamment des deux bandes de l'acide chlorogénique à 233 et 240 nm. La complexation du plomb (II) fait également apparaître une nouvelle bande de longueur d'onde légèrement inférieure à 400 nm.

Les stoechiométries trouvées par la méthode des rapports molaires aux maxima de l'acide chlorogénique (323 nm) et de sa forme complexée (214 nm) sont 2:3 (complexe 2Pb:3AC), 1:1 (Pb:AC) et 2:1 (2Pb:AC)(Figure 11).

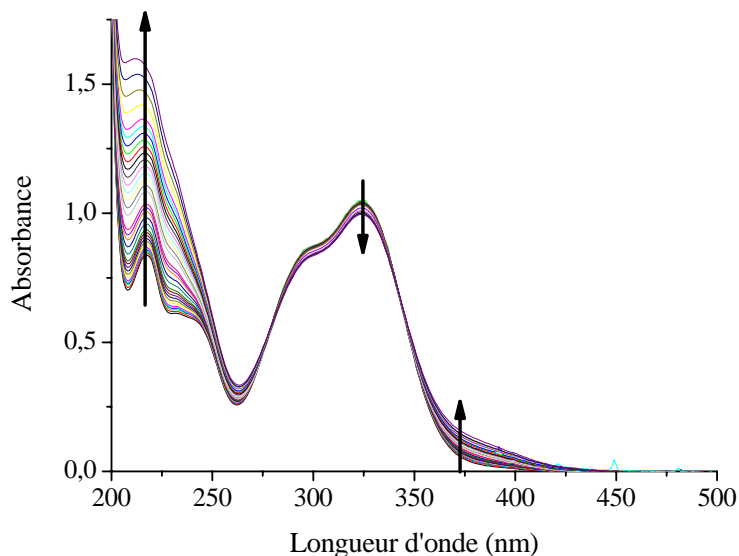


Figure 10 : Evolution des spectres UV de l'acide chlorogénique $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans l'eau à $\text{pH} = 6$ par ajout de métal Pb(II) pour des rapports $R = [\text{Pb}]/[\text{AC}]$ de 0 à 2.5.

À partir des spectres UV-visible, la détermination du nombre d'espèces absorbantes déterminantes a été estimée par la méthode EFA. Trois composants distincts se sont avérés correspondre à l'acide chlorogénique libre et à ses formes complexées 1:1 et 2:1. Les spectres d'absorption électronique de ces différentes espèces sont présentés Figure 12.

Les spectres UV-visible du complexe 1:1 et de l'acide chlorogénique s'avèrent tous deux identiques. Pour estimer la constante de stabilité du complexe, un traitement numérique des spectres électroniques a été effectué à l'aide du logiciel Specfit (12). Le modèle donnant les meilleurs ajustements avec les données expérimentales donne des valeurs de constante de stabilité : $\log\beta_{1:1} = 3,39 \pm 0,21$ et $\log\beta_{2:1} = 7,12 \pm 0,09$.

Les variations de concentration des différentes espèces par rapport à la quantité de plomb (II) ajoutée sont illustrées Figure 13.

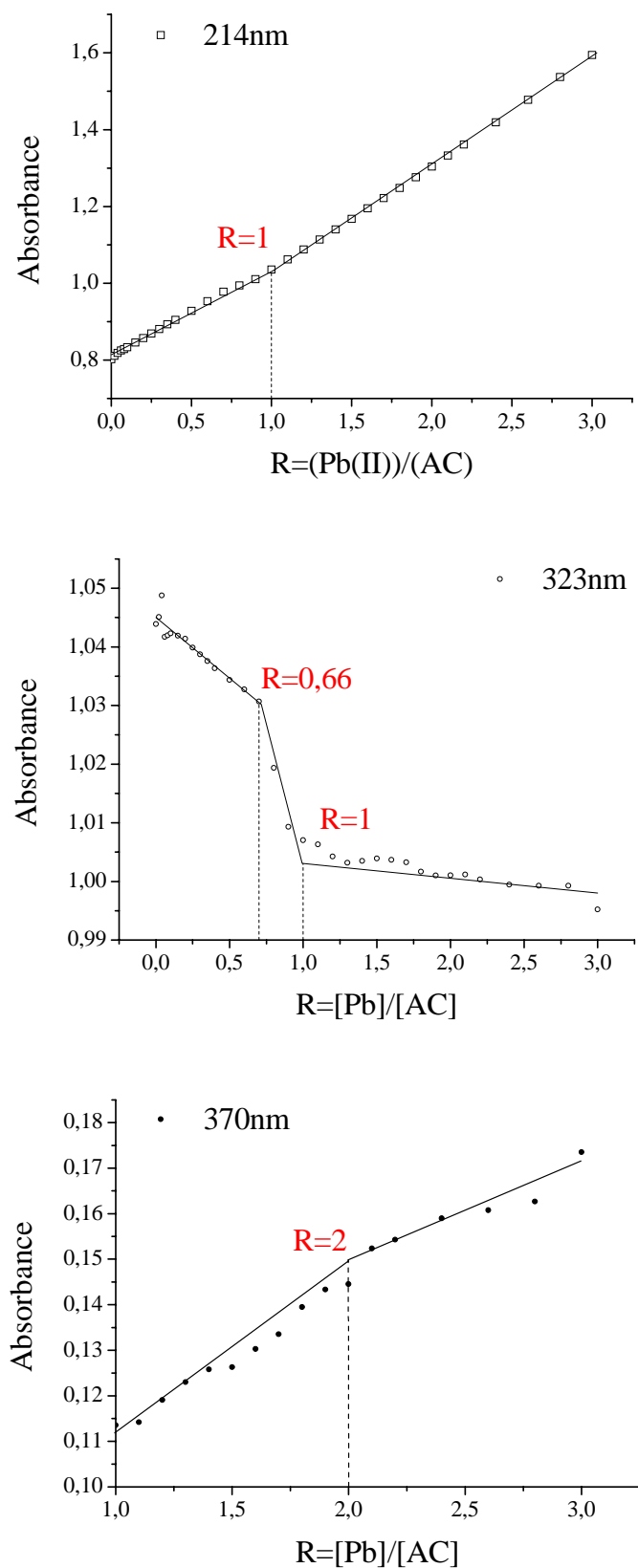


Figure 11 : Méthodes des rapports molaires appliquées aux spectres UV-visible de la complexation de Pb(II) par l'acide chlorogénique aux maxima d'absorption de l'acide (323 nm) et de sa forme complexée (214 nm).

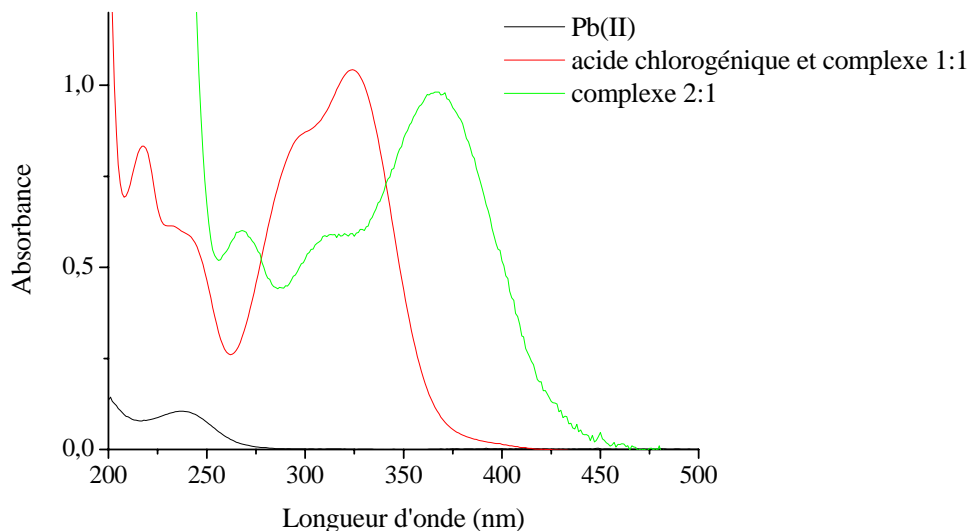


Figure 12 : Spectre expérimental de l'acide chlorogénique (AC) et de $Pb^{2+} 6.10^{-5}M$, et spectres extraits par traitement numérique du complexe 1:1 à $pH=6$.

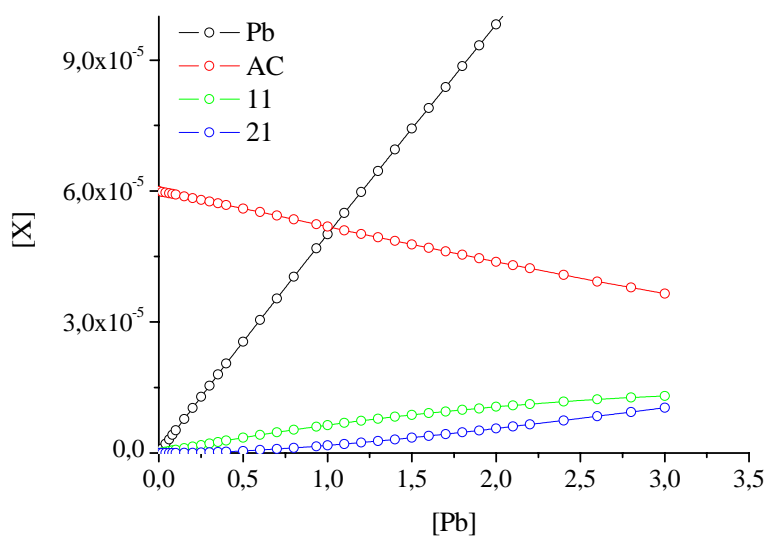


Figure 13 : Courbes de distribution des concentrations des différentes espèces au cours du dosage de l'acide chlorogénique par le plomb (II) à $pH = 6$.

Ces courbes révèlent que la formation de complexe reste faible même à des rapports de 3. Pour un rapport $R = 1$, à peine 15% de l'acide chlorogénique est complexé contre 60% dans le cas de la complexation de $Al(III)$. L'acide chlorogénique se révèle un moins bon complexant pour le plomb (II) que pour l'aluminium (III) : cela se révèle tant au niveau des

stoechiométries des complexes formés qu'au niveau des quantités d'acide impliqué dans la complexation.

3) Complexation de Zn (II)

La littérature rapporte que le zinc (II) a une faible capacité de fixation avec l'acide chlorogénique : une étude potentiométrique (2) a montré que Zn(II) forme des complexes de stoechiométrie 1:2 et 1:1 dans des conditions basiques.

Dans notre étude, lors de la complexation du zinc (II) par l'acide chlorogénique à pH = 6, les spectres présentés Figure 14 ont été obtenus en ajoutant des quantités croissantes de chlorure de zinc.

L'addition d'une quantité croissante de Zn(II) à la solution d'acide induit une diminution de l'intensité de la bande à 323 nm relative au composé libre et l'apparition d'une nouvelle bande située entre 360 et 400 nm dont l'absorbance augmente avec la quantité d'ion métallique. La série de spectres présente deux points isobestiques à 339 et 275 nm, ce qui signifie que seules deux espèces coexistent en solution (l'acide et un unique complexe).

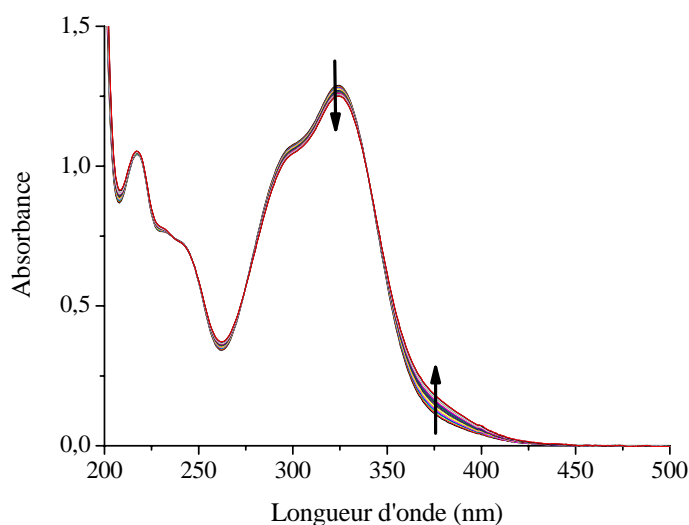


Figure 14 : Evolution des spectres UV de l'acide chlorogénique $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ à pH = 6 par ajout de Zn(II) $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ du rapport $R = [Zn]/[AC]$ 0 à 2,5.

Les résultats de la méthode des rapports molaires appliquée à 378 nm (maximum de la nouvelle bande, Figure 15) présentent une rupture de pente pour une valeur R égale à 0,5, indiquant la formation d'un complexe de stoechiométrie 1:2, mais également d'un complexe 2:1. Ce résultat semble contradictoire avec la présence des points isobestiques.

Cependant les différents tests réalisés par les méthodes chimiométriques (détermination du nombre d'espèces absorbantes par méthode EFA, simulation du dosage) montrent que le spectre du complexe 1:2 est identique à celui de l'acide chlorogénique.

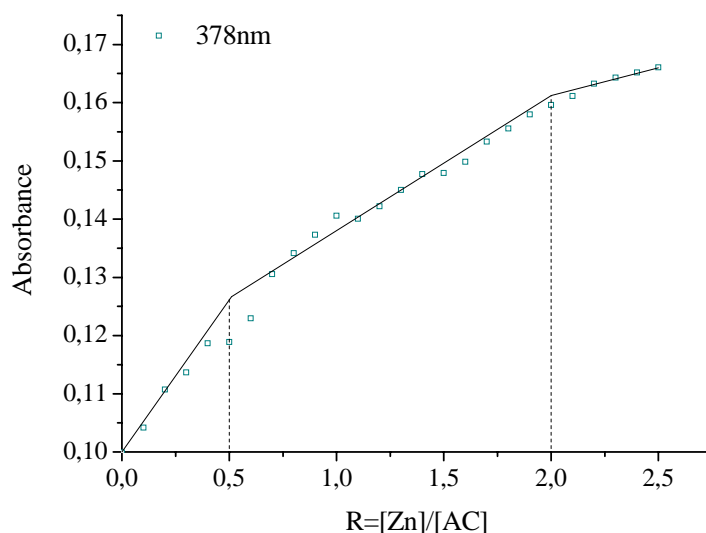


Figure 15 : Méthodes des rapports molaires appliquées aux spectres UV de la complexation de Zn(II) par l'acide chlorogénique au maximum d'absorption de la forme complexée de l'acide (378 nm).

Le spectre du second complexe (2:1) a été extrait du faisceau UV-visible et l'ensemble des spectres d'absorption électroniques des différentes espèces pures est présenté Figure 16.

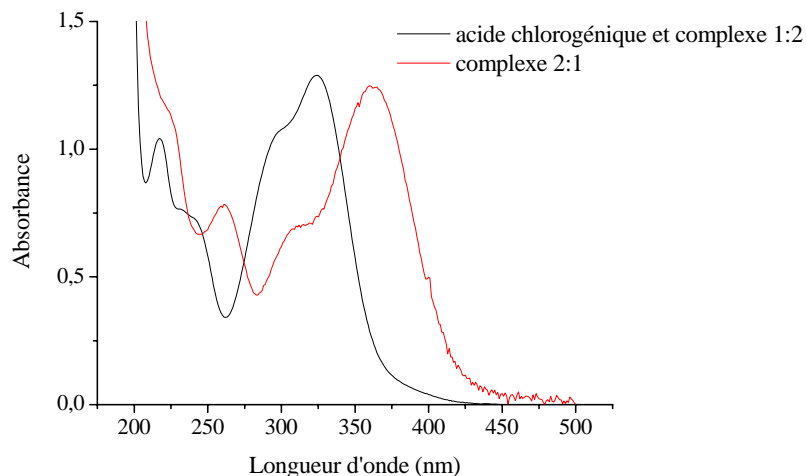


Figure 16 : Spectres UV-Visible de l'acide chlorogénique libre et de ses complexes avec le zinc (II) extrait en utilisant la méthode EFA.

Le spectre de l'espèce 2:1 a un maximum bien distinct de celui de la molécule libre (366 nm soit un déplacement spectral de 43 nm). À partir de ces spectres d'espèces pures, les constantes de stabilité ont été estimées et le meilleur modèle donne : $\log\beta_{1:2} = 6,30 \pm 0,08$ et $\log\beta_{2:1} = 6,52 \pm 0,03$. Les variations de concentration des différentes espèces par rapport à la quantité de zinc ajoutée sont illustrées Figure 17.

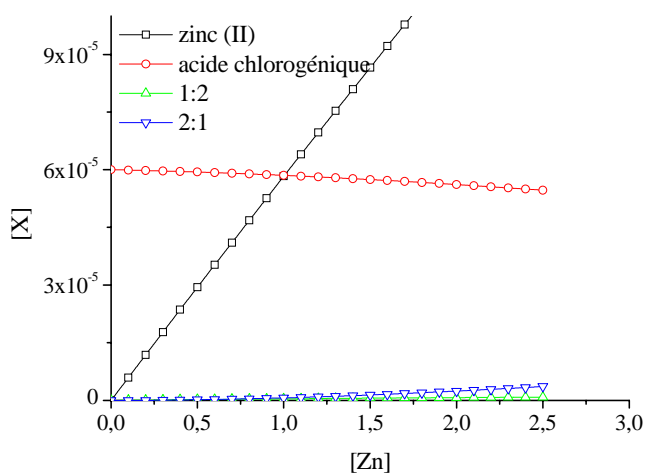


Figure 17 : Courbes de distribution des concentrations des différentes espèces au cours du dosage de l'acide chlorogénique par le zinc (II) à pH = 6.

Les courbes de distribution montrent que la formation de complexes est très faible. Pour un rapport $R = 1$, 3% de l'acide chlorogénique est complexé contre 60% dans le cas de la complexation de Al(III) et 15% pour celle de Pb(II). Au rapport 2,5, 9% d'acide est complexé. Parmi les trois cations métalliques étudiés, Zn(II) est donc le moins complexé par l'acide chlorogénique.

4) Détermination du site impliqué dans la complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) de l'acide chlorogénique

a. Calculs théoriques des spectres de l'acide chlorogénique et de ses complexes

Dans la complexation des ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II) par l'acide chlorogénique à $\text{pH} = 6$, des complexes de stoechiométries 1:2 et 2:1 ont été mis en évidence dans le cas d'Al(III), 1:1 et 2:1 dans celui de Pb(II) et 1:2 et 2:1 pour la fixation de Zn(II).

Malheureusement, les méthodes de chimie théorique utilisées ne permettent pas d'effectuer des calculs pour des systèmes de haute stoechiométrie étant donné la taille du système étudié (1:2 dans notre cas). Cependant même si les calculs ne permettent pas de comparer les spectres extraits des complexes 1:2 formés entre AC et Al(III) ou Zn(II), de nombreux indices permettent de résoudre le problème.

Dans le cas de l'aluminium (III), l'effet bathochrome engendré et les stoechiométries observés concordent avec des études parues dans la littérature, où des expériences de RMN notamment, permettent de conclure que le site catéchol de l'acide chlorogénique est impliqué dans les complexes de haute stoechiométrie (10, 11).

En ce qui concerne la complexation du plomb (II), des études théoriques ont été réalisées afin de déterminer la fonction impliquée en premier dans la complexation de l'acide chlorogénique. Des calculs sur l'acide monodéprotoné (carboxylate) noté AC^- ont permis d'identifier les orbitales moléculaires mises en jeu dans la transition correspondant à la bande

d'absorption à 324 nm afin de les comparer à celles impliquées dans le cas des complexes $[\text{AcPb}]_{\text{mono}}^+$, $[\text{AcPb}]_{\text{bi}}^+$ et $[\text{AcPb}]^0$ respectivement où le plomb est coordonné en monodentate sur le site acide, en bidentate sur le site acide et en bidentate sur le catéchol.

Dans un premier temps, l'optimisation des géométries de AC^- et de ses complexes $[\text{AcPb}]_{\text{mono}}^+$, $[\text{AcPb}]_{\text{bi}}^+$ et $[\text{AcPb}]^0$ a été faite par DFT ; puis à partir des conformations les plus stables (énergie la plus basse), un traitement TD-DFT a été appliqué pour obtenir les longueurs d'onde des différentes transitions électroniques des complexes (Figure 18). Les calculs ont été réalisés avec la base 6-31G(d,p) associée à la fonctionnelle B3LYP en incluant les fonctions de polarisation et un pseudo-potential pour décrire l'atome de plomb (double- ξ LANL2DZ). Les effets de solvant ont été introduits par la méthode SCRF via le modèle PCM.

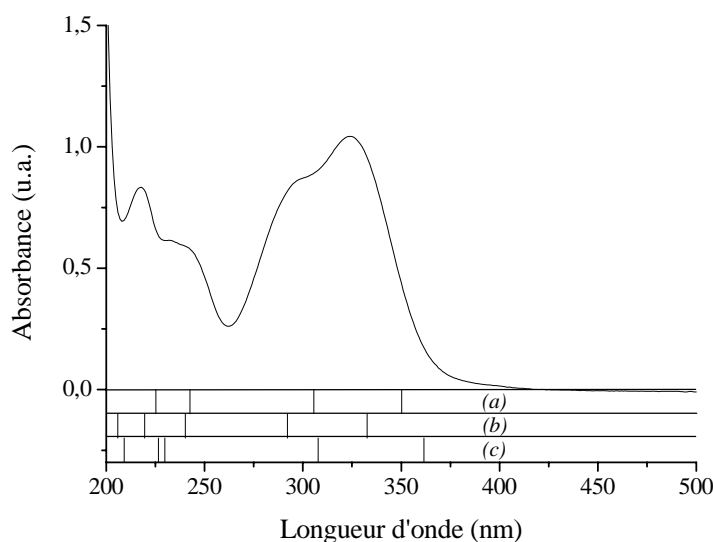


Figure 18 : Spectre expérimental du complexe 1:1 entre l'acide chlorogénique et Pb(II) et transitions électroniques calculées (représentées par des traits verticaux) pour celui-ci. Les différents tests ont permis de vérifier la coordination du plomb (hydratation et chélation en mono ou bidentate). Calcul effectué avec (a) $\text{Pb}(\text{H}_2\text{O})_4$ en monodentate sur l'acide : $[\text{AcPb}]_{\text{mono}}^+$; (b) $\text{Pb}(\text{H}_2\text{O})_3$ en bidentate sur l'acide : $[\text{AcPb}]_{\text{bi}}^+$ et (c) $\text{Pb}(\text{H}_2\text{O})_3$ en bidentate sur le catéchol : $[\text{AcPb}]^0$.

Le spectre du complexe 1:1 extrait à partir du faisceau de spectres UV-visible de la complexation entre l'acide chlorogénique et Pb(II) est présenté Figure 18. La bande à 324 nm

est calculée à 350 nm ($[\text{AcPb}]_{\text{mono}}^+$), 332 nm ($[\text{AcPb}]_{\text{bi}}^+$) et 362 nm ($[\text{AcPb}]^0$) ; ce résultat montre clairement que le premier site impliqué est l'acide et que la fixation de Pb(II) a lieu en mode bidentate. De la même manière la bande à 295 nm est beaucoup mieux reproduite par le calcul pour $[\text{AcPb}]_{\text{bi}}^+$.

Les transitions électroniques correspondant au spectre du complexe 2:1 (noté $[\text{AcPb}_2]^+$) ont elles aussi été calculées en fixant un ion Pb^{2+} sur chacun des sites (Figure 19) : l'excellente adéquation entre les longueurs d'onde calculées et expérimentales confirme la bonne concordance du modèle appliqué par méthode chimiométrique à la complexation du plomb (II).

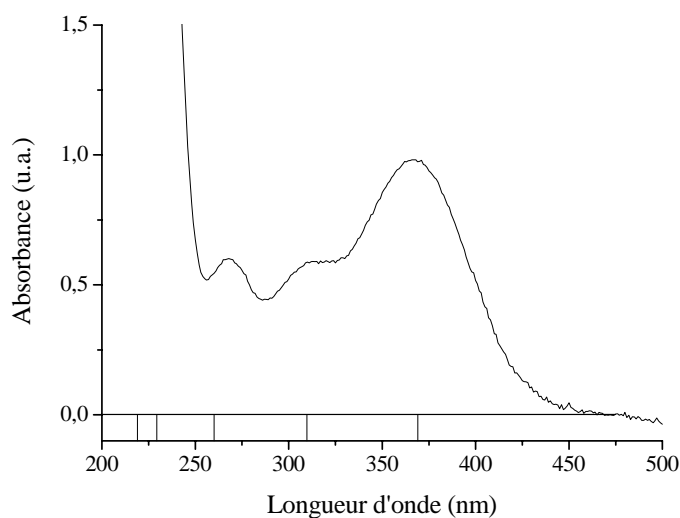


Figure 19 : Spectre expérimental du complexe 2:1 entre l'acide chlorogénique et Pb(II) et transitions électroniques calculées (représentées par des traits verticaux). Les sites acide et catéchol de l'acide chlorogénique sont complexés par un plomb hydraté par trois groupes H_2O .

La bande d'absorption observée dans le domaine des grandes longueurs d'onde des espèces AC^- , $[\text{AcPb}]_{\text{bi}}^+$ et $[\text{AcPb}_2]^+$ correspond majoritairement à la transition HOMO→LUMO. La représentation des orbitales moléculaires impliquées est donnée Figure 20.

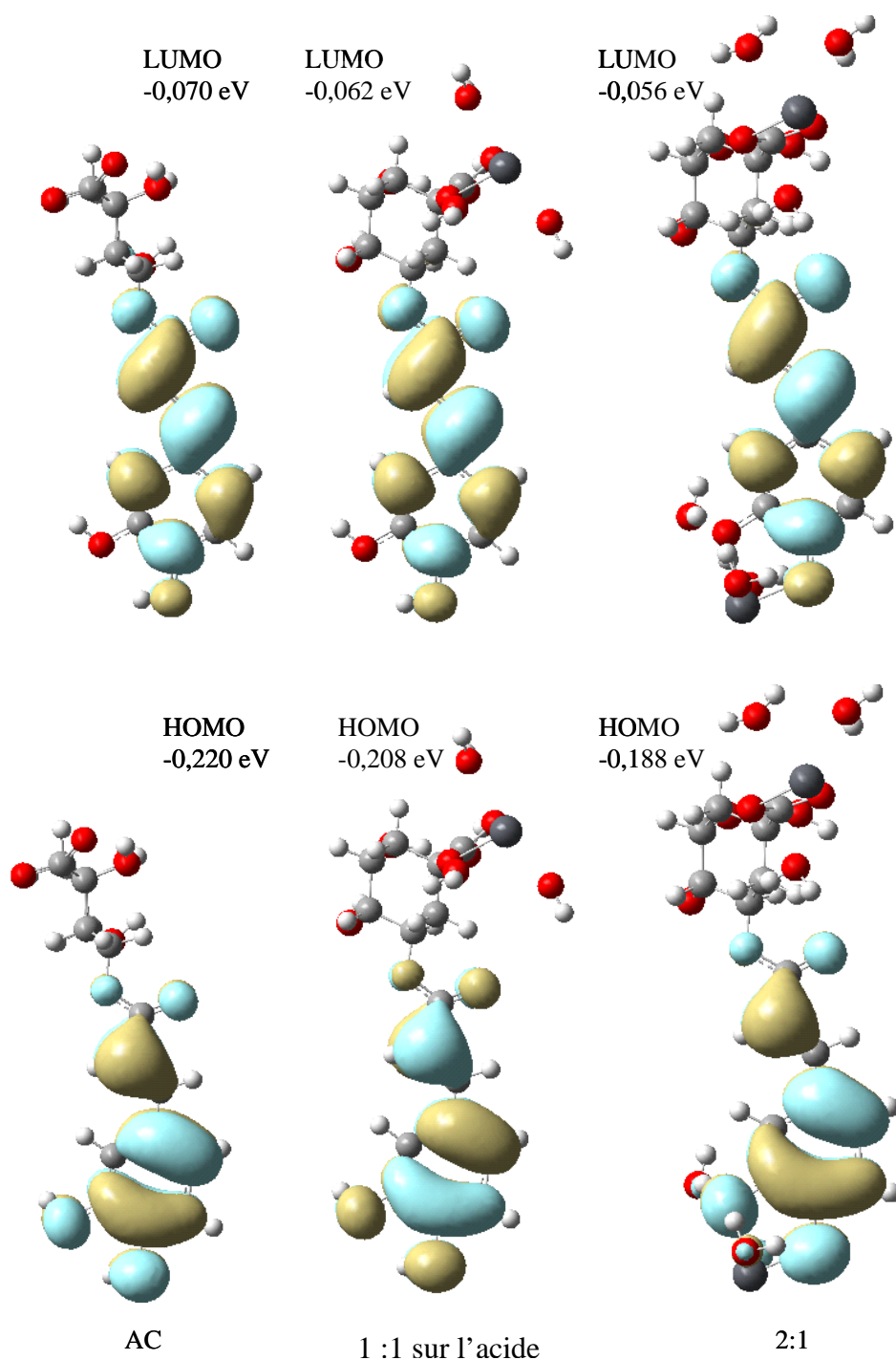


Figure 20 : Représentation des orbitales moléculaires calculées pour l'acide chlorogénique et ses complexes 1:1 (avec le plomb coordonné à la fonction acide) et 2:1.

Les orbitales HOMO des trois espèces sont très similaires et sont principalement localisée sur le cycle benzénique et la chaîne carbonée de l'acide chlorogénique, partie où la délocalisation électronique est la plus grande. Les orbitales LUMO sont elles aussi très proches pour AC^- ,

$[\text{AcPb}]_{\text{bi}}^+$ et $[\text{AcPb}_2]^+$: la charge est répartie dans les mêmes zones que l'HOMO mais plus centrée sur la chaîne entre les deux cycles de la molécule. La transition HOMO→LUMO n'est donc pas un transfert de charge ligand/métal mais un transfert de charge au sein du ligand.

b. Spectroscopie Raman des complexes de l'acide chlorogénique

Les spectres Raman ont été enregistrés en solution sur des mélanges d'acide chlorogénique et de cations métalliques à des rapports où le maximum de complexe est formé selon les courbes de concentrations obtenues par méthode chimiométrique. Ces solutions ont été excitées à la longueur d'onde de 785 nm (Figure 21).

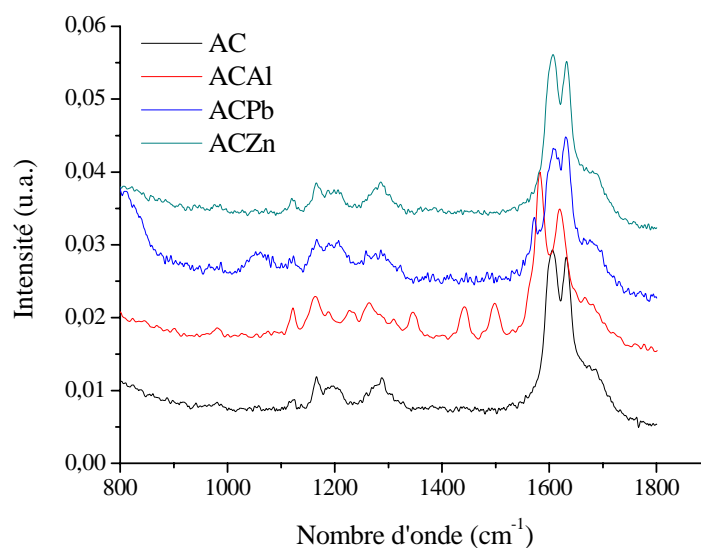


Figure 21 : Spectres Raman ($\lambda_{\text{exc}}=785\text{nm}$) des solutions complexées d'ion métallique et d'acide chlorogénique $\text{pH} = 6$, $R = [\text{Me}]/[\text{AC}] = 1$, $[\text{AC}] = 10^{-3}\text{M}$.

Le spectre Raman de l'acide chlorogénique en solution présente deux raies très intenses à 1606 et 1633 cm^{-1} . Les modes de vibration correspondants sont respectivement calculés à 1610 et 1626 cm^{-1} (valeurs corrigées d'un facteur 0,98). En adoptant la notation de Wilson

(13, 14), la raie à 1606 cm^{-1} peut-être attribuée au mode 8a du cycle benzénique couplé aux déformations dans le plan des groupement hydroxyyles du catéchol. La raie observée à 1633 cm^{-1} correspond quant à elle, au mode 8b de ce même cycle avec un couplage identique (Figure 22).

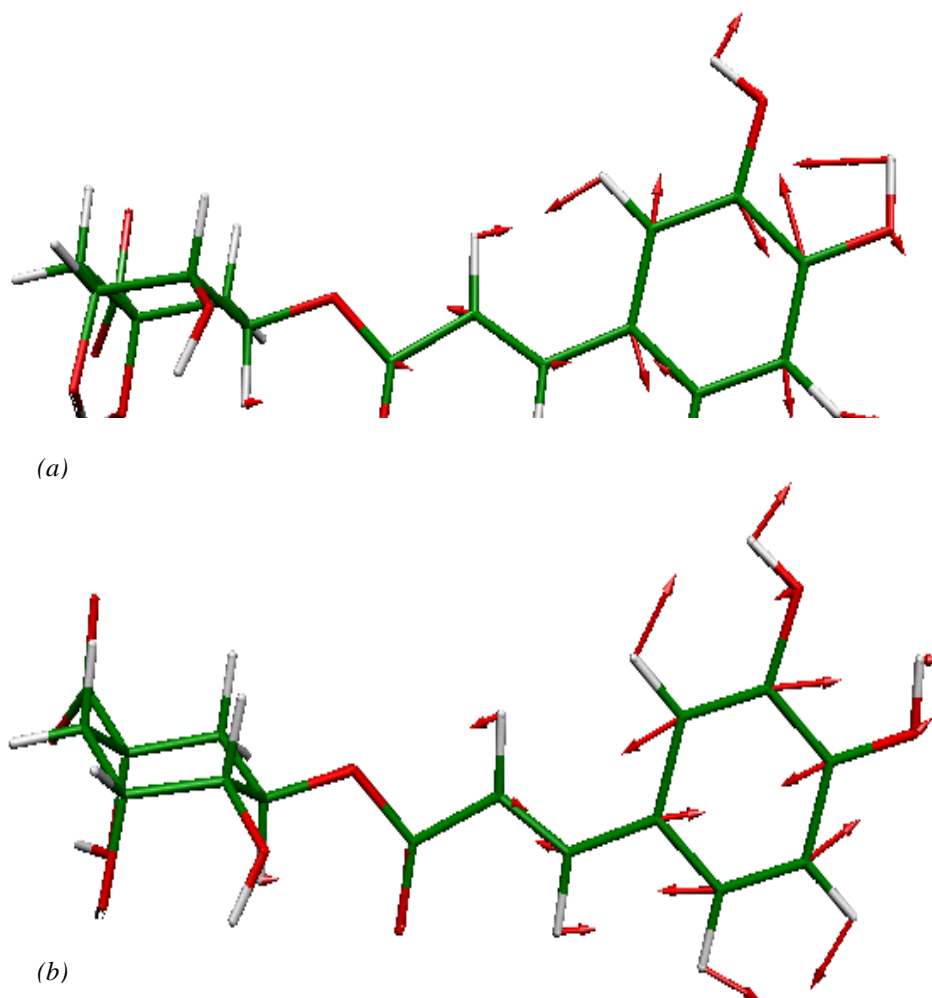


Figure 22 : Représentations schématiques des mouvements atomiques intervenant dans les modes normaux de vibration 8a (a) et 8b (b) de l'acide chlorogénique.

Il paraît évident que la fixation d'un ion métallique au niveau de la fonction catéchol, accompagnée d'une double déprotonation des hydroxyyles va induire des modifications dans les couplages mécaniques de ces modes et par conséquent des modifications sensibles des fréquences observées. Dans le cas de la complexation avec Al(III), les modes 8a et 8b présentent des fréquences beaucoup plus basses : respectivement 1585 et 1621 cm^{-1} , ce qui

confirme une complexation de Al(III) sur le site catéchol. Dans le cas de Pb(II) ou Zn(II), les raies correspondant aux modes 8, enregistrées pour leur complexe en solution, ont exactement la même fréquence que celles du ligand libre; ce qui montre que la fonction catéchol n'est pas impliquée pour ces deux ions métalliques.

Les résultats obtenus par spectroscopie Raman confirment donc la fixation de Al(III) sur le catéchol tandis que les ions Pb(II) et Zn(II) se fixent de manière préférentielle sur la fonction carboxylate de l'acide chlorogénique.

III. Complexation de l'acide gallique

L'acide gallique est un composé naturel très répandu de la classe des polyphénols : il se trouve dans beaucoup d'espèces de bois (comme les chênes) (15). Il est un maillon des tanins hydrolysables (esters de l'acide gallique), une des trois familles des phénols polymérisés (16, 17) (cf. Chapitre III). Cet acide présente une très grande activité antioxydante (18) et une forte affinité pour former des complexes (19).

Les différents pKa de la molécule sont reportés dans le tableau suivant, les valeurs indiquées ont été obtenues par décomposition et ajustement des données de spectrométrie UV-visible. Ils sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature (20).

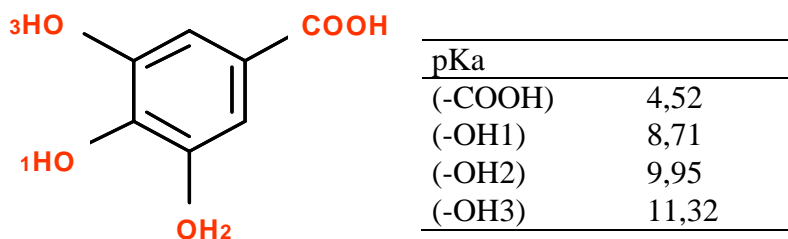


Figure 23 : Structure moléculaire de l'acide gallique avec ses pKa.

La distribution des espèces de l'acide gallique à la concentration d'étude est présentée Figure 24. A pH = 6, la forme monodéprotonée sur l'acide est fortement majoritaire.

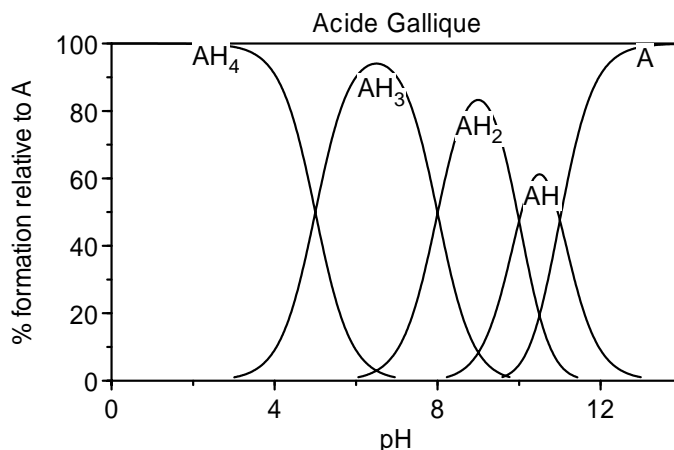


Figure 24 : Courbe de distributions des espèces de l'acide gallique (21). AH_4 désigne la forme protonée de l'acide gallique, AH_3 la forme monodéprotonée sur l'acide, AH_2 la forme bidéprotonée sur l'acide et l'hydroxyle en para, AH la forme tridéprotonée sur l'acide et deux hydroxyles en para et ortho et A la forme totalement déprotonée.

1) Complexation de Al(III)

a. Etude spectroscopique

Des études précédentes concernant la complexation de l'aluminium (III) par l'acide gallique ont montré que des chélates 1:1 (entre pH = 3 et 8,5) et 1:2 (pour des pH supérieurs à 8,5) ont été observés par potentiométrie (22). Il apparaît aussi que l'espèce hydratée $[Al(H_2O)_5(OH)]^{2+}$ est la plus réactive avec l'acide gallique et que les autres formes d'hydroxydes d'aluminium ont une influence minime à pH = 4 (23).

Le spectre d'absorption de l'acide gallique monodéprotoné présente deux bandes à 211 et 259 nm avec un épaulement vers 287 nm (1^{er} spectre du faisceau Figure 25). À pH = 6, l'ajout d'une solution d'aluminium (III) affecte l'intensité de toutes les bandes : la bande à 211 nm diminue en intensité et est déplacé à 214 nm avec l'apparition d'un épaulement à 230 nm. La bande à 259 nm, diminue aussi en intensité au profit d'une nouvelle bande à 283 nm avec laquelle un point isobestique à 270 nm est présent du début de la réaction jusqu'à un rapport $R = 0,7$; puis aucun point particulier n'est clairement visible et cette bande se décale vers 288 nm.

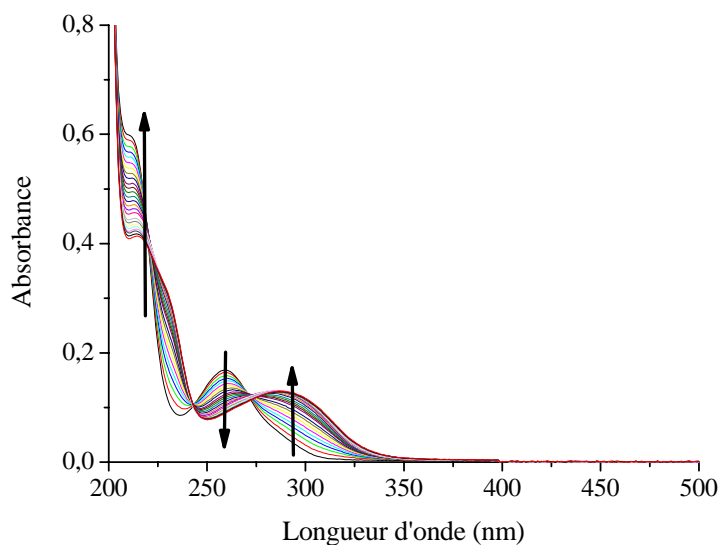


Figure 25 : Evolution des spectres UV de l'acide gallique par ajout de métal Al (III) $2.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ à pH = 6 pour différents rapports $R=[Al]/[AG]$ de 0 à 2,5.

La détermination des stoechiométries des formes complexées entre l'acide gallique et Al(III) donnent les valeurs 1:3, 1:1 et 3:2 (Figure 26). L'absorbance constante au delà d'un rapport 1,5 montre une saturation et que le maximum en fin de complexation est celui du dernier complexe trouvé.

La présence d'un point isobestique à 270 nm jusqu'à un rapport 0,7 implique que seul un complexe est en équilibre avec l'acide gallique et il paraît peu probable que le complexe 1:1 se forme aussi tardivement. Le spectre du 1^{er} complexe est donc non-extractible (ou identique à celui de l'acide gallique), effectivement les analyses chimométriques mettent en évidence que seul le spectre du complexe 1:1 est déterminant pour le bon ajustement entre le modèle théorique et les spectres expérimentaux. Les spectres des espèces pures sont donnés Figure 27, les valeurs de constantes de formation correspondantes valent $\log\beta_{1:1} = 7,49 \pm 0,14$ et $\log\beta_{3:2} = 13,40 \pm 0,19$.

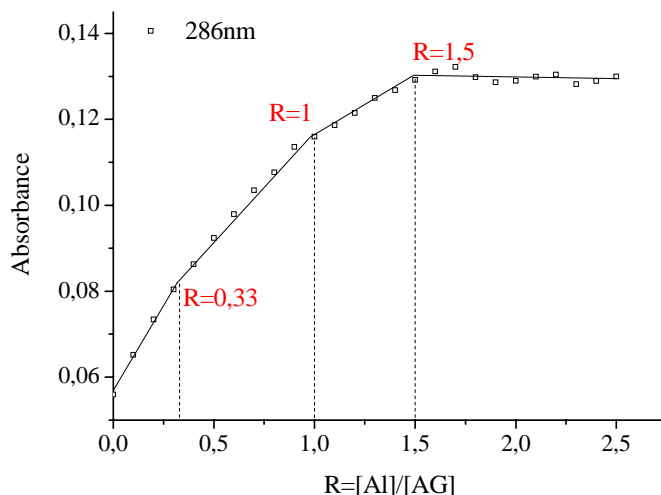


Figure 26 : Méthode des rapports molaires appliquée aux spectres UV-visible de la complexation de Al(III) par l'acide gallique au maximum d'absorption de la forme complexée (286 nm).

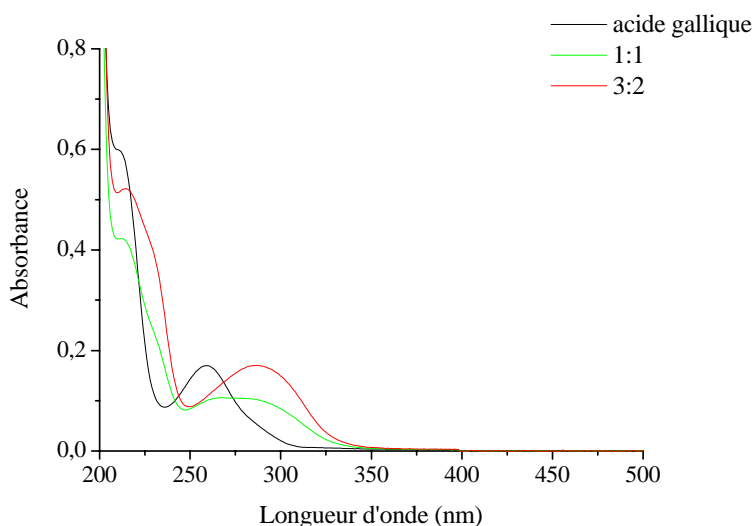


Figure 27 : Spectres UV-visible de l'acide gallique et de ses deux complexes extraits, en utilisant la méthode EFA.

La position du maximum du dernier complexe (3:2) extrait correspond effectivement à la position du dernier spectre du faisceau de spectre UV-visible (287 nm). Le spectre du complexe 1:1 a des bandes situées à 263 nm (décalage de la bande à 259 nm de l'acide) et à 285 nm. L'évolution des concentrations des espèces au cours du dosage (Figure 28) illustre que le complexe 1:1 est bien prédominant jusqu'à un rapport 0,75.

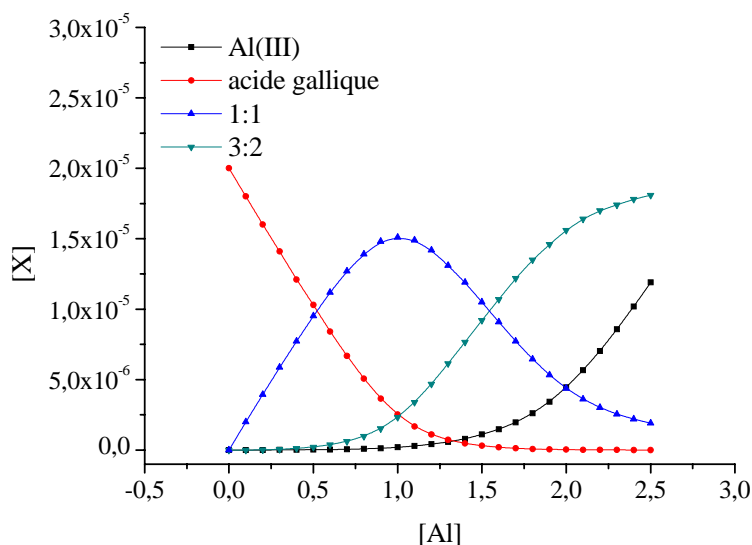


Figure 28 : Courbes de distribution en concentration des différentes espèces au cours du dosage de l'acide gallique par l'aluminium (III) à $\text{pH} = 6$, $C_{AG(i0)} = 2.10^{-5} \text{ mol/L}$.

Les courbes de variation de concentrations montrent qu'à un rapport R de 2,5, 99% de l'acide gallique a été complexé.

Dans la fixation de l'aluminium (III), au vu des valeurs de stoechiométries (1:3, 1:2 et 2:1 pour la complexation par l'acide chlorogénique et 1:3, 1:1 et 3:2 pour la complexation par l'acide gallique), les deux acides ont des pouvoirs chélateurs assez semblables pour cet ion métallique. Cependant les quantités de ligands libres à un rapport 2,5 sont plus élevées dans le cas de l'acide chlorogénique (40%), ce dernier est donc moins complexant que l'acide gallique.

b. Analyse théorique du complexe 1:1 entre l'acide gallique et l'aluminium (III)

Afin de déterminer quelle fonction est impliquée dans la complexation entre Al(III) et AG, des calculs théoriques ont été menés pour déterminer la structure et les spectres électroniques (et de vibration) du complexe 1:1 dont le spectre expérimental a pu être extrait précédemment (Figure 27).

Le spectre expérimental du complexe 1:1 présente une bande caractéristique à 213 nm avec un épaulement à 228 nm ainsi que deux autres bandes 265 et 285 nm. Les calculs ont été réalisés sur diverses structures du complexe 1:1 avec les formes suivantes pour l'aluminium : $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_4]^{3+}$ ou $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})]^{2+}$ coordonnée en bidentate soit sur le catéchol avec ou sans liaison hydrogène (Figure 29(a) et (b)) soit sur la fonction acide (Figure 29(c)). Les structures du ligand libre et de ses différentes formes complexées ont été optimisé (DFT / B3LYP) et les transitions électroniques calculées par TD-DFT en tenant compte des effets de solvant.

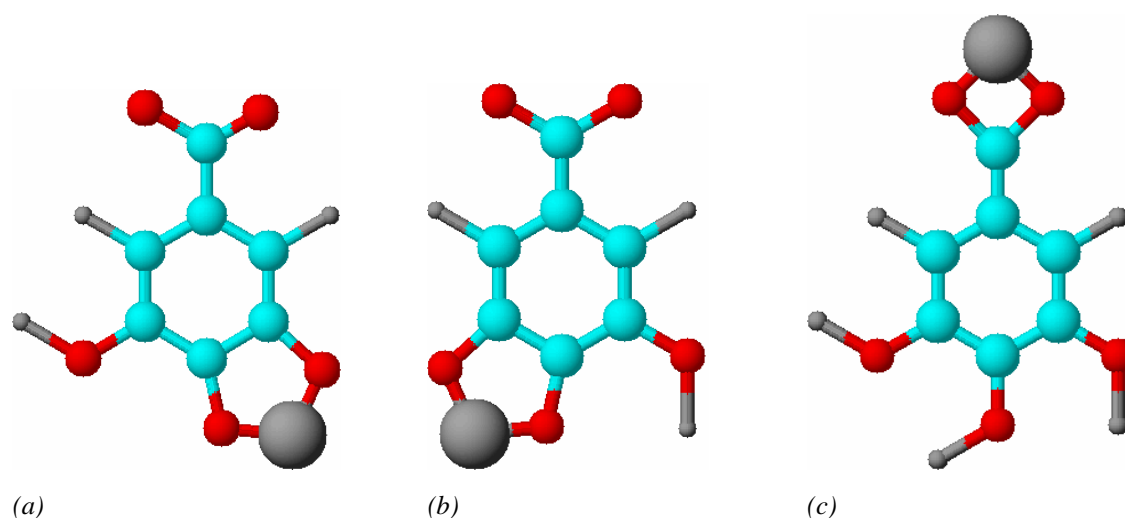


Figure 29 : Structures hypothétiques du complexe 1:1 entre l'acide gallique et Al(III) (a) Al coordonné au catéchol sans liaison hydrogène noté « catéchol 1 » (b) au catéchol avec liaison hydrogène noté « catéchol 2 » et (c) à la fonction acide carboxylique.

Le spectre de l'acide gallique est bien reproduit dans son ensemble (Figure 30) : les bandes situées à 212 et 258 nm sont calculées respectivement à 213 et 265 nm (représentées sur la figure par des traits verticaux). Les positions des transitions pour les complexes ont été calculées en gardant les mêmes paramètres.

Les spectres théoriques des différentes formes possibles pour le complexe 1:1 sont relativement proches (Figure 30). Cependant une coordination de l'aluminium (III) sur la fonction acide donne les moins bons résultats. En effet, les bandes observées à 265 et 285 nm, sont calculées à 303 ou 291 nm. De plus, l'épaulement à 228 nm n'est pas reproduit pour une coordination sur l'acide.

A l'opposé, les calculs effectués sur le complexe 1:1 coordonné au catéchol positionnent avec un décalage acceptable ces deux bandes ; le modèle contenant un aluminium coordonné sur le catéchol sans liaison hydrogène du troisième hydroxyle avec quatre molécules d'eau est le seul à reproduire les deux bandes en question (269 et 279 nm calculées pour des positions expérimentales de 265 et 285 nm).

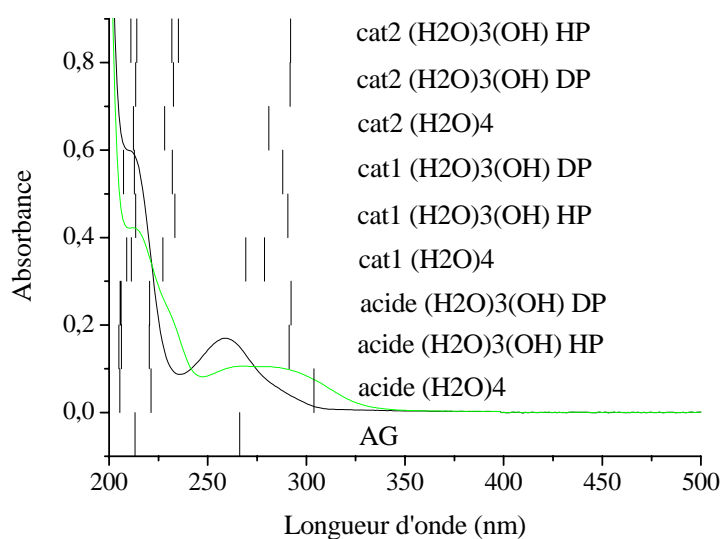


Figure 30 : Spectres expérimentaux de l'acide gallique et de son complexe 1:1 avec Al(III) et transitions électroniques calculées (représentées par des traits verticaux). Les abréviations « cat » ou acide désigne une coordination du métal sur la fonction catéchol ou acide et (H₂O)₄ ou (H₂O)₃(OH) l'état d'hydratation de l'aluminium (HP ou DP signifie hors ou dans le plan du ligand et concerne l'hydroxyle de la sphère de coordination de Al).

Enfin, les différentes données sur les structures testées convergent toutes pour conclure que le complexe 1:1 possède la forme présentée Figure 31 avec un aluminium coordonné au catéchol, de manière bidentate et que quatre molécules d'eau viennent compléter la coordination de Al(III).

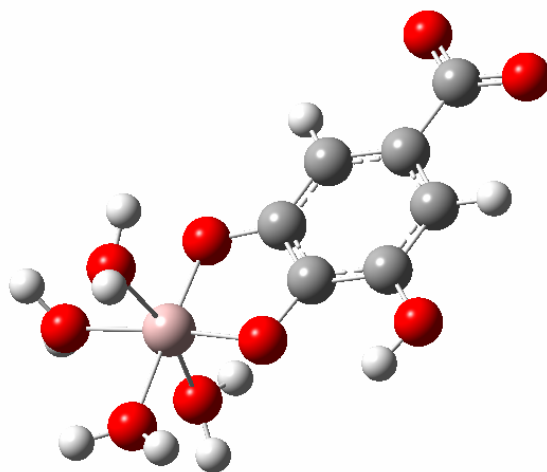


Figure 31 : Structure du complexe 1:1 mis en évidence par les calculs théoriques au vu du spectre expérimental UV-visible de ce dernier.

2) Complexation de Pb(II)

Des études RPE et potentiométrique couplées à des calculs DFT (24) semblent montrer que dans le cas de l'acide gallique, le plomb (II) forme deux complexes (1:1 et 1:2) et se lie pour le 1^{er} chélate à la fonction acide, tandis que le second implique également une fonction catéchol. Le pH de complexation optimal de Pb(II) par l'acide gallique est compris entre 5 et 7 ; au-delà des précipités se forment (25).

Dans notre étude, lors de la complexation de plomb (II), le spectre de l'acide gallique est modifié dans son ensemble (Figure 32) : en effet l'intensité de ses deux principales bandes diminue de manière quantitative ; cependant aucune nouvelle bande n'apparaît même si un fond vient s'ajouter au spectre du mélange et ce à partir d'un rapport R de 0,8. On note un léger décalage de la bande à 210 nm vers les plus grandes longueurs d'onde.

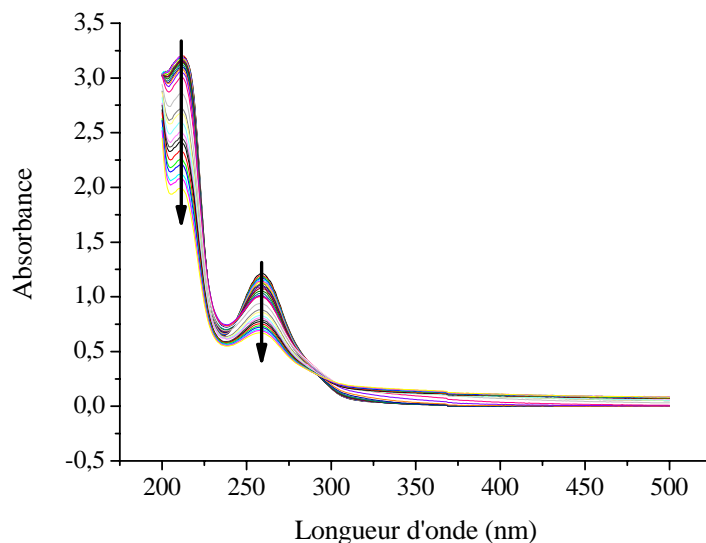


Figure 32 : Evolution du spectre UV-visible de l'acide gallique par ajout de métal Pb(II) $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ à pH = 6 pour des rapports $R = [Pb]/[AG]$ de 0 à 2,5.

Avant cette valeur seuil de rapport de 0,8, deux points isobestiques sont visibles à 293 et 243 nm bien que les modifications spectrales soient faibles. La méthode des rapports molaires tracée aux longueurs d'onde correspondant aux maxima d'absorption de l'acide (259 nm) et de sa forme complexée (210 nm) (Figure 33) met en évidence la formation d'un complexe de stoechiométrie 1:1.

La valeur de la constante de formation vaut $\log\beta_{1:1} = 4,48 \pm 0,05$. L'évolution des concentrations des espèces au cours du dosage (Figure 34) illustre que le complexe 1:1 se forme de manière non négligeable. A un rapport R de 2,5, il reste 24% d'acide gallique non complexé.

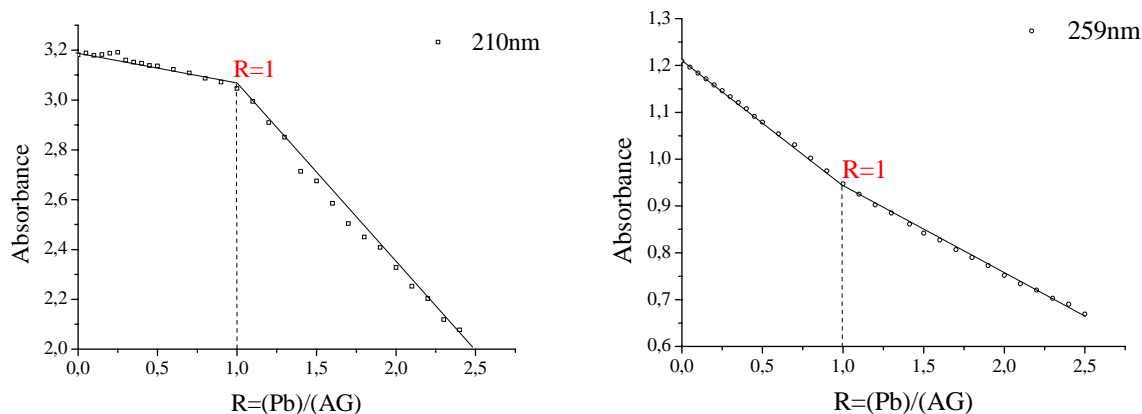


Figure 33 : Méthodes des rapports molaires appliquées aux spectres UV-visible de la complexation de Pb(II) par l'acide gallique au maxima d'absorption de l'acide (259 nm) et de la forme complexée (210 nm). On démontre ainsi la formation d'un complexe de composition $R = [Pb]/[AG] = 1$.

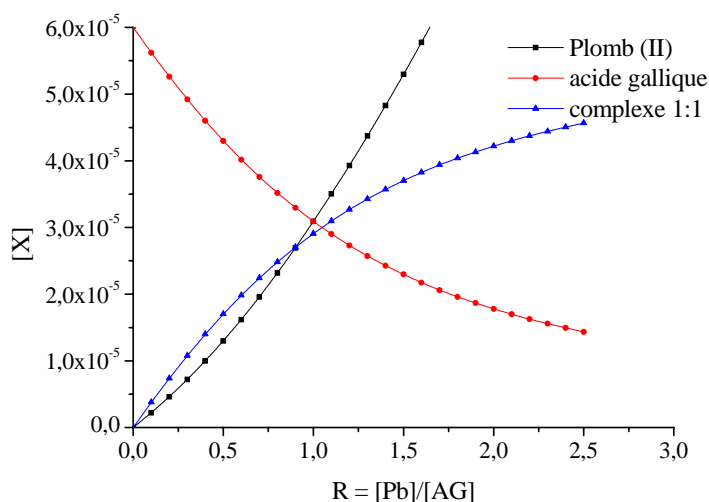


Figure 34 : Courbes de distribution en concentration des différentes espèces au cours du dosage de l'acide gallique par le plomb (II) à $pH = 6$, $C_{AG(0)} = 6.10^{-5} \text{ mol/L}$.

A ce niveau de l'étude, le site impliqué dans la formation du complexe peut être soit un des deux catéchols ou la fonction acide. Seul des calculs théoriques ou des expériences de spectroscopie de vibration peuvent résoudre la question.

3) Complexation de Zn (II)

Des données voltamétriques montrent que le zinc (ainsi que le sélénium (IV), et le nickel (II)) ne se coordine pas du tout à l'acide gallique (25). Cependant, dans certains cas on observe des complexes 2:1 à des taux élevés d'ions métalliques mais seulement dans de très faibles proportions (1:1000) (26).

Lors de l'ajout de zinc (II) à une solution d'acide gallique à pH = 6, aucune modification n'est observée sur le spectre UV-visible de l'acide (Figure 35).

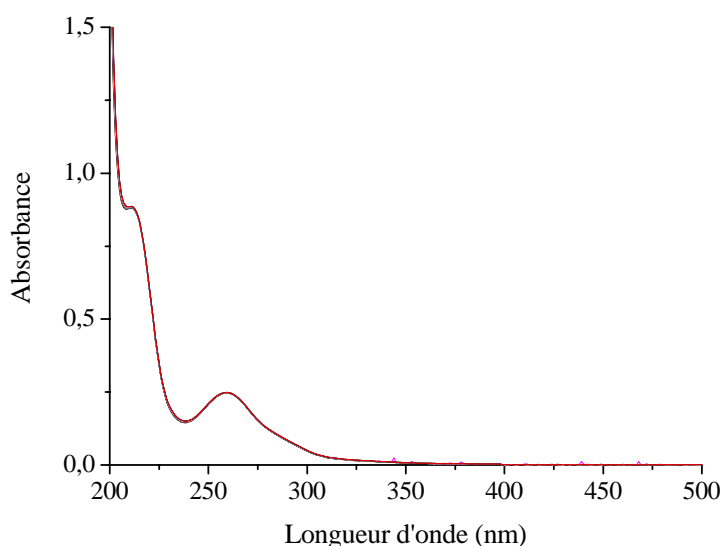


Figure 35 : Evolution du spectre UV-visible de l'acide gallique $6.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ à pH = 6 par ajout de métal Zn(II) $6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ du rapport $R = [\text{Zn}]/[\text{AG}]$ 0 à 2,5.

Précédemment, la complexation du même métal avec l'acide chlorogénique avait également montré que la fixation de Zn(II) se faisait avec difficulté mais dans le cas de l'acide gallique, comme il l'a été montré auparavant dans certaines publications, la complexation ne se produit quasiment pas.

4) Spectroscopie Raman des complexes de l'acide gallique

Les spectres Raman des cristaux de l'acide gallique et de ses complexes avec Al(III) et Pb(II) formés à pH = 6 sont présentés Figure 36.

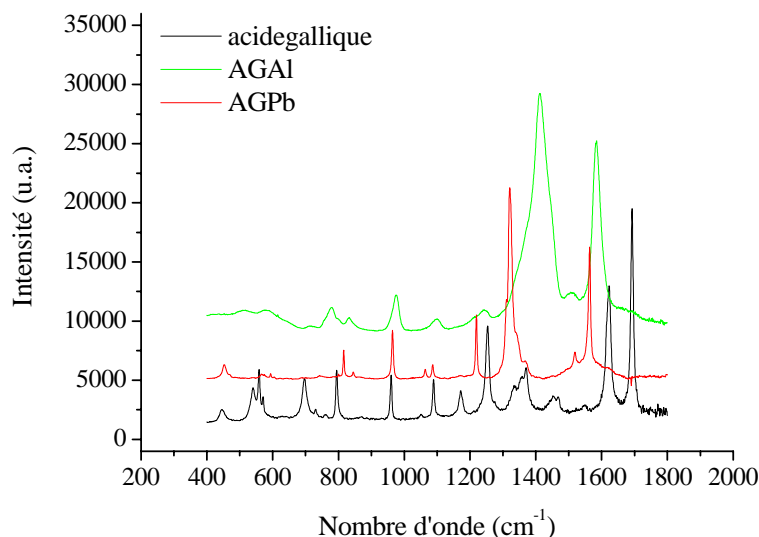


Figure 36 : Spectres Raman ($\lambda_{exc}=785nm$) des solides extraits des solutions complexées de métal et d'acide gallique pH = 6, $R = [Me]/[AG] = 1$, $[AG] = 10^{-3} M$.

Les solides ont été extraits à partir d'une solution aqueuse d'acide gallique 10^{-3} mol/L à pH = 6 seul ou mélangé soit à une solution d'aluminium (III) ou de plomb (II) dans un rapport [métal]/[ligand] de 1.

De très nombreuses différences apparaissent entre les spectres expérimentaux. Les bandes dues aux vibrations de cycle sont retrouvées sans déplacement notable sur les spectres des deux mélanges. Dans la zone autour de 1300 cm^{-1} caractéristique des vibrations de déformation des OH et d'élongation des CO des groupements phénoliques, les bandes de l'acide gallique se retrouvent sur le spectre du mélange AG-Pb et non sur celui du mélange AG-Al : les vibrations caractéristiques des catéchols de l'acide gallique sont donc perturbées dans la complexation de l'aluminium (III) et non dans celle du plomb (II).

Les nombreux changements entre les spectres des deux mélanges et l'étude théorique du complexe 1:1 (AG:Al) confirment la fixation de l'aluminium (III) sur un catéchol de l'acide gallique et du plomb (II) sur la fonction carboxylate.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons étudié la complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) par les acides chlorogénique et gallique. Ces deux ligands de structure différente possèdent chacun les sites de complexation acides et catéchol en compétition.

Les principaux résultats obtenus pour la complexation des cations métalliques sont regroupés dans le Tableau 2.

	AC				AG			
	stoechiométrie	log(β)	% AC libre à R=2,5	1 ^{er} site impliqué	stoechiométrie	log(β)	% AG libre à R=2,5	1 ^{er} site impliqué
Al(III)	(1:3)	-	24	catéchol	1:3	-	1	catéchol
	1:2	8,76			1:1	7,49		
	2:1	4,06			3:2	13,4		
Pb(II)	(2:3)	-	66	acide	1:1	4,48	24	acide
	1:1	3,39						
	2:1	7,12						
Zn(II)	1:2	6,30	90	acide	-	-	100	-
	2:1	6,52						

Tableau 2 : Stoechiométries et constantes de formation des complexes des acides chlorogénique et gallique avec Al(III), Pb(II) et Zn(II) formés à pH=6. Les pourcentages de ligand libre à un rapport [métal]/[ligand] de 2,5 ont été obtenus à partir de l'ajustement des modèles théoriques et expérimentaux par le logiciel Specfit.

Pour chacun des ions métalliques, les données recueillies permettent de déterminer lequel des deux ligands est le plus complexant : l'aluminium (III) est chélaté plus facilement par l'acide gallique que par l'acide chlorogénique. Par contre, cette tendance est inversé lorsqu'il s'agit des ions Pb(II) et Zn(II). Il faut noter que ce dernier se complexe difficilement avec l'acide chlorogénique et pas du tout avec l'acide gallique.

Quel que soit le ligand, le site préférentiel de fixation d'un cation donné est conservé. L'aluminium (III) formera un complexe prioritairement avec la fonction catéchol, tandis que Pb(II) et Zn(II) se fixe sur la fonction carboxylate à pH = 6. On observe cependant que

l'environnement moléculaire du site de fixation a une influence non négligeable sur sa capacité de complexation.

La connaissance de ces données permettra pour le chapitre VIII de prévoir et de comparer les comportements de ces deux acides de faible poids moléculaire en compétition avec l'acide humique dans la chélation des trois cations métalliques.

V. Bibliographie

1. Clifford, M. N. (2000) *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1033-1043.
2. Ameziane, J., Aplincourt, M., Dupont, L., Heirman, F., & Pierrard, J.-C. (1996) *Bulletin de la Societe Chimique de France* **133**, 243-249.
3. Méndez, J. & Lojo, M. I. (1968) *Microchemical Journal* **13**, 232-235.
4. Specfit Global Analysis System (1993-2002), ed. Spectrum Software Associates.
5. Adams, M. L., O'Sullivan, B., Downard, A. J., & Powell, K. J. (2002) *J. Chem. Eng. Data* **147**, 289-296.
6. Kiss, T., Nagy, G., Pecsí, M., Kozłowski, H., Micera, G., & Erre, L. S. (1989) *Polyhedron* **8**, 2345-2349.
7. Lamy, I., Seywert, M., Cromer, M., & Scharff, J. P. (1985) *Analytica Chimica Acta* **176**, 201-212.
8. Linder, P. W. & Voye, A. (1987) *Polyhedron* **6**, 53-60.
9. Hyperquad Simulation and Speciation (HySS2) © 2000 Protonic Software (2000).
10. Monties, B., Marie-Font, A., & Douillard, R. (1969) *Ann. Physiol. vég.* **11**, 313-339.
11. Nagata, T., Hayatsu, M., & Kosuge, N. (1992) *Phytochemistry* **31**, 1215-1218.
12. Specfit, G. A. S., ed. Associates, S. S.
13. Varsanyi, G. (1974) *Assignments for Vibrational Spectra of Seven Hundred Benzene Derivatives, Vol. 1.*
14. Wilson, E. B., Jr., Decius, J. C., & Cross, P. C. (1955) *Molecular Vibrations.*
15. Canas, S., Leandro, M. C., Spranger, M. I., & Belchior, A. P. (1999) *Journal of agricultural and food chemistry* **47**, 5023-5030.
16. Glombitza, K. W. & Gerstberger, G. (1985) *Phytochemistry (Elsevier)* **24**, 543-551.
17. Porter, L. J. (1989) *Methods in Plant Biochemistry* **1**, 389-419.
18. Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., & Toscano, M. (2004) *Journal of Physical Chemistry A* **108**, 4916-4922.

19. Mohammed-Ziegler, I. & Billes, F. (2002) *Theochem* **618**, 259-265.
20. IUPAC Stability Constants for Metal-Ion Complexes, P. B. (1979), ed. Pergamon (Oxford).
21. Hyperquad Simulation and Speciation (2000) (Protonic Software).
22. Amin, S., Maqsood, Z. T., & Kazmi, S. A. (1993) *Journal of the Chemical Society of Pakistan* **15**, 244-246.
23. O'Coinceanainn, M. & Hynes, M. J. (2001) *Journal of Inorganic Biochemistry* **84**, 1-12.
24. Giannakopoulos, E., Christoforidis, K. C., Tsipis, A., Jerzykiewicz, M., & Deligiannakis, Y. (2005) *Journal of Physical Chemistry A* **109**, 2223-2232.
25. Harrell, W. B., Deng, Y., Yu, X., & Wilson, R. F. (1994) in *Trace Substances, Environment and Health 27th*, ed. Cothorn, C. R. (Science Reviews, New Orleans).
26. Sandmann, B. J., Chien, M. H., & Sandmann, R. A. (1985) *Analytical Letters* **18**, 149-159.

Partie C

***Etude de la complexation d'un acide
humique***

Chapitre VI

Etude d'un acide humique et de ses interactions avec les ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II)

Chapitre VI

Etude d'un acide humique et de ses interactions avec les ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II).

I. Introduction.....	175
II. Caractérisation de l'acide humique utilisé	176
1) Analyse élémentaire.....	176
2) Caractérisation spectroscopique de l'acide humique.....	177
a. Spectroscopie de fluorescence.....	177
b. Détermination de l'acidité totale.....	180
c. Etude en fonction du pH.....	182
III. Interaction de l'acide humique avec les ions métalliques aluminium (III), plomb (II) et zinc (II)	187
1) Etat des connaissances sur les complexes métallo-humiques	187
2) Description usuelle des interactions métallo-humique en fluorescence.....	190
3) Complexation d'un cation métallique par l'acide humique à pH = 6.....	191
IV. Conclusion	196
V. Bibliographie	197

I. Introduction

Dans les milieux naturels, l'acide humique est souvent associé à des molécules organiques de petites tailles (1-4) dont il est lui même constitué (5, 6). Dans le but d'étudier ces interactions en présence ou non de métaux, une connaissance approfondie de l'acide humique utilisée est nécessaire.

Dans ce chapitre, est présentée l'étude d'un acide humique standard (IHSS référence 2S101H) et de ses propriétés complexantes vis-à-vis des ions métalliques préalablement étudiées. Dans un premier temps, nous examinerons les caractéristiques spectrales de cet acide et nous déterminerons, par la spectroscopie de fluorescence synchrone, l'offset le mieux adapté pour obtenir le maximum d'informations spectrales. Nous étudierons également l'évolution des spectres de fluorescence de cet acide en fonction du pH, de manière à mettre en évidence des zones d'émission caractéristiques d'un fluorophore ou de son environnement.

Nous essayerons de déterminer la meilleure décomposition spectrale possible qui fera intervenir toutes les bandes qui seront également observées lors des études de complexation.

Dans un deuxième temps, nous présenterons la complexation des ions Al(III), Pb(II) et Zn(II) par cet acide, afin d'évaluer le potentiel de rétention de la macromolécule et de classer ces métaux polluants selon leur affinité avec l'acide humique.

II. Caractérisation de l'acide humique utilisé

1) Analyse élémentaire

Dans la littérature, on note que la composition d'un acide humique est caractéristique de l'origine du produit (acide humique de forêt, de champs, de boues...) (7-10), ou encore du degré d'humification (11). Et bien que chaque acide humique soit différent de par sa nature, les propriétés que confèrent les sites d'adsorption de cette macromolécule rendent possible de tirer des conclusions générales à partir de l'étude approfondie d'un type d'acide. Les facteurs qui différencieront les AH seront le rapport $\frac{C}{N}$ (généralement relié au degré de dégradation du produit) et le taux d'impuretés qu'il contient.

L'acide humique utilisé au cours de notre étude est un acide humique standard (IHSS : International Humic Substances Society, référence 2S101H) de très haute pureté. Pour les objectifs que nous nous sommes fixés, la nécessité d'avoir un acide humique le plus pur possible était requis.

Pour modéliser les transferts dans les systèmes naturels en phase liquide, l'acide humique 2S101H est le mieux adapté à l'étude : effectivement outre sa pureté (aucune substances traces détectées), il présente l'avantage d'avoir une solubilité élevée quelque soit le pH. Cette solubilité est capitale dans nos études où nous nous intéressons à la phase en solution et ce facteur évite les soucis liés aux interactions multiphasiques. De plus, comme nous le verrons plus tard, l'acidité totale du produit (principal facteur de complexation d'un acide humique) est semblable à celles trouvées dans la littérature pour des acides humiques provenant de sol, sensiblement dans la moyenne de ce qui peut être obtenu dans la plupart des systèmes humiques (8).

L'analyse élémentaire de l'échantillon donne la composition suivante (Tableau 1). Aucune trace de la présence d'ions métallique n'a été observée et cette pureté est indispensable afin de ne pas avoir d'interactions avec des éléments traces au cours des différentes études réalisées avec cet acide.

C	H	O	N	S	P	Total	H ₂ O	cendres
52,63	4,28	42,04	1,17	0,54	0,013	100,6	-	1,04

Tableau 1 : Analyse élémentaire de l'échantillon d'acide humique IHSS. Les valeurs de chaque élément sont données en pourcentage massique. H₂O désigne le pourcentage massique d'eau dans l'échantillon à l'air libre. « cendres » est le % en masse de résidu inorganique dans un échantillon brûlé.

2) Caractérisation spectroscopique de l'acide humique

a. Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est une des techniques les plus utilisées pour l'étude des acides humiques (2, 12-15). En effet, les spectroscopies de vibrations donnent des spectres difficilement exploitables étant donné la trop grande quantité d'informations (spectroscopie infrarouge) qu'ils contiennent ou encore la largeur des bandes (spectroscopie Raman). La RMN ouvre des perspectives intéressantes mais n'est pas à l'heure actuelle une méthode efficace pour nous donner les renseignements exploitables comme l'observation des effets de compétition des ions métalliques ou des molécules modèles (16).

Une matrice émission excitation (MEE) de l'acide humique choisi a été enregistrée (Figure 1) et laisse apparaître quatre principaux massifs où l'intensité de fluorescence est importante (Tableau 2). Chaque massif peut être attribué à un type de fluorophores ou encore à la contribution simultanée de plusieurs fluorophores différents ayant des propriétés de fluorescence commune.

La littérature (7, 8, 17, 18) indique que les bandes de fluorescence dans le domaine des courtes longueurs d'onde d'émission sont typiques de composés de structures simples avec un faible degré de condensation et de conjugaison faible. Au contraire les bandes présentes dans le domaine des grandes longueurs d'onde d'émission sont attribuées à des systèmes aromatiques étendus ou des systèmes insaturés impliquant une conjugaison.

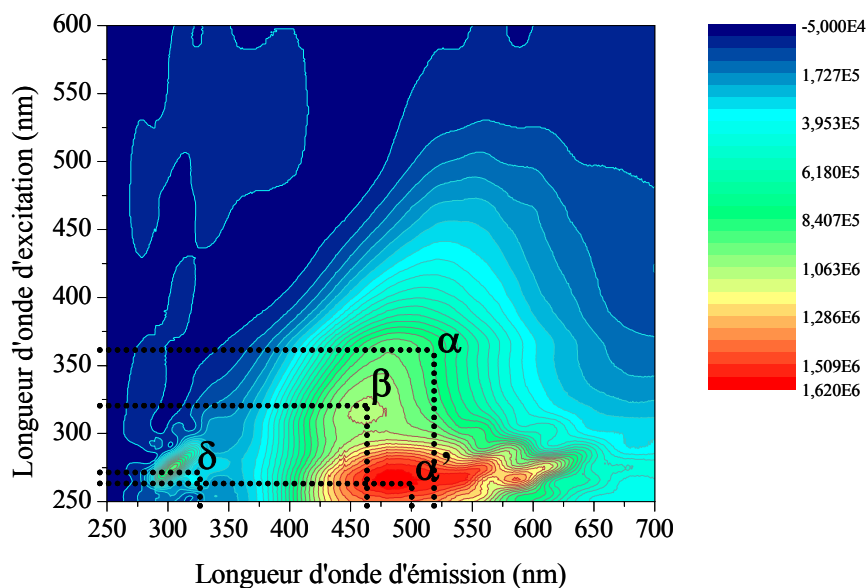


Figure 1 : Matrice Emission Excitation (MEE) de fluorescence de l'acide humique IHSS à pH = 6, $f_i = 0.1$ mol/L. $\lambda_{\text{émission}} = 250-700$ nm, $\lambda_{\text{excitation}} = 250-600$ nm.

	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)
α	365	520
α'	260	500
β	320	465
δ	275	325

Tableau 2 : Longueurs d'onde caractéristiques des principaux types de fluorophores présents dans la MEE de fluorescence de l'acide humique 10 mg/L à pH = 6.

Il a été reporté par certains auteurs que les zones de forte intensité de fluorescence seraient dues à la présence de groupements électrodonneurs comme les hydroxyles ou méthoxyles (en augmentant la probabilité de transition entre états singulet et fondamental) (8) ; quant aux zones de plus faible intensité de fluorescence, elles pourraient être la résultante de l'émission de groupements carbohydrates ou carboxyles.

Enfin, même si, certains auteurs essaient d'attribuer à des zones de fluorescence des fonctions ou des groupements précis (18) ; il semble nécessaire d'être très prudent dans ce type

d'attribution car comme nous le verrons dans le paragraphe suivant le spectre de l'acide humique est le fruit de la contribution d'un grand nombre de bandes pour lesquelles il est délicat de donner une attribution précise.

Si l'enregistrement d'une MEE présente l'avantage d'obtenir une importante quantité d'informations spectrales, il présente l'inconvénient de nécessiter des durées d'enregistrement très longues (plusieurs heures).

Dans la suite de nos travaux, la spectroscopie de fluorescence synchrone sera utilisée afin de collecter un maximum d'informations spectrales simultanées en un temps raisonnable. Pour cela, il est impératif de faire un choix judicieux des longueurs d'onde d'étude et notamment de « l'offset » (écart entre longueurs d'onde d'excitation et d'émission).

La Figure 2 illustre l'effet de l'offset sur le spectre synchrone de l'acide humique 10 mg/L à pH = 6.

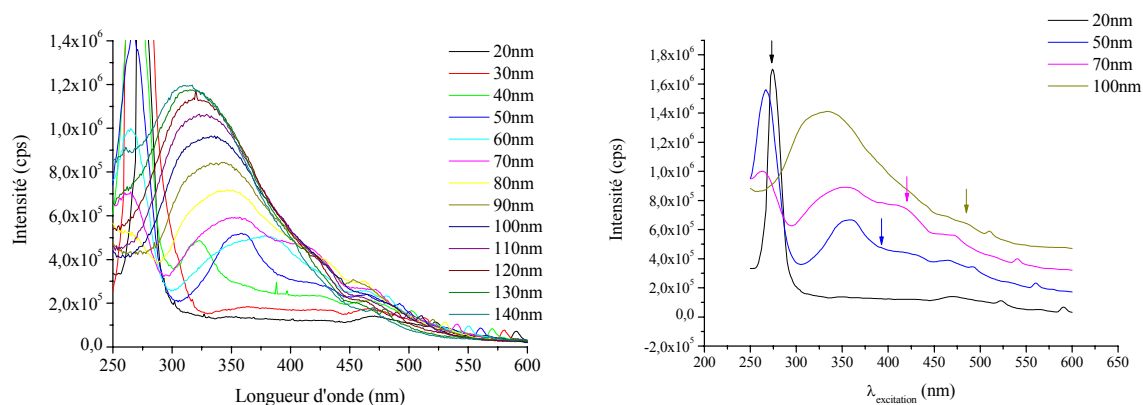


Figure 2 : Spectres synchrones de l'acide humique à pH = 6 pour différents offsets. Sur le deuxième graphe les flèches indiquent les emplacements de la raie Raman de l'eau.

Sur ces spectres, on distingue les bandes correspondants aux différents massifs désignés précédemment (α , α' et β). Pour des valeurs d'offset élevées (dès 80-90 nm), la bande à 425 nm (α) n'est plus observé ou difficilement. De même la bande attribuables aux fluorophores α

se dédouble pour des offsets inférieurs à 80 nm. En ce qui concerne le massif α' , il apparaît moins fortement pour des petits offsets. La bande Raman de l'eau (dans le 1^{er} ordre) qui est parfois observée en fluorescence, se positionne sur le spectre de manière plus ou moins gênante en fonction de la longueur d'onde d'excitation (indiquées par des flèches sur la Figure 2). Un offset de 70 nm a été adopté dans la mesure où cette valeur permet d'obtenir un spectre où le maximum de bandes est observé (Figure 3). Dans ce cas, la bande Raman de l'eau situé à 414 nm n'apporte qu'une faible perturbation de l'intensité de fluorescence de l'acide humique.

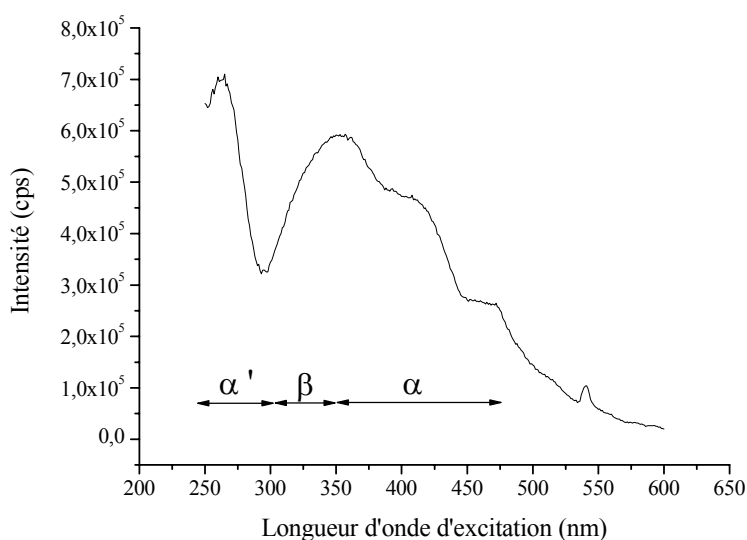


Figure 3 : Spectre synchrone de l'acide humique à pH = 6, offset de 70nm.

b. Détermination de l'acidité totale

La capacité complexante d'un acide humique est liée à sa teneur en fonctions carboxyliques et phénoliques qu'il contient (19-21), celles-ci étant les principaux groupements complexants de la macromolécule.

Plusieurs méthodes permettent d'obtenir ces données (potentiométrie ou conductimétrie, par exemple) (22, 23). Nous avons opté pour un dosage pHmétrique ; des valeurs théoriques de pH ont été calculées en considérant la solution d'AH comme un mélange de deux acides

faibles dont les pKa sont suffisamment différents ($\Delta pK_a \approx 3$) pour pouvoir considérer que leur dosage est successif. Ces valeurs théoriques de pH sont ajustées aux valeurs expérimentales à l'aide de quatre variables (les deux pKa moyens des fonctions acides carboxyliques et phénoliques pK_{ac} et pK_{ap} , ainsi que leurs concentrations relatives C_c et C_p). Les ajustements ont été réalisés à l'aide d'un programme réalisé par nos soins.

Les valeurs de pK_{ac} et pK_{ap} ainsi que de C_c et C_p obtenues à partir de la courbe théorique précédente sont présentées dans le Tableau 3. La concentration désigne ici le nombre de moles de sites acides par unité de masse d'acide humique en solution. Les valeurs sont en bon accord avec les dosages effectués par conductimétrie sur des acides de même provenance (24).

pK_{ac}	4,90
pK_{ap}	9,40
C_c	5,23 mol/kg d'échantillon
C_p	2,31 mol/kg d'échantillon

Tableau 3 : Valeurs des variables pK_{ac} , C_c , pK_{ap} , et C_p obtenues lors de l'ajustement entre les valeurs de pH expérimentales et théoriques du dosage de l'acide humique.

Nous trouvons donc globalement un taux de 7.54 moles de fonctions acides par kilogramme d'échantillon : dans les complexations d'ions métalliques par l'acide humique ou des molécules organiques, nous avons choisi des teneurs inférieures à ce taux afin d'éviter la saturation et de mieux apprécier les effets de compétition entre chélateurs (pour un titre $T_{AH} = 10$ mg/L, C_{Ligand} ou $C_{Métal} \leq 6 \cdot 10^{-5}$ mol/L soit 6 mol/kg d'AH).

Plaza (8) trouve pour des acides humiques issus d'eaux usées des valeurs d'acidité totale comprises entre 3.38 et 6.62 mmol/g selon l'origine et il constate que la proportion de fonctions acides est environ deux fois supérieure à la quantité de groupements phénoliques et que ce rapport est plus grand encore pour des acide humique issus de sols ; il relie ce fait aux conditions aérobies favorisant l'oxydation et la formation de fonction acide. Dans notre cas, le rapport entre les quantités de fonctions acides et phénoliques est de 2,26 ; cette valeur

constitue une bonne moyenne de ce qui peut être trouvé dans divers systèmes humiques et permet d'étendre nos résultats aux problèmes rencontrés au niveau du sol.

c. Etude en fonction du pH

En spectroscopie UV-visible, le spectre de l'acide humique (Figure 4) n'est pratiquement pas modifié en fonction du pH. Nous savions déjà que ce spectre n'était pas très sensible aux phénomènes de complexation ou de changement de pH (25).

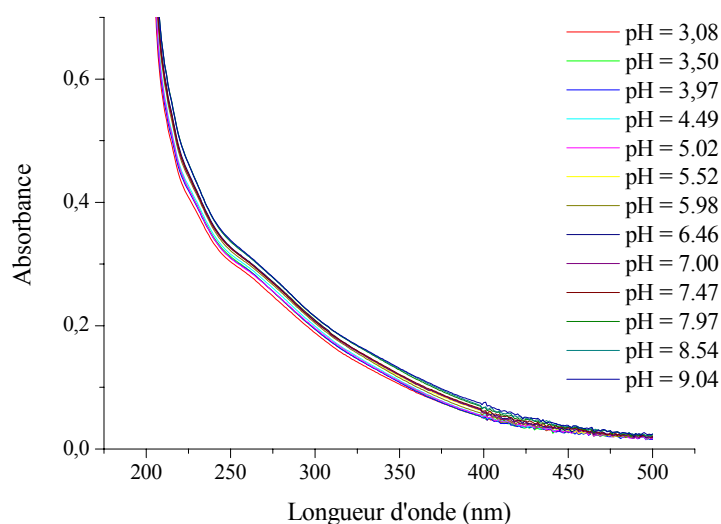


Figure 4 : Evolution du spectre UV-visible de l'acide humique en fonction du pH ($T_{AH} = 10\text{mg/L}$, $f_i = 0.1\text{ mol/L}$, pH 3 à 9).

Contrairement au spectre UV-visible, le spectre de fluorescence synchrone de l'acide humique est beaucoup plus sensible aux conditions physico-chimiques et notamment au pH (Figure 5). Ainsi, on observe l'apparition ou la disparition de bandes de fluorescence en fonction de la valeur de pH.

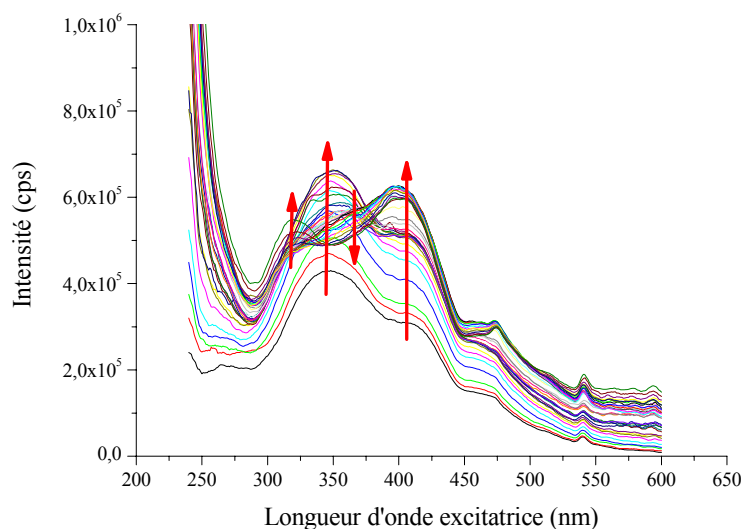


Figure 5 : Evolution du spectre synchrone (offset 70 nm) de l'acide humique en fonction du pH ($T_{AH} = 10 \text{ mg/L}$, $f_i = 0.1 \text{ mol/L}$, pH 1.99 à 11.95).

L'intensité de fluorescence, pour des longueurs d'onde d'excitation inférieures à 300 nm ou supérieures à 450 nm augmente de manière continue avec le pH. Par contre des phénomènes intéressants ont lieu entre 300 et 450 nm. La bande située à 350 nm augmente en intensité de pH = 2 à pH = 6 puis diminue. A 410 nm, nous avons le phénomène inverse : pour des pH faibles, l'intensité augmente de manière continue puis, à partir de pH = 8, un décalage de la bande est observé vers 400 nm de même qu'une augmentation brusque de l'intensité. Enfin, une bande à 320 nm qui n'est pas présente du tout sur le spectre acide de l'acide humique (voir plus loin la décomposition du spectre de l'acide humique en fonction du pH) apparaît vers un pH = 9,5-10 ; cette bande est très probablement due à des fluorophores basiques.

Afin d'affiner les observations concernant les modifications spectrales engendrées par les variations de pH, les spectres de l'acide humique en fonction du pH ont été décomposés à l'aide du logiciel de traitement de données LapSpec v4.02 implanté sur les appareils de spectroscopie HORIBA Jobin Yvon. La Figure 6 montre le résultat de la décomposition du spectre de fluorescence synchrone de l'acide humique à pH = 6, 10 mg/L.

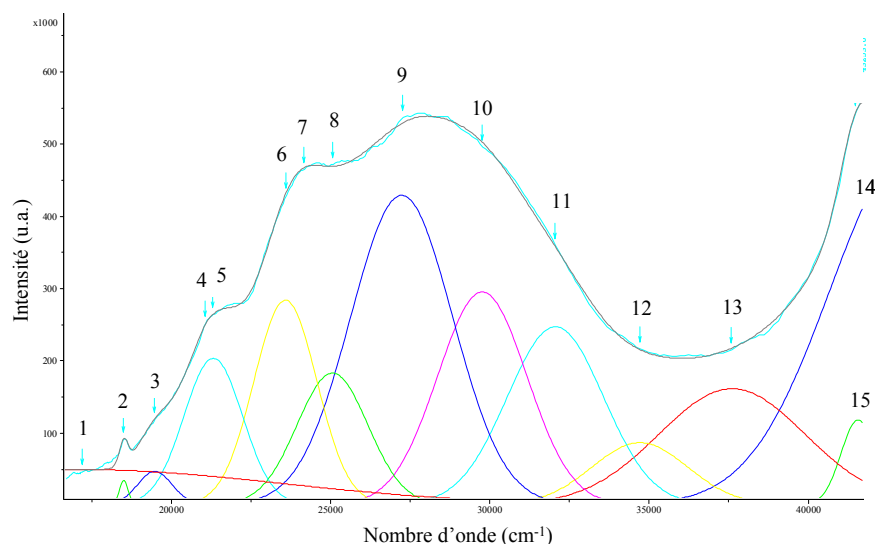


Figure 6 : Décomposition du spectre synchrone de l'acide humique 10 mg/L au pH de travail (à pH = 6). Celle-ci révèle entre 12 et 15 pics contribuant au spectre de l'acide. Le spectre de fluorescence a préalablement été converti en abscisse en unité proportionnelle à l'énergie (nombre d'onde en cm^{-1}).

Après de nombreux tests sur l'ensemble des spectres, une combinaison de 15 bandes a été retenue (Tableau 4) ; c'est la seule qui permette de décomposer de manière optimale les spectres obtenus à différents pH. Aux cours des essais un affinement est effectué à la fois au niveau de la position et de la largeur de chaque bande.

Bande	ν (cm^{-1})	λ (nm)
1	17167.40	582*
2	18476.90	541*
3	19453.00	514
4	21072.30	475
5	21291.10	470
6	23560.70	424
7	24127.60	414*
8	25135.90	398
9	27217.50	367
10	29752.90	336
11	32054.00	312
12	34709.60	288
13	37607.10	266
14	41575.30	241
15	43253.60	231*

Tableau 4 : Combinaison des 15 bandes de la décomposition du spectre de fluorescence synchrone de l'acide humique. Les bandes marquées d'un symbole ne sont pas caractéristiques de l'émission de AH et sont dues soit à des artefacts, à fond de diffusion ou à la bande Raman de l'eau.

Pour l'analyse ultérieure de spectre, nous garderons constants les paramètres de largeur à mi-hauteur et positions des pics afin de pouvoir comparer les aires sous pic de chacune des bandes. Plusieurs paramètres doivent être optimisés : le nombre de bandes, le type de fonctions mathématiques décrivant chaque bande (ici ce sont des gaussiennes pures), et pour chacune d'elle la position, la largeur à mi-hauteur, et l'amplitude.

Parmi ces bandes, certaines sont invariables et ne correspondent pas à des fluorophores de l'acide humique : la bande Raman de l'eau (414 nm), une bande fine due à des artefacts expérimentaux (réflexion) (541 nm) ou des bandes reconstituant le fond de diffusion engendré par l'augmentation de pH (582 ou 531 nm). Nous résumons sur la Figure 7 les évolutions des amplitudes de toutes les contributions au spectre de fluorescence de l'acide humique en fonction du pH.

Outre les bandes à 414 et 541 nm, nous voyons immédiatement que certaines bandes ne sont pas ou peu affectés par la variation de pH (cas des bandes à 266, 288, 470, 514 et 582 nm) : leur contribution est globalement identique sur l'ensemble de la gamme de pH. Comme attendu, les bandes remarquées précédemment (350, 410 et 320 nm, respectivement ici à 336/367, 398 et 312 nm) sont fortement corrélés au pH et voient leur amplitudes varier en fonction de l'acidité. Certaines informations ne se voient que grâce à la décomposition et non à l'observation des spectres de la Figure 5. Les bandes à 336 et 367 nm ont un comportement sensiblement identique, leur intensité augmente fortement avec le pH, jusqu'à une valeur voisine de 5, puis on observe une diminution aussi nette de leur intensité. Il est ainsi envisageable d'attribuer ces bandes à des fluorophores associés à des fonctions carboxyliques : au fur et à mesure de la déprotonation apparaît la fluorescence de la fonction carboxylate, pour des valeurs plus élevées de pH, un quenching de ces bandes est observé et peut s'expliquer, par exemple, par un changement conformationnel de la macromolécule.

Ainsi on remarque qu'une bande fine à 475 nm apparaît seulement à partir d'un pH de 7, cette bande pourrait être attribuée plus particulièrement à des fluorophores associant des groupements hydroxyles. Il en est de même pour les bandes à 398 et 312 nm qui voient leur intensité augmentée plus fortement à partir de pH basique.

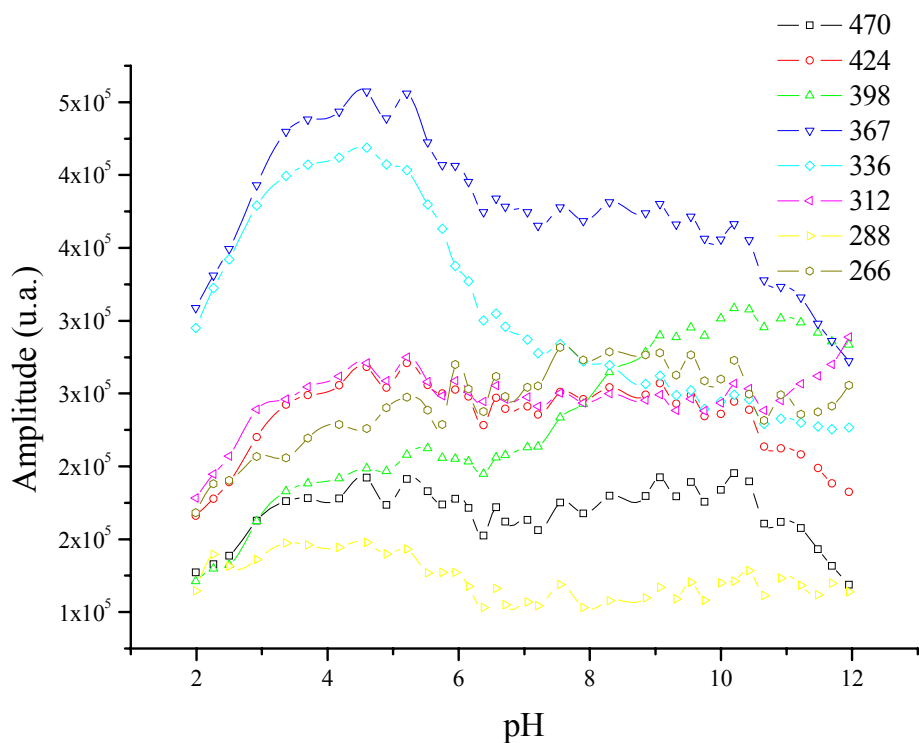
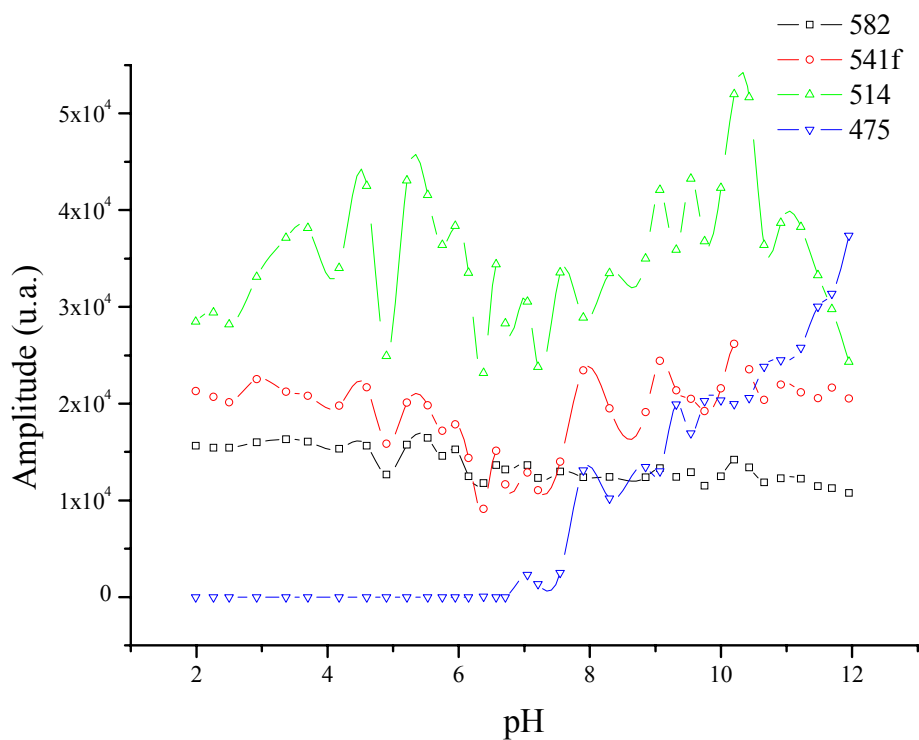


Figure 7 : Evolution des amplitudes des diverses bandes obtenues par décomposition des spectres de fluorescence de l'acide humique en fonction du pH.

Ces décompositions vont par la suite nous aider à analyser l'influence de la complexation des cations métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II) par l'acide humique sur chacun des différents types de fluorophore. Si de telles décompositions ne sont pas indispensables dans l'étude de la complexation d'un seul ion métallique (l'observation de la variation des intensités suffit) ; les décompositions seront particulièrement intéressantes au chapitre suivant lors de l'étude de la compétition entre deux polluants pour la complexation de l'acide humique.

III. Interaction de l'acide humique avec les ions métalliques aluminium (III), plomb (II) et zinc (II)

1) Etat des connaissances sur les complexes métallo-humiques

De nombreuses études concernant la complexation d'espèces métalliques ont été publiées : la plupart concerne la phase solide de l'acide humique (adsorption, « encapsulation » ou « séquestration » métallique). Les phénomènes en phase liquide sont complexes à traiter car nécessitent une bonne connaissance de la spéciation des espèces métalliques. A travers tous ces travaux, différentes techniques sont plus particulièrement performantes :

- RPE

La RPE est une méthode très employée (*notamment pour l'étude de la chélation du plomb*) (26, 27) : Golonka (28) met en évidence que l'assimilation de cations métalliques par l'acide humique dépend surtout de deux facteurs : le rayon atomique et la charge du complexant et réalise un classement suivant selon la capacité de fixer les acides humiques : Al(III) > Pb(II) > Zn(II). La RPE montre également que dans le cas du plomb (II), la complexation est liée à une augmentation de la concentration des radicaux stables avec de faibles valeurs de facteur g (29, 30).

- RMN

Elle est employée surtout pour connaître l'environnement des métaux dans les phases solides afin d'examiner si des changements de symétrie ont lieu et de les quantifier. La RMN de l'aluminium est très utilisée et montre une forte corrélation entre le rapport COOH/Al et l'excès d'acide humique (31). Une étude concernant les métaux Cu et Zn souligne que les processus de complexation (phase liquide) sont les mêmes que ceux d'adsorption (phase solide) (32).

- Infrarouge

Des études infrarouge couplées à des analyses chimométriques ont permis de souligner que le plomb et le zinc présentaient deux modes de chélation de l'acide humique très différents : le 1^{er} complexerait préférentiellement des fonctions salicylate tandis que le 2nd ne montre pas d'interaction spécifique (33). Généralement, les auteurs montrent par cette technique une très grande participation des fonctions –COOH par rapport aux groupements –OH (34).

- Techniques de spéciation en phase liquide (voltamétrie, filtration par membranes, résines...)

A l'aide de ces techniques d'analyse de la phase liquide, certains auteurs ont mis en évidence que la formation de complexes métallo-humiques est responsable de la mobilisation de 50 à 80% des métaux : ainsi le classement de la concentration des métaux fixés à l'acide humique (Pb > Cu > Zn > Cr > Cd > Mn) est fréquemment donné (35). Weng montre grâce à des techniques de dosage par membranes que Cu et Pb sont meilleurs complexants que Cd, Zn ou Ni à pH 3,7/6,1 (36) ; des expériences de voltamétrie indiquent également que le plomb se lie préférentiellement à l'acide humique avec une grande diversité de sites de complexation (37). Ces classements de teneurs de métaux complexés sont relatifs car dépendent des substances humiques employées : une autre étude qui relie des résultats expérimentaux obtenus par résines échangeuses d'ions à des résultats issus de modèles dégage cet ordre : Cu > Fe > Pb > Ni > Co > Ca > Cd > Zn > Mn > Mg (38). Même si des petites différences apparaissent, on trouve toujours que Cu, Fe, Al et Pb sont parmi les meilleurs complexants et que Zn, Mn ou Mg les moins bons.

Il en ressort globalement que les propriétés d'un acide humique sont fonction de son origine c'est-à-dire de sa composition et surtout de son acidité qui influence grandement la stabilité des complexes métallo-humiques ainsi que leur transport (39).

- Techniques analytiques d'exploitation de titrations

Des modèles à un ou deux sites de complexation sont utilisés pour interpréter des courbes de titration entre MOS et métaux en donnant des valeurs de constantes d'équilibre. La DEF (differential equilibrium function) permet d'obtenir un degré d'occupation du composé humique ainsi qu'une valeur de pente reflétant l'hétérogénéité des modes de complexation : des travaux montrent ainsi que la complexation du plomb se fait sur des sites dits forts à des teneurs de plomb faibles et sur des sites « faibles » pour des concentrations élevées (3, 37, 40). Ces techniques analytiques reposent sur les mêmes hypothèses que celles énumérées dans la description des interactions métallo-humiques ci-dessous.

- Fluorescence

La fluorescence de l'acide humique évoquée dans la littérature sert surtout à différencier les origines des substances humiques (issus du compost, du sol, de rivière...) et non à obtenir des données quantitatives : la capacité de piégeage des ions métalliques apparaît surtout comme fonction du rapport rayon atomique/charge (9, 41).

Ainsi, la complexation du zinc (II) par l'acide humique a été étudiée par fluorescence (9) ; cependant aucun travaux ne parlent des phénomènes que nous avons observé avec cet ion.

La fluorescence synchrone est aussi reconnue pour donner un maximum d'information et est particulièrement répandue (avec les MEE) : Piana fait ressortir que sur le panel de métaux : Fe, Cr, Pb, Cu et Ni, la complexation se fait plus facilement à pH = 8 qu'à pH = 4 et qu'elle se manifeste par un quenching du spectre de l'acide identique sur l'ensemble du spectre (7).

- Simulation

De nombreux programmes et modèles (NICA-Donnan, Donnan, DDL, CD-MUSIC, HIBM VI, MINTEQA2...) proposent une spéciation des éléments métalliques pour des systèmes multiphasiques ou en phase liquide uniquement à partir de dosages globaux et en comparaison

avec des données expérimentales issues de techniques donnant les quantités de métaux liés à des fractions particulières de la MOS (technique de dosages par membrane) (4, 36, 42, 43).

2) Description usuelle des interactions métallo-humique en fluorescence

Les théories traditionnelles décrivant la fixation d'un ion métallique par l'acide humique (Ryan & Weber ou Stern & Volmer) font l'hypothèse de la formation d'une espèce de stoechiométrie 1:1 (un ion métallique pour une « molécule » d'acide humique) (Équation 1). Même si le concept de stoechiométrie de complexe pour l'acide humique peut paraître inadapté, de nombreuses publications (10, 44-50) montrent des résultats acceptables (constantes de complexation).



La constante de stabilité du complexe entre l'acide humique et le métal s'écrit alors :

$$\text{Équation 2 : } \quad K_s = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

où [M], [L] et [ML] sont les concentrations respectives du métal libre, de toutes les formes de ligand libre et du complexe.

Les équations de conservation de la matière nous donnent les Équation 3 et Équation 4 pour le métal M et l'acide humique L.

$$\text{Équation 3 : } \quad C_M = [M] + [ML]$$

$$\text{Équation 4 : } \quad C_L = [L] + [ML]$$

En les remplaçant dans la formule de K_s , on obtient :

$$\text{Équation 5 : } \quad \frac{C_L}{[L]} = \frac{[L] + [ML]}{[L]} = 1 + \frac{[ML]}{[L]} = 1 + K_s \cdot [M]$$

Comme nous travaillons dans une zone de linéarité entre le signal de fluorescence et la teneur en acide humique (ici C_L ou [L]), l'intensité I est proportionnelle à la concentration d'acide :

$I_0 = \text{cst.}C_L$ et $I = \text{cst.}[L]$. L'Équation 5 devient :

Équation 6 :
$$\boxed{\frac{C_L}{[L]} = \frac{I_0}{I} = 1 + K_S \cdot [M]}$$

Ces considérations peuvent être généralisées à des complexes M_nL , l'équation précédente se transforme alors en :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S \cdot [M]^n \text{ soit } \log\left(\frac{I_0}{I} - 1\right) = \log K_S + n \log[M]$$

La constante K_S correspond à un cas d'extinction statique utilisé couramment dans la littérature ; dans le cas d'une extinction dite dynamique les fluorophores absorbent à la longueur d'onde d'excitation et complexent avec le quencher (ici des cations métalliques) dans l'état excité, le complexe se désexcite alors par phénomène non radiatif (comme la conversion interne). Dans le cas où les deux types d'extinction ont lieu, la relation précédente devient :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + (K_{\text{dyn}} + K_{\text{sta}}) \cdot [M] + K_{\text{dyn}} \cdot K_{\text{sta}} \cdot [M]^2$$

où K_{dyn} et K_{sta} sont les constantes d'extinction dynamique et statique.

Dans les cas généralement observés d'interactions métallo-humiques, l'extinction statique est prépondérante et la constante dite de Stern-Volmer K_{SV} remplace le K_S nommé précédemment. En conclusion, dans le cas de la complexation de l'acide humique, il est possible de calculer des taux de complexation, ainsi que les constantes de stabilité apparente des complexes métallo-humiques.

3) Complexation d'un cation métallique par l'acide humique à pH = 6

La Figure 8 présente les spectres de fluorescence synchrone de l'acide humique en présence d'ions métalliques aluminium (III), plomb (II) et zinc (II).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'acide humique utilisé présente plusieurs massifs caractéristiques à des longueurs d'onde d'excitation de 270, 320, 350, 370 et 410 nm.

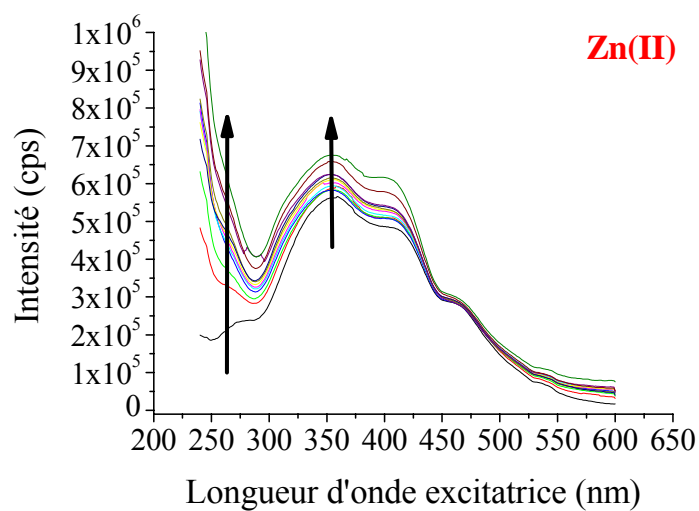
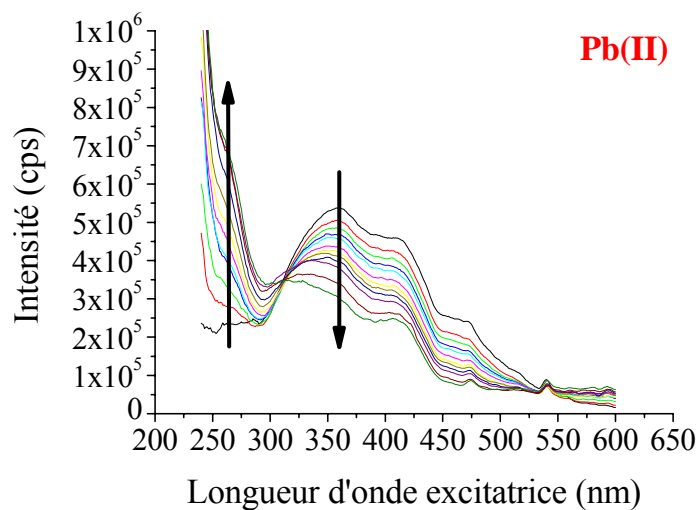
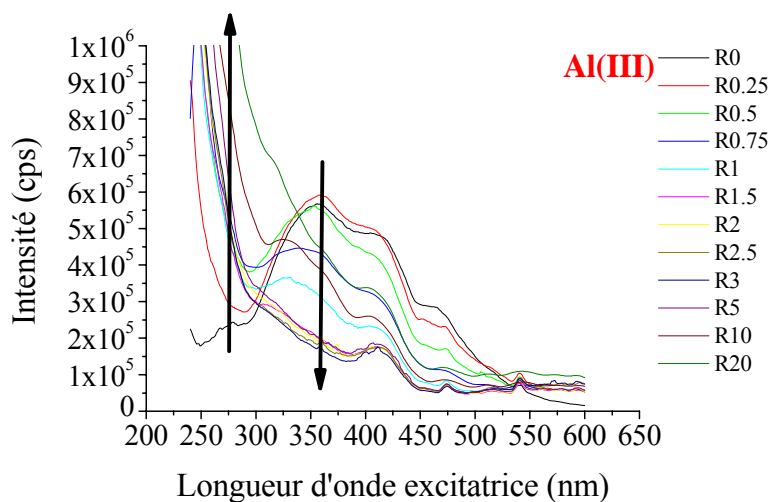


Figure 8 : Evolutions du spectre synchrone (offset de 70 nm) de l'acide humique 10 mg/L par ajout des métaux Al(III), Pb(II) et Zn(II) (de 0 à 120 mmol/kg) à pH = 6.

En ajoutant des sels de Al(III), Pb(II) et Zn(II) à une solution d'acide humique, des changements importants et différents sont observés suggérant des interactions spécifiques entre l'acide et l'ion métallique. En accord avec les résultats présentés dans la littérature sur le sujet, nous observons dans le cas de l'aluminium (III) et du plomb (II) un quenching (qui est plus important pour le premier métal) (2, 7, 41) traduisant une inhibition des fluorophores de l'acide par les métaux venant se complexer à leur proximité (théorie des sphères d'inhibition (51)).

A l'opposé nous observons une exaltation de l'intensité de fluorescence dans le cas du zinc qui peut s'expliquer notamment par un repliement de l'acide en raison d'une complexation très spécifique du zinc (sites peu nombreux et/ou éloignés). Il faut cependant noter que dans notre cas, contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, même sur le spectre de mélange d'acide humique avec Al(III) ou Pb(II) nous constatons une exaltation dans la zone de longueurs d'onde inférieures à 300 nm.

Afin de comparer les pouvoirs complexants des trois cations métalliques, les courbes I_0/I en fonction de la quantité de métal ajouté ont été tracées aux différentes positions particulières du spectre synchrone de l'acide humique (Figure 9).

Ainsi selon le modèle de Ryan & Weber (52), nous pouvons déterminer les constantes de stabilité pour les cations métalliques de l'aluminium (III), du plomb (II) et du zinc (II) aux différentes longueurs d'onde remarquables. Les valeurs sont reportées dans le Tableau 5.

Les taux de « saturation » de l'acide humique peuvent être déduit pour chacun des ions métalliques grâce aux courbes de la Figure 9 ; ils correspondent à la teneur en cation lorsque le rapport I_0/I n'est plus linéaire avec la teneur de sels métalliques ajoutée. Nous obtenons : **9.10^{-6} mol/mg** pour Al(III), **2.10^{-5} mol/mg** pour Pb(II) et **$4,5.10^{-6}$ mol/mg** pour Zn(II). Ces valeurs indiquent qu'il faut plus de plomb (II) que de zinc (II) ou encore d'aluminium (III) pour saturer l'acide humique ($\tau_{Pb(II)} > \tau_{Al(III)} > \tau_{Zn(II)}$).

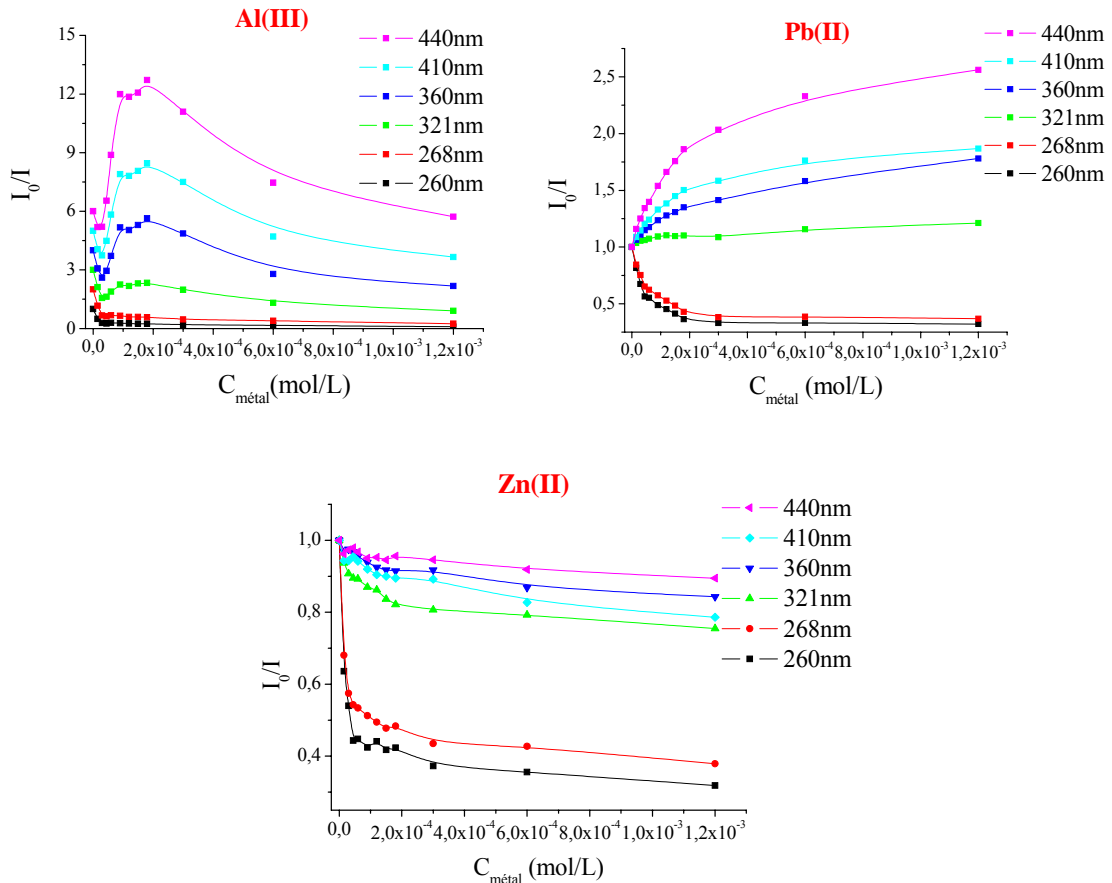


Figure 9 : Evolutions du rapport I_0/I calculé à partir du spectre synchrone de l'acide humique 10 mg/L par ajout de Al(III), Pb(II) et Zn(II) (de 0 à 120 mol/kg).

	Al	Pb	Zn
260 nm	$-2,74 \cdot 10^{+4}$	$-9,77 \cdot 10^{+3}$	$-1,51 \cdot 10^{+4}$
268 nm	$-2,01 \cdot 10^{+4}$	$-8,66 \cdot 10^{+3}$	$-1,61 \cdot 10^{+4}$
321 nm	$1,23 \cdot 10^{+4}$	$1,25 \cdot 10^{+3}$	$-2,31 \cdot 10^{+3}$
336 nm*	$1,45 \cdot 10^{+4}$	$1,47 \cdot 10^{+3}$	$-7,90 \cdot 10^{+2}$
367 nm*	$2,30 \cdot 10^{+4}$	$3,04 \cdot 10^{+3}$	$-4,91 \cdot 10^{+2}$
398 nm*	$2,29 \cdot 10^{+4}$	$3,26 \cdot 10^{+3}$	$-6,82 \cdot 10^{+2}$
475 nm*	$3,07 \cdot 10^{+4}$	$8,20 \cdot 10^{+3}$	$-2,25 \cdot 10^{+2}$

Tableau 5 : Valeurs des constantes de Stern-Volmer calculées pour la complexation de Al(III), Pb(II), Zn(II) à différentes longueurs d'onde d'émission caractéristiques (nm) ($T_{AH} = 10$ mg/L, K_{SV} en mg/mol). Les longueurs d'onde désignées d'une étoile correspondent aux longueurs d'onde mises en évidence durant l'étude en fonction du pH et en dépendant fortement.

Quant aux constantes de formation des complexes métallo-humiques, quelque soit l'ion métallique étudié, les valeurs de K_{SV} varient avec la longueur d'onde à laquelle elles ont été calculées : nous sommes donc en présence d'**interactions spécifiques**. Effectivement dans ce cas, le cation n'agit pas de la même façon sur les différents fluorophores, expliquant que nous n'ayons pas de variations identiques sur les intensités de fluorescence sur l'ensemble du spectre.

Le quenching de fluorescence est un phénomène qui se produit lorsqu'une espèce (ici des cations métalliques) se place à proximité d'un fluorophore et en inhibe la capacité d'émission par des processus encore mal connus ; le quenching est donc proportionnel et identique dans tous les cas où il se manifeste. Les effets d'exaltation n'étant pas clairement expliqués dans la littérature, nous ne pouvons comparer ensemble que les comportements entre d'un côté Al(III) et Pb(II) (sur l'ensemble du spectre) et de l'autre entre Al(III), Pb(II) et Zn(II) sur une zone comprise entre 250 et 320 nm (seul domaine de longueurs d'onde où l'ajout de chacun des trois ions métalliques induit une exaltation du spectre de fluorescence synchrone de l'acide humique).

Ainsi, avec des valeurs de K_S supérieures, en moyenne d'un facteur 10, l'aluminium (III) se complexe plus facilement que le plomb (II). Ce résultat est observé quelque soit la longueur d'onde prise en considération. De telles valeurs de constantes ($\log K_S = 5$), sont reliées à la fixation du métal sur un grand nombre de fonctions acides ou d'autres fonctions possédant des hydroxyles adjacents. Si on observe la zone où chacun des métaux exalte l'intensité de fluorescence (< 300 nm), l'ordre est alors Al(III) $>$ Zn(II) $>$ Pb(II) ; sans pouvoir toutefois dire si ce classement est conservé sur le reste du spectre. Afin de mieux comparer les effets de ces 3 cations, nous présenterons dans le chapitre suivant des expériences où l'on met en compétition deux ions métalliques afin d'évaluer si le zinc (II) a un pouvoir complexant intermédiaire entre Al(III) et Pb(II).

IV. Conclusion

Dans un premier temps, l'acide humique employé dans nos études a été caractérisé de manière classique (analyse globale); les pKa moyens (4,90 et 9,40) ainsi que les teneurs des fonctions carboxyliques et phénoliques, principalement responsables de la complexation des métaux, ont été recalculé ($C_{\text{tot}}=7,54$ mol/kg). L'acide humique IHSS 2S101H a été également caractérisé spectralement par fluorescence synchrone : celle-ci a permis de mettre en évidence différents types de bandes dont certaines présentent une forte dépendance au pH et qui peuvent être attribuées à des fluorophores particuliers.

La complexation des métaux polluants Al(III), Pb(II) et Zn(II) par l'acide a soulevé le problème de la manière dont sont décrits les interactions métallo-humiques : nous avons montré que ces interactions sont différentes en fonction des métaux. Cela se traduit soit par un quenching de fluorescence, soit par une exaltation de fluorescence (ou même les deux effets sur un même spectre). D'autre part les interactions entre l'acide humique et un cation métallique donné ne se traduisent pas de manière uniforme sur l'ensemble du spectre de fluorescence. En effet, suivant la longueur d'onde considérée, l'influence de la complexation métallique est plus ou moins importante, ce qui semble indiquer une certaine sélectivité du métal pour les différents fluorophores.

Toutefois nous avons mis en évidence que l'aluminium (III) avait une capacité plus grande que le plomb (II) à être fixé par l'acide humique sans pouvoir comparer le comportement du zinc (II). C'est pour cette raison et également pour pouvoir identifier les fluorophores concernés par la chélation des différents cations métalliques, que nous avons réalisé des compétitions entre métaux dans la complexation par l'acide humique, qui seront présentées dans le chapitre suivant.

V. Bibliographie

1. Lo, K. S. L., Yang, W. F., & Lin, Y. C. (1992) *Toxicological and Environmental Chemistry* **34**, 139-153.
2. Larrivee, E. M., Elkins, K. M., Andrews, S. E., & Nelson, D. J. (2003) *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**, 32-45.
3. Town, R. M. & Filella, M. (2002) *Science of the Total Environment* **300**, 143-154.
4. Lamelas, C., Wilkinson, K. J., & Slaveykova, V. I. (2005) *Environmental Science and Technology* **39**, 6109-6116.
5. Zbytniewski, R. & Buszewski, B. (2005) *Bioresource Technology* **96**, 471-478.
6. Mao, J. D., Xing, B., & Schmidt-Rohr, K. (2001) *Environmental Science and Technology* **35**, 1928-1934.
7. Piana, M. J. & Zahir, K. O. (2000) *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **B35**, 87-102.
8. Plaza, C., Brunetti, G., Senesi, N., & Polo, A. (2006) *Environmental Science and Technology* **40**, 917-923.
9. Provenzano, M. R., D'Orazio, V., Jerzykiewicz, M., & Senesi, N. (2004) *Chemosphere* **55**, 885-892.
10. Shinozuka, N. (1991) *Analytical Sciences* **7**, 1087-1090.
11. Sokolova, I. V. & Tchaikovskaya, O. N. (2006) *Atmospheric and Oceanic Optics* **19**, 220-222.
12. Kowalczyk, P., Ston-Egiert, J., Cooper, W. J., Whitehead, R. F., & Durako, M. J. (2005) *Marine Chemistry* **96**, 273-292.
13. Mounier, S., Patel, N., Quilici, L., Benaim, J. Y., & Benamou, C. (1999) *Water Research* **33**, 1523-1533.
14. Holbrook, R. D., DeRose, P. C., Leigh, S. D., Rukhin, A. L., & Heckert, N. A. (2006) *Applied Spectroscopy* **60**, 791-799.
15. Yue, L., Wu, F., Liu, C., Li, W., Fu, P., Bai, Y., Wang, L., Yin, Z., & Lu, Z. (2006) *Chinese Science Bulletin* **51**, 89-96.

16. Kazpard, V., Lartiges, B. S., Frochot, C., d'Espinose de la Caillerie, J. B., Viriot, M. L., Portal, J. M., Goerner, T., & Bersillon, J. L. (2006) *Water Research* **40**, 1965-1974.
17. Cabaniss, S. E. (1992) *Environmental Science and Technology* **26**, 1133-1139.
18. Smith, D. S. & Kramer, J. R. (1999) *Environment International* **25**, 295-306.
19. Ikeya, K., Yamamoto, S., & Watanabe, A. (2004) *Organic Geochemistry* **35**, 583-594.
20. Fukushima, M., Tanaka, S., Hasebe, K., Taga, M., & Nakamura, H. (1995) *Analytica Chimica Acta* **302**, 365-373.
21. Plaza, C., Brunetti, G., Senesi, N., & Polo, A. (2005) *Environmental Science and Technology* **39**, 6692-6697.
22. McDonald, S., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2004) *Analytica Chimica Acta* **527**, 105-124.
23. Elkins, K. M. & Nelson, D. J. (2002) *Coordination Chemistry Reviews* **228**, 205-225.
24. Ritchie, J. D. & Perdue, E. M. (2003) *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**, 85-96.
25. Caudron, A. (2004) *Thèse de Doctorat*, Université des Sciences et Technologies de Lille.
26. Jezierski, A., Czechowski, F., Jerzykiewicz, M., Golonka, I., Drozd, J., Bylinska, E., Chen, Y., & Seaward, M. R. D. (2002) *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **58**, 1293-1300.
27. Jerzykiewicz, M., Jezierski, A., Czechowski, F., & Drozd, J. (2002) *Organic Geochemistry* **33**, 265-268.
28. Golonka, I., Czechowski, F., & Jezierski, A. (2005) *Geoderma* **127**, 237-252.
29. Giannakopoulos, E., Christoforidis, K. C., Tsipis, A., Jerzykiewicz, M., & Deligiannakis, Y. (2005) *Journal of Physical Chemistry A* **109**, 2223-2232.
30. Jerzykiewicz, M. (2004) *Geoderma* **122**, 305-309.
31. Hiradate, S. & Yamaguchi, N. U. (2003) *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**, 26-31.
32. Ashley, J. T. F. (1996) *Chemosphere* **33**, 2175-2187.
33. Dupuy, N. & Douay, F. (2001) *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **57**, 1037-1047.
34. Pandey, A. K., Pandey, S. D., Misra, V., & Viswanathan, P. N. (1999) *Chemistry and Ecology* **16**, 269-282.
35. Linnik, P. N. (2003) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **376**, 405-412.

36. Weng, L., Temminghoff, E. J. M., Lofts, S., Tipping, E., & Van Riemsdijk, W. H. (2002) *Environmental Science and Technology* **36**, 4804-4810.
37. Abate, G. & Masini, J. C. (2002) *Organic Geochemistry* **33**, 1171-1182.
38. Pandey, A. K., Pandey, S. D., & Misra, V. (2000) *Ecotoxicology and Environmental Safety* **47**, 195-200.
39. Schulze, D., Kruger, A., & Segebade, C. (2000) *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **244**, 51-53.
40. Filella, M. & Town, R. M. (2001) *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **370**, 413-418.
41. Misra, V., Pandey, S. D., & Viswanathan, P. N. (1996) *Chemistry and Ecology* **13**, 103-112.
42. Tipping, E., Rey-Castro, C., Bryan, S. E., & Hamilton-Taylor, J. (2002) *Geochimica et Cosmochimica Acta* **66**, 3211-3224.
43. Gueguen, C., Koukal, B., Dominik, J., & Pardos, M. (2003) *Chemosphere* **53**, 927-934.
44. Gauthier, T. D., Shane, E. C., Guerin, W. F., Seitz, W. R., & Grant, C. L. (1986) *Environmental Science and Technology* **20**, 1162-1166.
45. Ohga, K., Tsuruhara, T., Egashira, N., & Kuroi, T. (1990) *Analytical Sciences* **6**, 837-842.
46. Puchalski, M. M., Morra, M. J., & Von Wandruszka, R. (1992) *Environmental Science and Technology* **26**, 1787-1792.
47. Peuravuori, J. (2001) *Analytica Chimica Acta* **429**, 65-73.
48. Karthikeyan, K. G. & Chorover, J. (2002) *Chemosphere* **48**, 955-964.
49. Ghatak, H., Mukhopadhyay, S. K., Jana, T. K., Sen, B. K., & Sen, S. (2004) *Wetlands Ecology and Management* **12**, 145-155.
50. Laor, Y. & Rebhun, M. (2002) *Environmental Science and Technology* **36**, 955-961.
51. Valeur, B. (2004) *Invitation à la fluorescence moléculaire*.
52. Ryan, D. K. & Weber, J. H. (1982) *Analytical Chemistry* **54**, 986-990.

Chapitre VII

***Mise en compétition de deux ions
métalliques lors de la complexation
d'un acide humique***

Chapitre VII

Mise en compétition de deux ions métalliques lors de la complexation d'un acide humique.

I. Introduction.....	201
II. Mode opératoire	202
1) Préparation des solutions.....	202
2) Décomposition des spectres de fluorescence	202
3) Etat des connaissances sur les phénomènes de compétition entre métaux dans leur complexation par l'acide humique.....	204
III. Résultats.....	205
1) Compétition entre Al(III) et Pb(II)	205
2) Compétition entre Al(III) et Zn(II)	210
3) Compétition entre Pb(II) et Zn(II).....	214
IV. Discussion.....	218
1) Influence du type de fluorophores complexés.....	218
2) Considérations globales.....	221
V. Conclusion	225
VI. Bibliographie	227

I. Introduction

Dans le chapitre précédent, l'étude par fluorescence synchrone d'un acide humique a mis en évidence son potentiel de rétention envers les ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II). L'analyse des résultats obtenus a permis de souligner l'existence de différents types de bandes présentant de fortes dépendances au pH et qui peuvent être attribuées à des types de fluorophores particuliers.

La complexation des cations métalliques par l'acide humique a montré que les interactions métallo-humiques sont différentes en fonction des métaux et des fluorophores (quenching ou exaltation de fluorescence, d'intensité variable selon les longueurs d'onde).

Les premières conclusions des études de complexation ont montrées que Al(III) a un pouvoir globalement plus important que Pb(II) à être complexé par l'acide humique mais que le comportement particulier de Zn(II) empêche toute comparaison dans les régions spectrales où le type d'interaction métallo-humique est différent.

L'objectif de l'étude présentée dans ce présent chapitre est d'évaluer la force de rétention de l'acide humique envers Zn(II) et aussi d'identifier les fluorophores concernés par la complexation des différents ions métalliques. Pour cela, des compétitions pour la complexation de l'acide humique entre deux des trois ions métalliques cités précédemment sont effectuées.

II. Mode opératoire

1) Préparation des solutions

Les compétitions entre Al(III), Pb(II) et Zn(II) et l'acide humique 2S101H ont été réalisées dans un milieu aqueux à pH = 6 avec une force ionique constante de 0,1 mol/L en chlorure de sodium. Les expériences consistent à additionner un ion métallique (Me2) à une solution d'acide humique en équilibre avec un premier ion métallique (Me1). Les deux sens d'ajout (c'est-à-dire (AH+Me1)+Me2 et (AH+Me2)+Me1) ont été expérimentés pour les couples Al(III)/Pb(II) ; Al(III)/Zn(II) et Pb(II)/Zn(II) avec une concentration de $3 \cdot 10^{-5}$ mol/L pour chacun des deux cations métalliques.

La solution contenant le premier mélange entre l'acide humique à une concentration de 10 mg/L et le premier ion métallique a été laissée 24h en chambre de température (25°C) et la solution du second cation n'a été ajoutée qu'après vérification de la stabilité du mélange (suivi de l'évolution du spectre de fluorescence).

2) Décomposition des spectres de fluorescence

Dans le chapitre précédent, une décomposition du spectre de fluorescence synchrone de l'acide humique étudié a mis en évidence quatre zones spectrales caractéristiques de fluorophores particuliers (Figure 1).

- la zone 1 : centrée autour d'une bande à 270 nm où l'étude en fonction du pH n'a montré aucune dépendance entre fluorophore et acidité,
- la zone 2 : vers 320 nm mise en évidence sur le spectre de l'acide humique à pH = 11,95 correspondant à des fonctions polyphénoliques,
- la zone 3 : autour de la bande à 350 nm caractéristique de fonctions acides,
- et la zone 4 rassemblant deux bandes à 410 et 470 nm où les fluorophores correspondent à des fonctions de type hydroxyles.

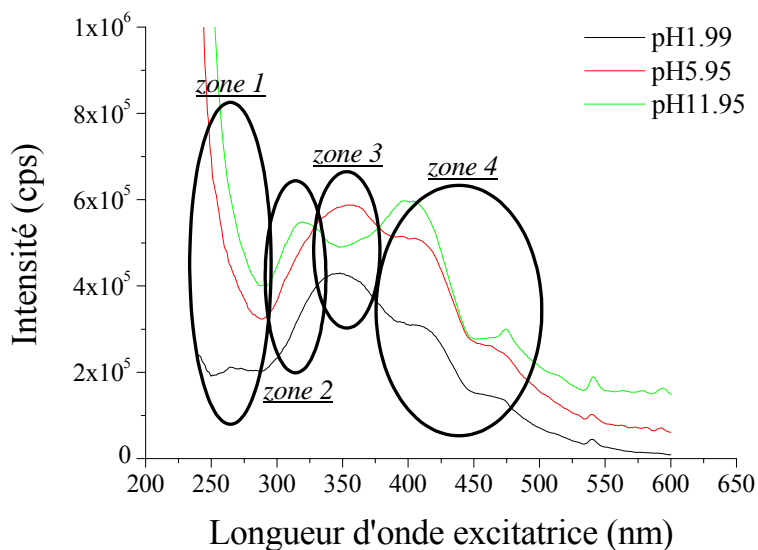


Figure 1 : Evolution du spectre synchrone (offset 70 nm) de l'acide humique en fonction du pH ($T_{AH} = 10$ mg/L, $f_i = 0.1$ mol/L, pH 1,99 ; 5,95 et 11,95).

Lors de la décomposition des spectres de fluorescence, chacune des zones spectrales rassemble plusieurs bandes (Tableau 1).

Bande	λ (nm)	zone
1	582	zone 4
2	541	
3	514	
4	475	
5	470	
6	424	
7	414	
8	398	
9	367	zone 3
10	336	
11	312	zone 2
12	288	
13	266	zone 1
14	241	
15	231	

Tableau 1 : Combinaison des 15 bandes de la décomposition du spectre de fluorescence synchrone de l'acide humique 10 mg/L, pH = 6.

Lors de la décomposition des spectres obtenus au cours des mises en compétition des ions des différentes compétitions dans les paragraphes suivants, plusieurs paramètres doivent être optimisés : le nombre de bandes, le type de fonctions mathématiques décrivant chaque bande, et pour chacune d'elle la position, la largeur à mi-hauteur, et l'amplitude. Les décompositions sont réalisées dans l'hypothèse que les fluorophores identifiés ont des positions et des formes fixes. Les positions de la combinaison de bandes trouvée pour l'étude de l'acide humique en fonction du pH ont été conservées ; de plus les largeurs à mi-hauteur sont fixées pour toutes les décompositions afin de pouvoir comparer les différentes amplitudes trouvées par ajustement.

3) Etat des connaissances sur les phénomènes de compétition entre métaux dans leur complexation par l'acide humique

Un nombre important de publications traite de la complexation des ions métalliques Al, Pb et Zn par les substances humiques : il a été mis en évidence que le pouvoir complexant varie dans le sens $Al > Pb > Zn$ (1-3). De façon générale, la capacité de piégeage des ions métalliques apparaît lié au rapport rayon atomique/charge (4, 5). Toutefois les mécanismes de complexation ou les sites impliqués sont peu évoqués dans la littérature. Dans le cas d'Al(III), la RMN montre une forte corrélation entre le rapport COOH/Al et la concentration d'acide humique (6). Quant à Pb(II) et à Zn(II), il semblerait que deux modes de complexation avec l'acide humique peuvent être évoqués : le premier impliquerait préférentiellement des fonctions salicylates tandis que le second ne montrerait pas d'interaction spécifique (7).

Les études de compétition entre espèces ioniques pour la fixation de l'acide humique sont rares. Une analyse de la compétition entre Al(III) et Pb(II) par potentiométrie et voltamétrie montre que Al(III) gêne fortement la chélation de Pb(II) en diminuant le nombre de sites disponibles par effets électrostatiques (8). Ces derniers sont à prendre en compte dans les modèles pour avoir des résultats acceptables. L'échange avec les protons de la matrice est également un élément important. Les teneurs de métaux varient généralement dans l'ordre : $Al^{3+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+} > Ca^{2+}$ (9).

La compétition entre Al(III) et Pb(II) à pH = 4,5 a été suivie par titration avec électrodes sélectives et montre que Al(III) peut enlever d'un facteur deux ou trois la quantité de Pb(II) lié à l'acide humique (10).

La fixation d'Al(III) a été également étudié en compétition avec le Fe(III). Ces études soulignent la forte perturbation que provoque Al(III) sur la complexation de Fe(III) sans que l'inverse ne soit vérifié (11).

Enfin, de nombreux travaux essaient de prédire l'état des systèmes humiques par des modèles calculatoires; notamment entre des alcalino-terreux (type Ca^{2+}) et des métaux lourds sur la base de données d'analyses voltamétriques (12). Le problème étant toujours la difficulté d'obtenir une spéciation expérimentale fiable du système.

III. Résultats

1) Compétition entre Al(III) et Pb(II)

Les spectres de fluorescence synchrone enregistrés avec un offset de 70 nm relatifs à la complexation entre l'acide humique, Al(III) et Pb(II) sont présentés Figure 2 à Figure 4.

Les Figure 2 et Figure 3 montrent que l'ajout de Pb(II) à un mélange acide humique-Al(III) inhibe bien moins la fluorescence initiale que l'ajout d'Al(III) à un mélange AH-Pb(II).

On retrouve ici le comportement individuel de la complexation des ions Al(III) et Pb(II). Al(III) avait montré une capacité supérieure à se fixer sur l'acide humique quelque soit le type de fluorophore (constante de Stern-Volmer supérieure d'un facteur 10 sur l'ensemble du spectre de fluorescence).

La Figure 4 indique que le spectre du mélange où Pb(II) a été ajouté à une solution d'acide humique complexé par Al(III) (« AHAIPb ») a une intensité globale plus forte que celle du mélange AHPbAl sur l'ensemble des longueurs d'onde et particulièrement dans la zone 3 du spectre (autour de 350 nm). Dans la zone 1 (vers 270 nm), peu de différences apparaissent entre les deux spectres, individuellement Al(III) montre une valeur de K_{SV} bien supérieure à celle de Pb(II).

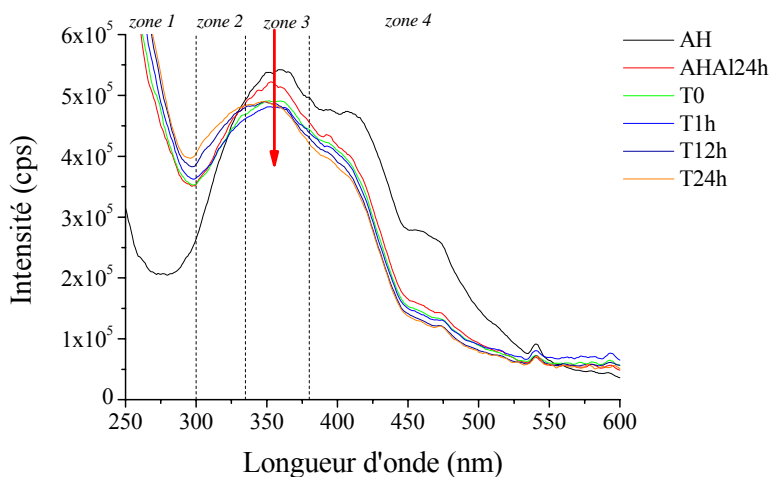


Figure 2 : Evolution en fonction du temps du spectre de fluorescence synchrone (offset de 70 nm) du mélange d'acide humique-Al(III) après ajout de Pb(II).

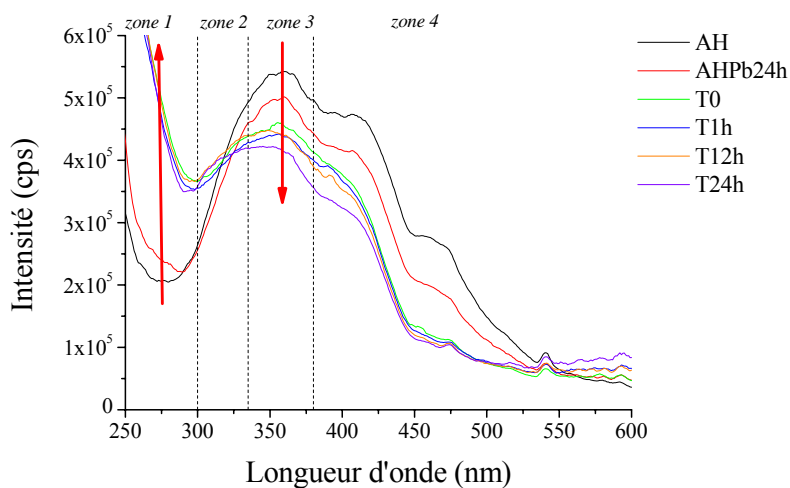


Figure 3 : Evolution en fonction du temps du spectre de fluorescence synchrone (offset de 70 nm) du mélange d'acide humique-Pb(II) après ajout de Al(III).

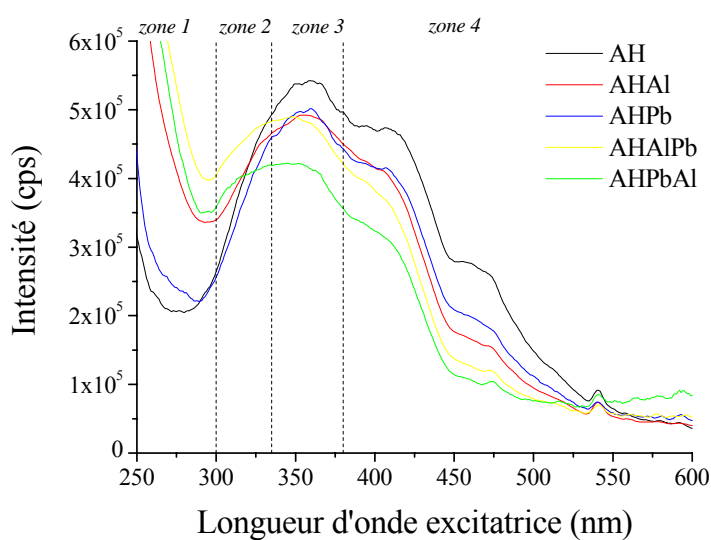


Figure 4 : Comparaison des spectres de fluorescence synchrone des mélanges d'acide humique-Al(III)-Pb(II) selon le sens des ajouts des cations métalliques.

Aucune interaction entre la complexation d'Al(III) et Pb(II) n'est donc mise en évidence par rapport aux fluorophores émettant dans ces longueurs d'onde. Dans la zone 2 (320 nm), les modifications spectrales sont surtout causées par la fixation d'Al(III) car celle de Pb(II) ne semble avoir que très peu d'effets sur cette région du spectre de l'acide humique. Enfin les zones 3 et 4 sont très remarquables : les intensités de AHAlPb et de AHAl sont les mêmes sur quasiment toute la région supérieure à 350 nm contrairement au cas de AHPbAl où les quenching dûs à Al(III) et Pb(II) semblent s'additionner. Ceci implique que le mélange AHAlPb comporte moins d'acide humique complexé que AHPbAl et que la fixation d'Al(III) sur l'acide humique "bloque" celle du Pb(II) bien que les deux éléments ne se fixent pas sur les mêmes fluorophores (dans le cas contraire, l'intensité de AHPbAl serait aussi affectée).

Les résultats des décompositions réalisées à l'aide du logiciel LabSpec v 4.02 (13) sont présentés Figure 6. La répartition et la forme des différentes bandes de décomposition ainsi que leur somme (reconstituant le spectre décomposé) sont illustrées Figure 5 pour les mélanges AHAl, AHPb, AHAlPb et AHPbAl.

Les valeurs liées aux barres correspondent à l'amplitude des bandes du mélange à laquelle a été soustrait l'amplitudes de la bande de AH seul.

Dans la zone 1 du spectre, la contribution de la complexation d'Al(III) est prépondérante par rapport à celle de Pb(II) pour toutes les amplitudes des bandes de la décomposition (231, 241 et 266 nm). Al(III) présente donc bien une capacité complexante plus grande que Pb(II) vis-à-vis des fluorophores présentant un signal dans cette région. Comme attendu les contributions ici sont proches pour les deux mélanges AHAlPb et AHPbAl.

Au niveau de la zone 2 (288 et 312 nm) l'amplitude des bandes est aussi forte dans la complexation seule de Pb(II) que dans celle d'Al(III) indiquant des capacités complexantes proches pour fixer les fluorophores émettant à cet endroit, ceci vient en opposition à l'observation des intensités des spectres des mélanges AHAl et AHPb qui supposaient une capacité chélatante supérieure d'Al(III) par rapport à Pb(II). Cependant, les plus fortes amplitudes relevées pour le mélange AHAlPb que pour AHPbAl démontrent aussi la perturbation qu'a la fixation de Al(III) sur celle de Pb(II).

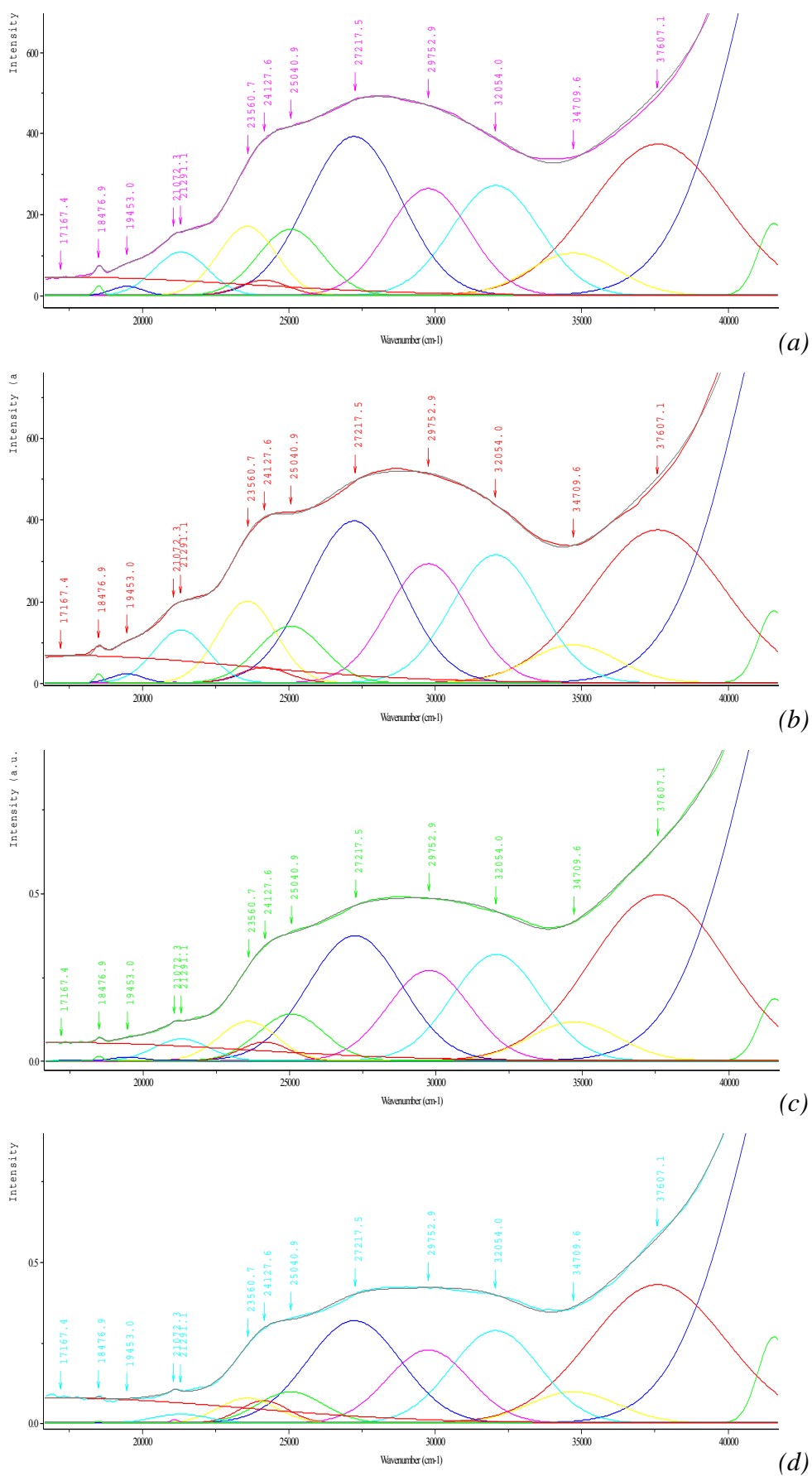


Figure 5 : Décomposition des spectres de fluorescence des mélanges AHAl (a), AHPb (b), AHAlPb (c) et AHPbAl (d).

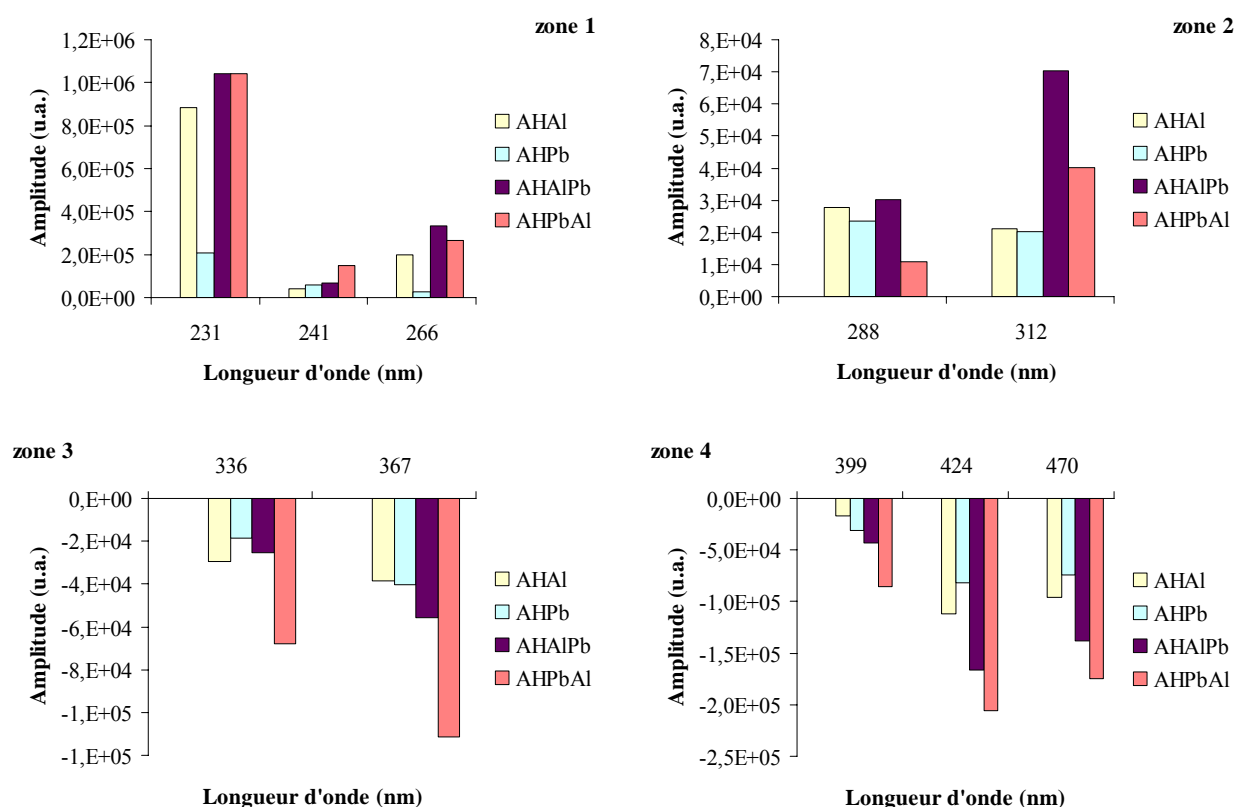


Figure 6 : Amplitudes des bandes obtenues par décomposition des spectres de fluorescence synchrone dans la compétition entre l'acide humique, l'Al(III) et le Pb(II) selon les zones remarquables de longueurs d'onde du spectre. Les amplitudes sont normalisées par rapport à celle de l'acide humique.

L'ajout d'une solution d'ions métalliques provoque dans les zones 3 (336 et 367 nm) et 4 (399, 424 et 470 nm) un quenching de fluorescence et non pas une exaltation comme dans les zones 1 et 2. Dans cette zone, les amplitudes des deux bandes sont proches pour les mélanges AHA1 et AHAIPb indiquant que la fixation d'Al(III) bloque celle de Pb(II) ; les fluorophores émettant à cet endroit ont été identifiés précédemment comme des fonctions acides de l'acide humique ; confirmant le rapport étroit entre les sites acides de l'acide humique et l'aluminium observé dans la littérature (6). Par contre dans le mélange AHPbAl, les effets de Pb(II) et de Al(III) s'ajoutent et la fixation du Pb(II) ne semble pas être un obstacle dans celle de l'aluminium(III).

Dans la zone 4, où les fluorophores sont associés à des fonctions polyphénoliques, des effets similaires sont observés. Toutefois la complexation dans le mélange AHPbAl a lieu sans difficulté démontrant que si Al(III) empêche la fixation de Pb(II), le phénomène inverse n'est pas observé.

2) **Compétition entre Al(III) et Zn(II)**

Le suivi spectroscopique de la complexation entre l'acide humique (AH), Al(III) et Zn(II) est présenté sur les Figure 7 à Figure 9.

A la simple vue des Figure 7 et Figure 8, la complexation de Zn(II) n'a aucun impact sur la partie du spectre synchrone de l'acide humique au dessus de 400 nm. En effet on constate aussi bien pour la complexation dans le sens AHAlZn que AHZnAl que l'intensité de fluorescence de la zone 4 de ces mélanges est la même que celle du mélange AHAl.

La complexation de Zn(II) avait montré précédemment un certain nombre de complication : contrairement à l'ajout d'Al(III) et Pb(II) qui génèrent une diminution de l'intensité de fluorescence du spectre de l'acide humique dans les zones 2, 3 et 4 (à partir d'un peu plus de 300 nm), l'addition de Zn(II) provoque une exaltation du signal sur l'ensemble du spectre. Les valeurs de constantes de formation des complexes humiques déterminés à partir des zones 2, 3 et 4 sont alors de signes différents, toutefois les valeurs absolues sont très différentes : $2-3 \cdot 10^5$ pour la complexation de Al(III) dans les zones 3 et 4 contre $3-5 \cdot 10^3$ pour celle de Zn(II) ; $7 \cdot 10^4$ et $1 \cdot 10^4$ respectivement pour les complexes AHAl et AHZn dans la zone 2.

Dans les études individuelles, nous avons considéré que le signe des constantes K_{SV} (positif ou négatif) empêchait de classer les trois ions métalliques selon leur pouvoir de fixation. Cependant si seules les valeurs absolues des K_{SV} sont considérées (comme dans certaines publications qui traitent du cas), Al(III) possède une plus grande capacité à se complexer avec l'acide humique 2S101H que Zn(II) quelque soit la zone étudiée.

Mais les observations sont plus réservées : si dans la zone 4, les fluorophores émettant à plus de 400 nm ne semblent pas fixer Zn(II), l'exaltation de l'intensité des mélanges AHAlZn et AHZnAl des zones 1 et 2 (longueurs d'onde inférieures à 320 nm) indique que les complexations des ions Al(III) et Zn(II) s'additionnent sans interagir.

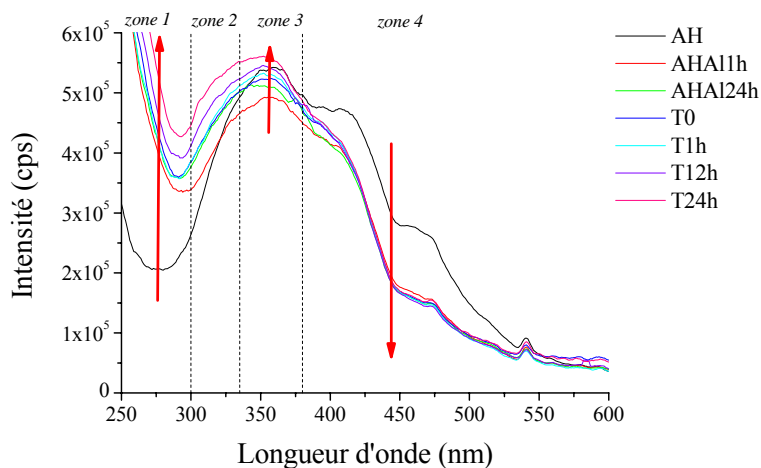


Figure 7 : Evolution en fonction du temps du spectre de fluorescence synchrone du mélange d'acide humique-Al(III) après ajout de Zn(II).

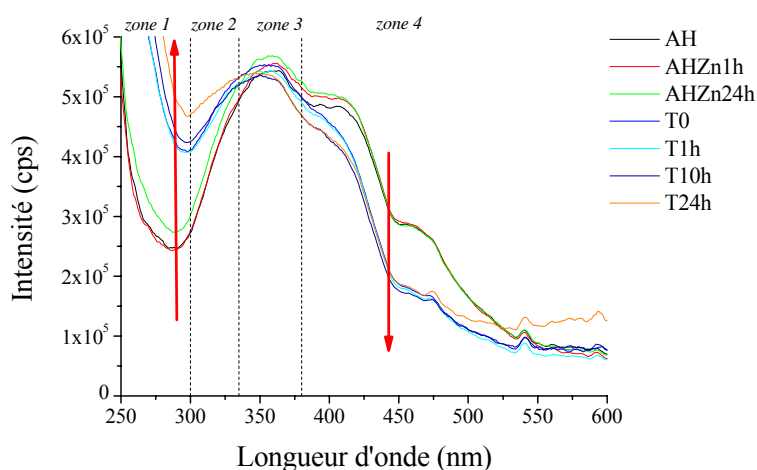


Figure 8 : Evolution en fonction du temps du spectre de fluorescence synchrone du mélange d'acide humique-Zn(II) après ajout de Al(III).

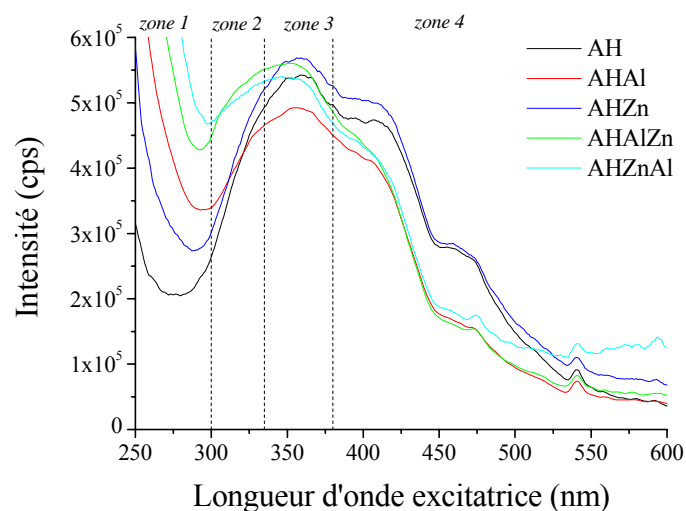


Figure 9 : Comparaison des spectres de fluorescence synchrone des mélanges d'acide humique-Al(III)-Zn(II) selon le sens des ajouts des ions métalliques.

Dans la zone 3 (autour de la bande à 350 nm), les observations contredisent que Zn(II) chélate moins bien l'acide humique que Al(III) : la Figure 9 montre très bien que l'ajout de Zn(II) provoque une exaltation (une variation d'intensité qu'on peut noter DI_{Zn}) et celui d'Al(III) un quenching (DI_{Al}). Si ces variations d'intensité sont prises uniquement en valeur absolue, il est évident que DI_{Al} est plus important que DI_{Zn} . Or les intensités à 350 nm des mélanges avec les deux cations métalliques sont légèrement supérieures à l'intensité de l'acide humique (AHZnAl) voire égales à l'intensité du mélange AHZn (AHAIZn). Ces intensités montrent donc que Zn(II) décomplexe tout l'Al(III) avant de se fixer.

L'amplitude des effets d'exaltation ou de quenching qui ont lieu sur un spectre de fluorescence d'acide humique ne sont donc absolument pas comparables : les constantes K_{SV} correspondent à des mécanismes différents rendant les comparaisons impossibles par ce moyen contrairement à ce qui peut être lu dans la littérature (14).

La décomposition des spectres de fluorescence reflète les observations effectuées au niveau des intensités des mélanges (Figure 10).

La contribution de la complexation d'Al(III) dans la zone 1 du spectre, est plus importante par rapport à celle de Zn(II) pour toutes les amplitudes des bandes : Al(III) présente donc un pouvoir chélatant plus grand que Zn(II) dans cette région sans toutefois qu'il y ait d'interactions entre la fixation des deux cations comme le montre l'amplitude des mélanges qui est la somme des amplitudes de AHAAl et AHZn.

Dans la zone 2, contrairement à ce qui a été énoncé auparavant, la complexation de Zn(II) a une contribution égale ou supérieure à celle d'Al(III) pour les deux bandes dans le cas des mélanges simples (AHAAl et AHZn). Les mélanges contenant les deux cations montrent des amplitudes supérieures ou équivalentes au complexant (Al(III) ou Zn(II)) qui a individuellement la plus grande contribution. L'acide humique complexe à un niveau intermédiaire entre celui des deux cations métalliques, les effets d'Al(III) ou Zn(II) se perturbent l'un et l'autre.

Les faits ci-dessus concernant l'opposition entre valeurs relatives de K_{SV} et capacité complexante d'ion métallique se confirment au niveau de la décomposition des bandes de la zone 3 (vers 350 nm). En effet, ici l'ajout d'Al(III) et de Zn(II) provoquent respectivement un

quenching et une exaltation d'intensité du spectre de AH. Or les amplitudes de ces bandes pour les mélanges AHAIZn et AHZnAl sont soit supérieures à celle de l'acide humique marquant une contribution plus grande de la part de Zn(II) (mélange AHAIZn) ; soit inférieures à celle de l'acide humique (contribution plus grande de la part de Al(III)). La fixation d'Al(III) semble gêner ici celle de Zn(II) tandis que l'inverse n'est pas vérifié. La complexation du zinc apparaît plus spécifique que celle de l'aluminium.

Dans la dernière zone (longueurs d'onde supérieures à 400 nm) où les fluorophores sont des fonctions polyphénoliques, l'amplitude des trois bandes du mélange AHZn est proche ou supérieure de celle de l'acide humique seul : Zn(II) complexe donc faiblement ces fluorophores (contrairement à Al(III) qui présentent des amplitudes très différentes de celle de AH). De plus les mélanges AHAIZn et AHZnAl montrent des contributions identiques à celles du mélange AHAIZn : Al(III) complexe exclusivement les fluorophores relatifs à cette zone et possède donc un pouvoir complexant bien plus grand que Zn(II).

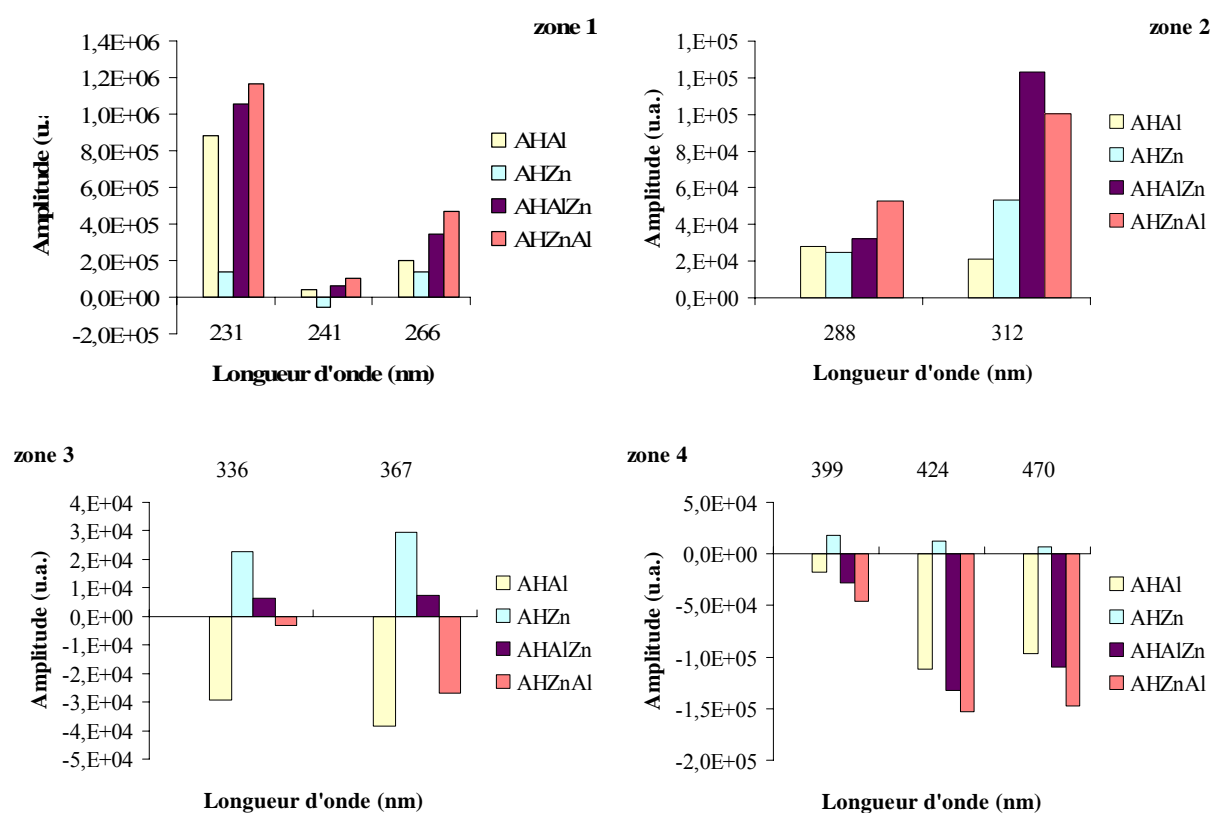


Figure 10 : Amplitudes des bandes obtenues par décomposition des spectres de fluorescence synchrone dans la compétition entre l'acide humique, l'Al(III) et le Zn(II) selon les zones remarquables de longueurs d'onde du spectre. Les amplitudes sont normalisées par rapport à celle de l'acide humique.

Globalement, Al(III) possède un pouvoir complexant plus important que Zn(II). Il complexe plus facilement l'acide humique dans les zones 1 et 4 (pour des longueurs d'onde inférieures à 300 et supérieures à 400 nm) incluant la zone où émettent des fluorophores polyphénoliques. Par contre, les deux ions métalliques possèdent des forces égales dans la région autour de 320 nm et enfin la capacité de fixation de Zn(II) dépasse celle d'Al(III) dans la zone 3 (vers 350 nm) c'est à dire pour des fluorophores de type acide.

Si globalement Al(III) est plus complexé que Zn(II) par AH, les sites acides semblent préférentiellement occupés par Zn(II) lors de la compétition.

3) Compétition entre Pb(II) et Zn(II)

Les comportements complexants de l'acide humique envers Al(III) et Pb(II) ont été décrits précédemment comme particulièrement proches (chapitre VI) : Pb(II) a les mêmes effets qu'Al(III) mais avec une intensité plus faible. Si on fait abstraction du problème du signe de K_{SV} , les valeurs des constantes sont relativement proches :

	AHPb	AHZn
Zone 1	$-5,5 \cdot 10^4$	$-9,5 \cdot 10^4$
Zone 2	$7 \cdot 10^3$	$-1 \cdot 10^4$
Zone 3	$1,5 \cdot 10^4$	$-3,5 \cdot 10^3$
Zone 4	$3 \cdot 10^4$	$-3 \cdot 10^3$

Ces valeurs montrent qu'à priori Pb(II) sera plus complexant pour l'acide humique que Zn(II) sur les fluorophores des zones supérieures de 335 nm (zones 3 et 4) et moins complexant pour ceux des zones inférieures à 335 nm (zones 1 et 2 du spectre).

La complexation entre l'acide humique (AH), Pb(II) et Zn(II) a permis de recueillir les spectres de fluorescence synchrone présentés dans les Figure 11 à Figure 13.

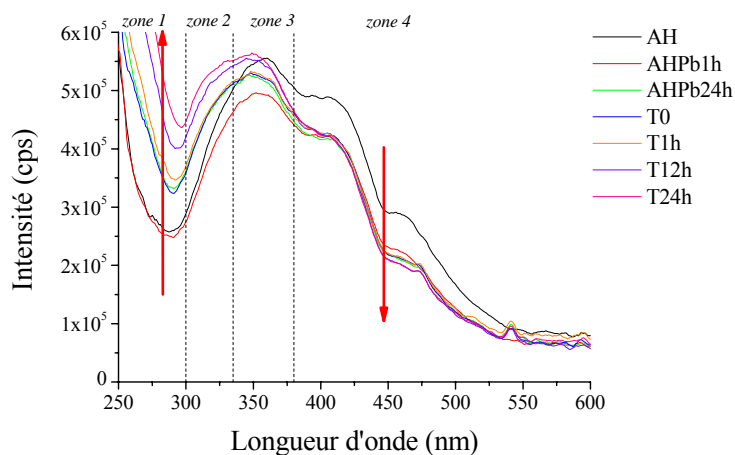


Figure 11 : Evolution en fonction du temps du spectre de fluorescence synchrone du mélange d'acide humique-Pb(II) après ajout de Zn(II).

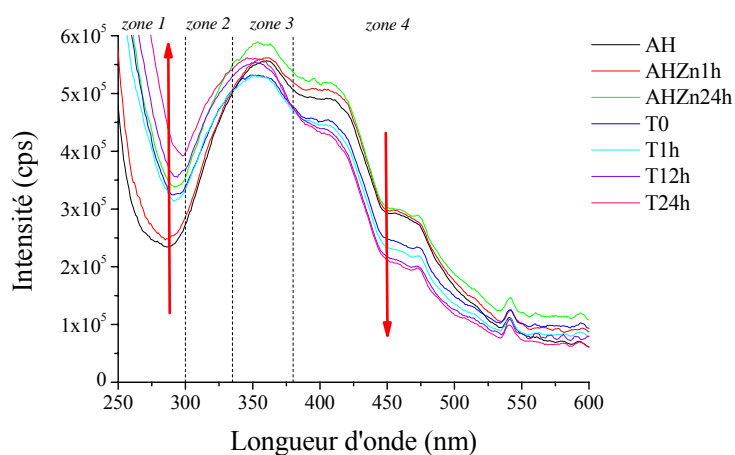


Figure 12 : Evolution en fonction du temps du spectre de fluorescence synchrone du mélange d'acide humique-Zn(II) après ajout de Pb(II).

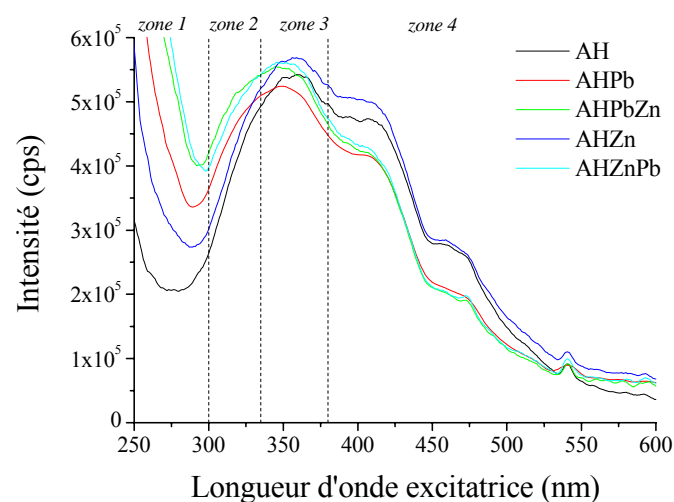


Figure 13 : Comparaison des spectres de fluorescence synchrone des mélanges d'acide humique-Pb(II)-Zn(II) selon le sens des ajouts des ions métalliques.

Le comportement des ions Pb(II) et Zn(II) dans la compétition vis à vis de l'acide humique est globalement du même type qu'entre Al(III) et Zn(II). Zn(II) complexe peu les fluorophores émettant au dessus de 400 nm et n'entre donc pas en compétition avec Pb(II) à ce niveau (les intensités observées des mélanges AHPbZn et AHZnPb sont identiques à celle de AHPb).

On note la très forte ressemblance entre les spectres des mélanges AHPbZn et AHZnPb (quasiment superposables cf. Figure 13). L'ordre des ajouts des deux sels métalliques n'a pas d'influence majeure sur la complexation finale de l'acide humique.

Dans les zones 1 et 2 de fluorescence (longueurs d'onde inférieures à 335 nm), les intensités des mélanges AHPbZn et AHZnPb sont la somme des variations d'intensité dues à la complexation de Pb(II) et Zn(II) ajoutée à l'intensité du spectre de AH : les effets des deux cations métalliques semblent donc simplement s'additionner sans se perturber (K_{SV} proches au signe près).

De manière similaire aux observations faites dans le cas de la compétition entre l'acide humique, Al(III) et Zn(II), une forte compétition a lieu entre Pb(II) et Zn(II) pour la complexation des fluorophores dans la zone 3 (bande à 350 nm). Malgré des valeurs relatives de K_{SV} plus forte pour la chélation entre AH et Pb(II) qu'entre AH et Zn(II) tendant à dire que Pb(II) possède une capacité complexante plus grande que Zn(II), l'intensité des mélanges AHPbZn et AHZnPb est supérieure ou égale à AH, signifiant donc que la contribution de la complexation de Zn(II) est plus forte que celle de Pb(II).

La décomposition des spectres de fluorescence reflète également les observations effectuées au niveau des intensités des mélanges dans la compétition entre Pb(II) et Zn(II) (Figure 14).

En dessous de 335 nm (zone 1 et 2), les amplitudes des bandes issues de la décomposition des mélanges AHPbZn et AHZnPb sont globalement la somme des variations dues à la complexation de Pb(II) et Zn(II). Les effets spectraux de la complexation de Pb(II) et Zn(II) s'additionnent sans interférence entre les deux cations (exception faite à 288 nm où le niveau de complexation de AH est moindre). On observe cependant que la complexation de Pb(II) par AH fournit soit des contributions légèrement supérieures à celle observée dans le cas de la

complexation entre AH et Zn(II) (bandes à 231, 241 nm) soit des contributions légèrement inférieures (bandes à 266, 288 et 312 nm). Les deux ions métalliques ont donc des pouvoirs de fixation proches pour les fluorophores émettant dans cette région.

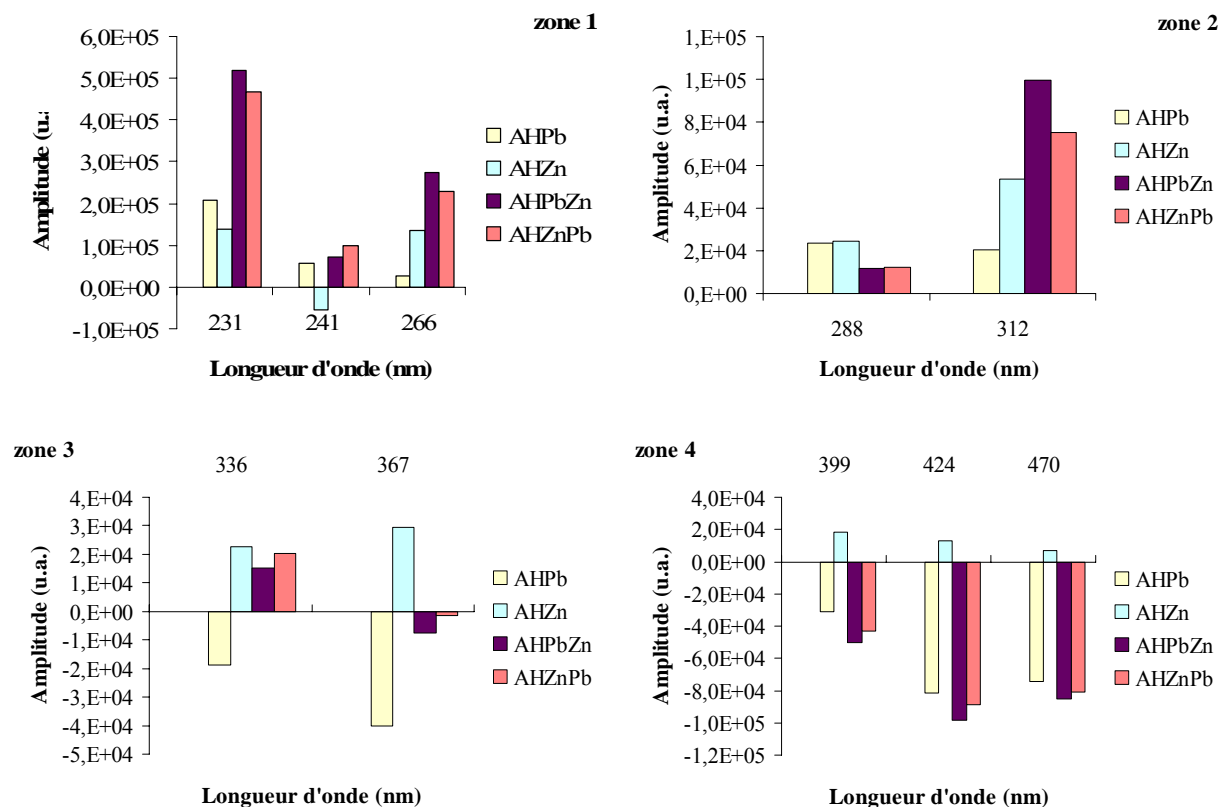


Figure 14 : Amplitudes des bandes obtenues par décomposition des spectres de fluorescence synchrone dans la compétition entre l'acide humique, le Pb(II) et le Zn(II) selon les zones remarquables de longueurs d'onde du spectre. Les amplitudes sont normalisées par rapport à celle de l'acide humique.

Au niveau de la zone 3 du spectre (vers 350 nm), les amplitudes des bandes pour les mélanges AHPbZn et AHZnPb sont supérieures (336 nm) ou proches (367 nm) de celle de l'acide humique alors que la complexation de Pb(II) provoque un quenching d'intensité sur le spectre de AH et que les valeurs absolues de K_{SV} sont supérieures dans le cas de la fixation de Pb(II). Ces contradictions apparentes montrent une fois de plus qu'il y a bien une aberration dans la prise en compte « classique » des interactions entre ions métalliques et acide humique. Un quenching ou une exaltation d'intensité de spectre de fluorescence sont la conséquence de phénomènes différents et ne peuvent pas être comparés à partir des valeurs de K_{SV} .

Au dessus de 400 nm, les spectres des mélanges AHPbZn et AHZnPb se superposent à celui du mélange AHPb. Les amplitudes des différentes bandes relatives à ces fluorophores traduisent également une contribution exclusive de la complexation de Pb(II) dans les amplitudes des mélanges avec deux ions métalliques. Comme précédemment dans la compétition entre Al(III) et Zn(II), le Zn(II) ne montre aucune affinité à complexer les fluorophores émettant dans cette zone (de type hydroxyles).

IV. Discussion

1) Influence du type de fluorophores complexés

La complexation d'un ion métallique par l'acide humique se fait de manière différente selon les fluorophores mis en jeu dans la réaction (cf. chapitre VI). Ainsi, au vu des constantes de Stern-Volmer, il apparaît une certaine variation du pouvoir complexant selon les longueurs d'onde c'est-à-dire selon les fluorophores.

La Figure 15 réunit les spectres de fluorescence observés lors de la complexation des ions Al(III), Pb(II) et Zn(II) dans les mêmes conditions que celles où ont été réalisées les expériences de compétition.

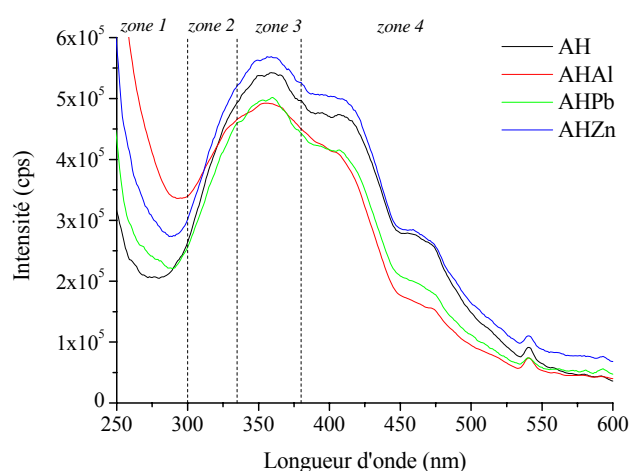


Figure 15 : Spectres de fluorescence synchrone des mélanges d'acide humique avec un cation métallique ($T_{AH} = 10$ mg/L ; $(Me) = 3.10^{-5}$ mol/L).

Selon les principales zones détaillées auparavant, les modifications de l'intensité de fluorescence sont différentes selon les ions métalliques :

- zone 1 : en dessous de 300 nm : l'ajout de chacun des trois cations exalte l'intensité de fluorescence du spectre de l'acide humique :

$$K_{SV}(Al) > K_{SV}(Zn) > K_{SV}(Pb) \text{ (constante négative) ;}$$

- zone 2, 3 et 4 : au dessus de 300 nm : l'ajout d'Al(III) ou Pb(II) provoque un quenching et celui de Zn(II) une exaltation du spectre de AH : $K_{SV}(Al) > K_{SV}(Pb)$ (constante positive); en valeur absolue la constante de Zn(II) est comprise entre les 2 autres pour la zone 2 ($Al > Zn > Pb$) et inférieure pour les zones 3 et 4 ($Al > Pb > Zn$).

Cependant lors des compétitions, le pouvoir de Zn(II) ne s'est pas avéré correspondre aux prédictions faites à partir des K_{SV} , puisque nous trouvons les conclusions suivantes :

- zone 1 : $Al(III) > Pb(II) \approx Zn(II)$
- zone 2 : $Zn(II) \geq Al(III) \approx Pb(II)$
- zone 3 : $Zn(II) > Al(III) > Pb(II)$
- zone 4 : $Al(III) > Pb(II) \gg Zn(II)$

La région 2 (entre 300 et 335 nm, correspondant à un épaulement vers 320 nm sur le spectre de l'acide humique) est difficile à décrire, elle correspond à une zone de forte compétition où l'effet de l'ajout de Al(III) et de Pb(II) change d'un phénomène d'exaltation à un autre de quenching.

Les Figure 16 à Figure 18 montrent, sur un même graphe, l'influence du second cation métallique ajouté permettant de mettre en évidence plus facilement les interactions de la complexation des deux ions métalliques.

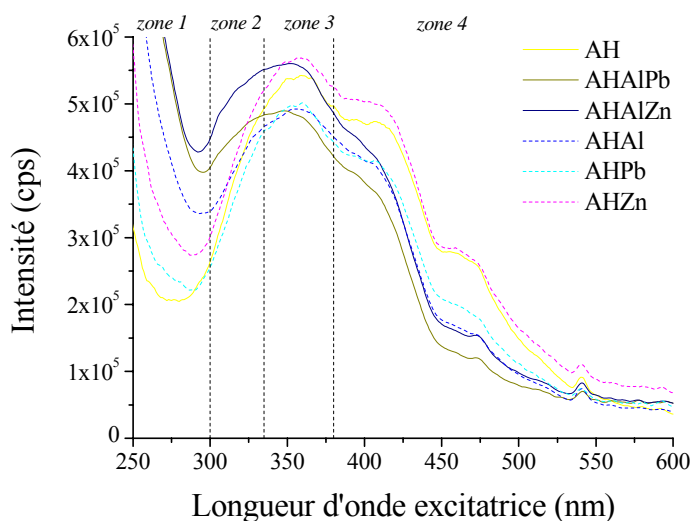


Figure 16 : Spectres de fluorescence synchrone des mélanges d'acide humique-Al(III) après ajout de Pb(II) ou Zn(II) ($T_{AH} = 10\text{mg/L}$; $(Me) = 3.10^{-5}\text{ mol/L}$).

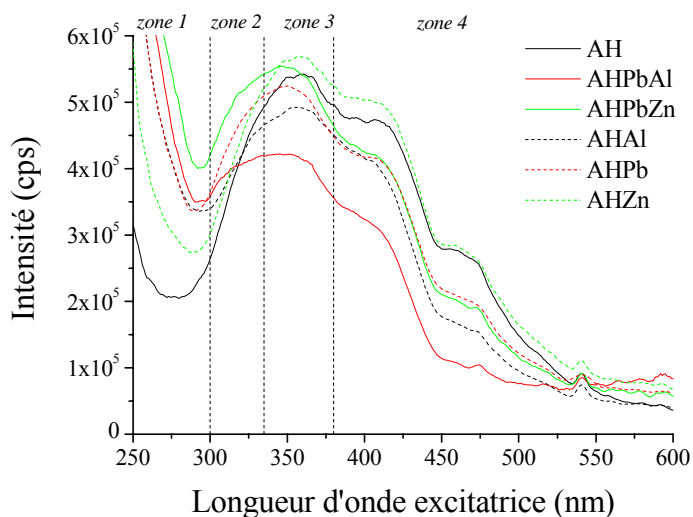


Figure 17 : Spectres de fluorescence synchrone des mélanges d'acide humique-Pb(II) après ajout de Al(III) ou Zn(II) ($T_{AH} = 10\text{mg/L}$; $(Me) = 3.10^{-5}\text{ mol/L}$).

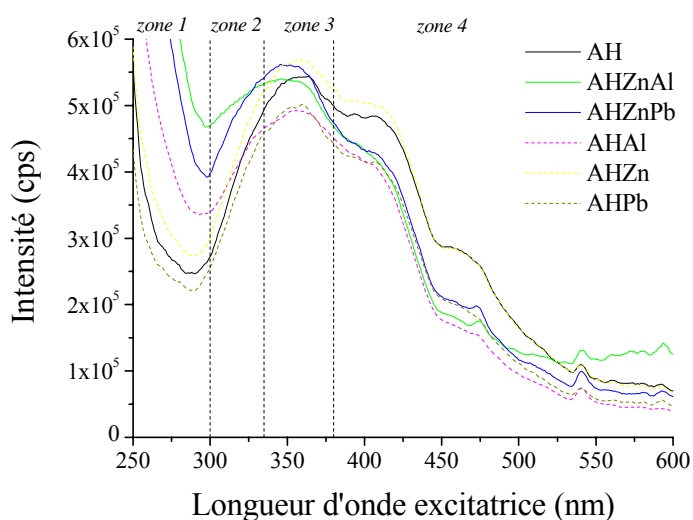


Figure 18 : Spectres de fluorescence synchrone des mélanges d'acide humique-Zn(II) après ajout de Al(III) ou Pb(II) ($T_{AH} = 10\text{mg/L}$; $(Me) = 3.10^{-5}\text{ mol/L}$).

Dans la zone 1, lorsqu'Al(III) est ajouté en 1^{er} (Figure 16) l'addition de Pb(II) ou Zn(II) aboutit à la même intensité spectrale : ils ont donc des forces équivalentes dans cette région de fluorescence. Dans la zone 2, les intensités des 2 mélanges AHAIPb et AHAIZn sont supérieures à celle de AH de plus $I_{AHAIZn} > I_{AHAIPb}$ indiquant que Zn(II) est plus complexant que Pb(II) pour ces fluorophores. Concernant la zone 3, il a été montré précédemment que Al(III) empêchait la complexation de Pb(II) et le fait que $I_{AHAIZn} = I_{AHZn}$ indique que la complexation de Zn(II) n'est pas bloquée par celle d'Al(III) et qu'il se fixe sur des sites différents de Pb(II).

La Figure 17 réunissant les graphes des mélanges où Pb(II) est ajouté en 1^{er} à l'acide humique confirme que Zn(II) n'a aucun effet pour des longueurs d'onde supérieures à 400 nm et qu'il existe dans la zone 1 des interactions entre Al(III) et Pb(II) bloquant légèrement la complexation d'Al(III) étant donné que $I_{AHPbAl} \approx I_{AHPbZn}$ et que la complexation d'Al(III) est plus aisée que celle de Zn(II).

Enfin la Figure 18 (spectres où Zn(II) est ajouté en 1^{er} à une solution d'acide humique) confirment que AH fixe moins facilement Pb(II) que Al(III) sur l'ensemble des longueurs d'onde du spectre : $I_{AHZnAl} > I_{AHZnPb}$ dans les zones où tous deux exaltent l'intensité de AH, et $I_{AHZnAl} < I_{AHZnPb}$ dans les autres régions spectrales où Al(III) et Pb(II) diminuent l'intensité de fluorescence de AH.

2) Considérations globales

De la Figure 19 à Figure 21 sont rassemblés les expériences ayant le même second ion métallique ajouté, montrent des effets non observés lorsque l'on étudie la compétition qu'entre deux ions métalliques.

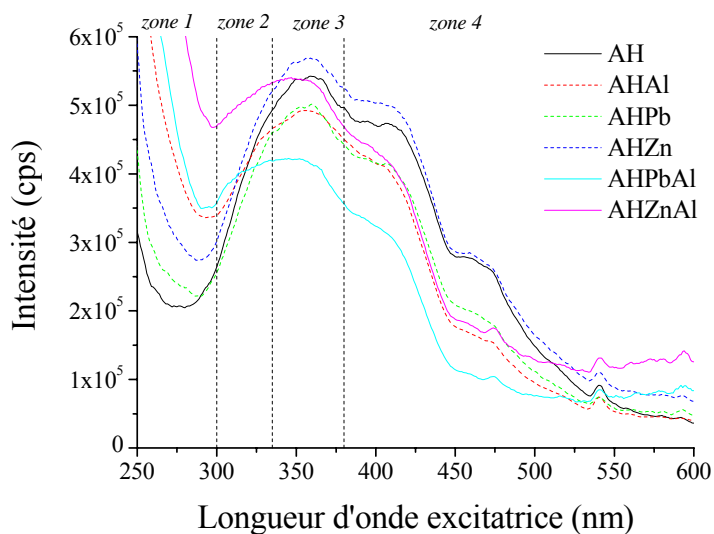


Figure 19 : Spectres de fluorescence synchrone des mélanges d'acide humique suivant le 1^{er} ion ajouté avant Al(III) ($T_{AH} = 10\text{mg/L}$; $(Me) = 3.10^{-5}\text{ mol/L}$).

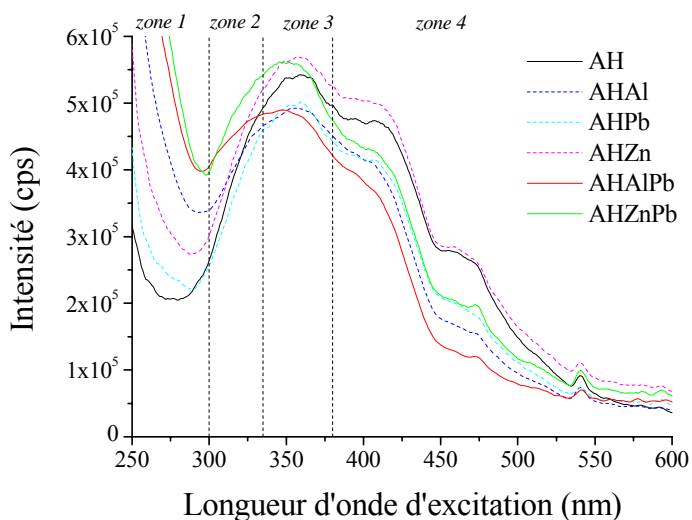


Figure 20 : Spectres de fluorescence synchrone des mélanges d'acide humique suivant le 1^{er} ion ajouté avant Pb(II) ($T_{AH} = 10\text{mg/L}$; $(Me) = 3.10^{-5}\text{ mol/L}$).

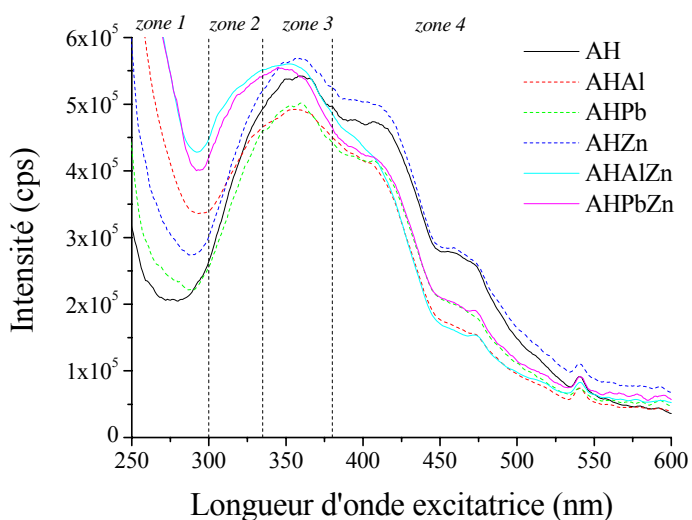


Figure 21 : Spectres de fluorescence synchrone des mélanges d'acide humique suivant le 1^{er} ion ajouté avant Zn(II) ($T_{AH} = 10\text{mg/L}$; $(Me) = 3.10^{-5}\text{ mol/L}$).

La Figure 19 présente les spectres des mélanges ayant pour dernier cation ajouté Al(III) (AHPbAl et AHZnAl), la supériorité de complexation de AH pour Zn(II) est confirmée dans la zone 3 (bande à 350 nm). Le pouvoir de complexation de Pb(II) dans les courtes longueurs d'onde (zones 1 et 2) est le plus faible des trois ions métalliques : l'intensité de fluorescence du mélange AHPbAl est sensiblement la même que celle du mélange AHAl tandis que celui de AHZnAl le dépasse très nettement.

Les spectres des expériences où Pb(II) est le 2^{ème} ion ajouté (Figure 20) révèlent que, dans le domaine des courtes longueurs d'onde (zone 1 uniquement), l'intensité de fluorescence des mélanges AHAlPb et AHZnPb est la même. La proximité des intensités des deux mélanges dans cette zone où les trois ions métalliques exaltent l'intensité du spectre de l'acide humique, peut signifier que le nombre limite de fluorophores complexés soit atteint et que l'excès d'ions métalliques n'a que peu d'influence sur l'intensité du spectre. On peut alors dire que le nombre de fluorophores de ce domaine est inférieur ou égal à 6.10^{-5} mol/L soit 6.10^{-6} mol/mg d'acide humique (somme de la teneur des deux ions métalliques ajoutés à l'acide) car l'intensité des spectres est la même que celle du mélange AH-Al à la concentration de saturation de Al(III).

La Figure 21 révèle des faits similaires : les mélanges AHAlZn et AHPbZn ont des intensités très proches (voire identiques) sur une région encore plus étendue (zones 1, 2 et 3 c'est-à-dire pour des longueurs d'onde inférieures à 380 nm). De plus, on remarque que le spectre du mélange AHZnPb est lui aussi identique à ces deux mélanges dans cette région spectrale. Il faut ajouter à cela le fait que si dans la zone 1 l'ajout de chacun des ions exalte l'intensité de AH, dans les zones 2 et 3, les effets sont différents. L'ajout d'Al(III) et Pb(II) inhibe le spectre et l'ajout de Zn(II) l'augmente.

Pour les longueurs d'onde inférieures à 300 nm, les intensités des mélanges AHAlZn, AHAlPb, AHPbAl, AHPbZn, AHZnPb sont comparables. Une saturation du nombre de sites potentiels de complexation évoquée auparavant se confirme donc ici. Le problème étant alors de savoir pourquoi dans ce cas l'intensité du mélange AHZnAl n'est pas aussi égal à ceux de AHAlZn, AHAlPb, AHPbAl, AHPbZn, AHZnPb. On peut évoquer une gêne occasionnée par

Al(III) sur la fixation de Zn(II) : l'intensité observés pour AHZnAl est plus élevée que celles de tous les autres mélanges car Al(III) et Zn(II) sont les deux ions les plus fortement complexés et que Zn(II) ne bloque pas la complexation d'Al(III). Dans cette hypothèse, et en admettant qu'il existe au moins deux grands groupes de fluorophores dans cette zone, la saturation observée précédemment n'est pas totale, elle correspond à la saturation d'un type de fluorophores.

Par contre, ces conclusions ne sont plus vraies pour expliquer l'égalité des mélanges AHAIZn, AHZnAl, AHZnPb et AHPbZn dans les zones 2 et 3 puisque les trois cations métalliques n'engendrent pas le même effet sur l'intensité du spectre de l'acide humique.

V. Conclusion

Dans les chapitres précédents, l'étude par fluorescence synchrone d'un acide humique a permis de mettre en évidence les effets de la complexation des cations métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II) (quenching ou exaltation de l'intensité du spectre de l'acide humique). Il a été également montré que l'intensité de ces effets sont différents en fonction des fluorophores.

La compétition entre deux ions métalliques a permis de proposer un classement des fluorophores en fonction des zones d'apparition dans le spectre de l'acide humique :

- zone 1 (en dessous de 300 nm) : dans cette zone, les fluorophores sont insensibles au pH. Les ions Al(III) fixés semblent bloquer la complexation de Zn(II) :
$$\text{Al(III)} > \text{Zn(II)} \geq \text{Pb(II)}$$
- zone 2 (entre 300 et 335 nm) pour des fluorophores associés aux groupements polyphénoliques, on peut proposer l'ordre suivant :
$$\text{Zn(II)} \geq \text{Al(III)} > \text{Pb(II)}$$
- zone 3 (entre 335 et 380 nm) : les fluorophores sont associés aux groupements acides ; Zn(II) est le cation le mieux complexé, de plus il semble y avoir une interaction entre Al(III) et Pb(II) c'est-à-dire que Al(III) fixé inhibe la complexation de Pb(II) :
$$\text{Zn(II)} > \text{Al(III)} > \text{Pb(II)}$$
- zone 4 (au dessus de 380 nm) où les fluorophores sont également associées aux fonctions polyphénoliques, on peut proposer l'ordre suivant :
$$\text{Al(III)} > \text{Pb(II)} \gg \text{Zn(II)}$$

La mise en compétition des différents sels a donc permis d'élucider le problème du classement des pouvoirs complexants des cations étudiés en mettant en évidence notamment que les effets de quenching et d'exaltation sont les conséquences de mécanismes très différents et que les constantes de complexation (K_{SV}) ne peuvent pas être comparés si elles sont de signes différents.

Globalement on constate qu'Al(III) se fixe de manière prépondérante sur l'ensemble des sites de l'acide humique. On observe également que Zn (II) présente une plus grande sélectivité en fonction des sites, et qu'il peut être le plus complexant des trois cations (principalement sur les sites associés aux zones 2 et 3); ce phénomène n'avait pas pu être mis en évidence auparavant. Enfin, Pb(II), qui est globalement l'ion le moins complexé, présente comme Zn(II) des interactions avec l'acide humique plus spécifiques qu'Al(III).

VI. Bibliographie

1. Golonka, I., Czechowski, F., & Jezierski, A. (2005) *Geoderma* **127**, 237-252.
2. Linnik, P. N. (2003) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **376**, 405-412.
3. Pandey, A. K., Pandey, S. D., & Misra, V. (2000) *Ecotoxicology and Environmental Safety* **47**, 195-200.
4. Provenzano, M. R., D'Orazio, V., Jerzykiewicz, M., & Senesi, N. (2004) *Chemosphere* **55**, 885-892.
5. Misra, V., Pandey, S. D., & Viswanathan, P. N. (1996) *Chemistry and Ecology* **13**, 103-112.
6. Hiradate, S. & Yamaguchi, N. U. (2003) *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**, 26-31.
7. Dupuy, N. & Douay, F. (2001) *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **57**, 1037-1047.
8. Mota, A. M., Rato, A., Brazia, C., & Goncalves, M. L. S. (1996) *Environmental Science and Technology* **30**, 1970-1974.
9. Kinniburgh, D. G., van Riemsdijk, W. H., Koopal, L. K., Borkovec, M., Benedetti, M. F., & Avena, M. J. (1999) *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151**, 147-166.
10. Pinheiro, J. P., Mota, A. M., & Benedetti, M. F. (2000) *Environmental Science and Technology* **34**, 5137-5143.
11. Tipping, E., Rey-Castro, C., Bryan, S. E., & Hamilton-Taylor, J. (2002) *Geochimica et Cosmochimica Acta* **66**, 3211-3224.
12. van den Hoop, M. A. G. T., van Leeuwen, H. P., Pinheiro, J. P., Mota, A. M., & de L. Simoes Goncalves, M. (1995) *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* **95**, 305-313.
13. LabSpec Raman Spectroscopy Software v 4.02 (HORIBA Jobin Yvon).
14. Larrivee, E. M., Elkins, K. M., Andrews, S. E., & Nelson, D. J. (2003) *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**, 32-45.
15. Porquet, A., Duval, J. F. L., & Buffle, J. (2006) *Macromolecular Theory and Simulations* **15**, 147-162.

Chapitre VIII

Mise en compétition d'un acide humique et de petites molécules organiques pour la complexation d'ions métalliques

Chapitre VIII

Mise en compétition d'un acide humique et de petites molécules organiques pour la complexation d'ions métalliques

I. Introduction.....	229
II. Principe des expériences de compétition.....	230
1) Déplacement des polluants dans les sols.....	230
2) Détermination des fractions complexées	232
3) Etudes préliminaires	235
a. L'acide humique.....	235
b. Les acides chlorogénique et gallique.....	236
III. Compétition entre l'acide humique et l'acide chlorogénique	237
1) Complexation de l'aluminium (III).....	237
2) Complexation du plomb (II).....	240
3) Complexation du zinc (II).....	243
IV. Compétition entre l'acide humique et l'acide gallique.....	244
1) Complexation de l'aluminium (III).....	244
2) Complexation du plomb (II).....	246
V. Conclusion	250

VI. Bibliographie 252

I. Introduction

La complexation de chacun des ions Al(III), Pb(II) et Zn(II) avec l'acide humique a fourni de nouveaux indices concernant les pouvoirs spécifiques de fixation de ces derniers.

Le travail exposé dans cette dernière partie a pour but de mettre en évidence les phénomènes de transfert de polluants (migration) dans les sols.

En effet, on retrouve dans les sols la coexistence des acides humiques et de molécules organiques de faible taille, fragments ou précurseurs des AH. Ces derniers sont beaucoup plus mobiles que les macromolécules et sont considérés comme des vecteurs du transport des métaux polluants. Le but de ce travail est d'essayer de mettre en évidence les transferts possibles des cations métalliques entre acide humique et petites molécules organiques.

En s'appuyant sur les résultats concernant la fixation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) sur l'acide humique d'une part et sur les molécules d'acides chlorogénique et gallique d'autre part, des expériences de compétitions entre ces substances organiques pour la complexation de cations métalliques ont été réalisées en solution aqueuse, à pH = 6.

II. Principe des expériences de compétition.

1) Déplacement des polluants dans les sols

La partie organique du sol, bien que représentant seulement 5 à 10% en masse du sol est considérée comme un des principaux agents fixateurs des espèces métalliques grâce à sa grande force complexante (1-9). La fraction organique (cf. chapitre I) est constituée majoritairement de macromolécules de type substances humiques. Toutefois ces espèces possèdent des poids moléculaires importants (masse molaire comprise entre 1900 et 3400 g/mol) qui rendent leur migration difficile (10). Ce sont en effet les molécules de taille plus faible (précurseurs, produits issus de la décomposition, fragments ...) qui vont pouvoir se déplacer à travers les différentes strates du sol.

Dans le but d'évaluer les problèmes de rétention et de migration des espèces métalliques, des expériences de compétition entre l'acide humique (macromolécule) et deux composés organiques de faible taille présents dans les sols (les acides chlorogénique et gallique, tous deux des précurseurs de l'acide humique) ont été réalisées.

Afin de mettre en évidence les transferts de métaux entre les deux composés (acide humique et acide chlorogénique ou gallique), trois types d'expériences ont été menés :

- 1^{ère} expérience (noté AHMeAC ou AHMeAG) : une solution d'ions métalliques est complexé par l'acide humique, le mélange est laissé 24h au bout desquelles le précurseur est ajouté. Cette expérience permet de voir si le précurseur est capable d'extraire des ions Al(III), Pb(II) ou Zn(II) fixés à l'acide humique ;
- 2^{ème} expérience (ACMeAH ou AGMeAH) : le précurseur est mélangé à une solution de sels métalliques, le tout est laissé pendant 24h afin d'atteindre l'équilibre de complexation. L'acide humique est alors rajouté. Cette manipulation a pour but de préciser le pouvoir de rétention des deux acides de petite taille ;
- 3^{ème} expérience (AHACMe ou AHAGMe) : une solution mixte d'acide humique et de précurseur est préparée, laissée 24h en chambre de température et additionnée finalement d'une solution de cation métallique. Ici, les interactions entre la macromolécule et le fragment seront particulièrement mises en évidence.

Toutes les expériences sont réalisées en milieu aqueux à $\text{pH} = 6$ avec une force ionique constante fixée à $0,1 \text{ mol/L}$. Les concentrations choisies sont pour l'acide humique 10 mg/L (permettant un bon compromis entre signal et concentration), $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ pour le précurseur (valeur proche de l'équivalent en moles d'acides de l'acide humique) et des concentrations allant de $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ à $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ (valeur inférieure à la valeur de saturation) pour l'ion métallique.

Dans la littérature, les compétitions d'espèces métalliques dans des systèmes humiques sont plus aisément traitées que les cas de compétition de substances humiques avec des molécules organiques de faibles poids moléculaires (MOFPM). Or des travaux ont souligné que ces composés sont responsables de la diminution de l'adsorption par les substances humiques de nombreux métaux comme le cuivre, le plomb, le cadmium et le zinc en diminuant le nombre potentiel de sites de fixation covalente augmentant ainsi la mobilité des métaux (15).

La complexation de composés polycycliques aromatiques par l'acide humique différencie deux catégories de composés organiques : les espèces chargées ou non ; l'adsorption est alors maximum à des pH proches du pK_a des MOFPM (13). L'adsorption du pyrène par des substances humiques suivie par fluorescence met en évidence l'environnement hydrophobe du composé et la formation d'agglomérats intra et intermoléculaires (16).

Des modèles extrapolant la compétition entre un métal / un composé organique et un acide humique mettent en évidence la formation de complexes ternaires mais ces interactions restent plus faibles que celles entre les deux composés organiques (17).

Ces compétitions entre espèces organiques et substances humiques dans la complexation de métaux sont réalisées dans la majorité des cas pour évaluer les problèmes d'adsorption d'espèces métalliques au niveau des plantes (racines) : des résultats concernant la fixation de Cu, Pb, Fe, Cd, Zn et Mn révèlent que l'acide humique diminue la quantité assimilée par les plantes pour des métaux à forte affinité pour la MOS (Cu, Pb et Fe) mais l'augmente pour les métaux à faible affinité (que sont Cd, Zn et Mn) (14). Une étude à $\text{pH} = 6$ a démontré que dans la compétition entre une algue, un acide humique et Zn(II), l'acide humique conservait

un rôle pépondérant dans la disponibilité de Zn par rapport aux autres composés organiques et que 1/8 du métal est complexé par l'acide humique (11).

2) Détermination des fractions complexées

Une stratégie simple a été adoptée pour avoir accès aux valeurs des quantités complexées d'acide humique et de précurseur. L'utilisation conjointe des spectroscopies UV-visible et de fluorescence a permis respectivement d'obtenir des informations sur le précurseur et sur l'acide humique (Figure 1). La spectroscopie de fluorescence synchrone est utilisée pour étudier la complexation de l'acide humique, tandis que la spectroscopie d'absorption UV-visible permet de suivre celle des précurseurs.

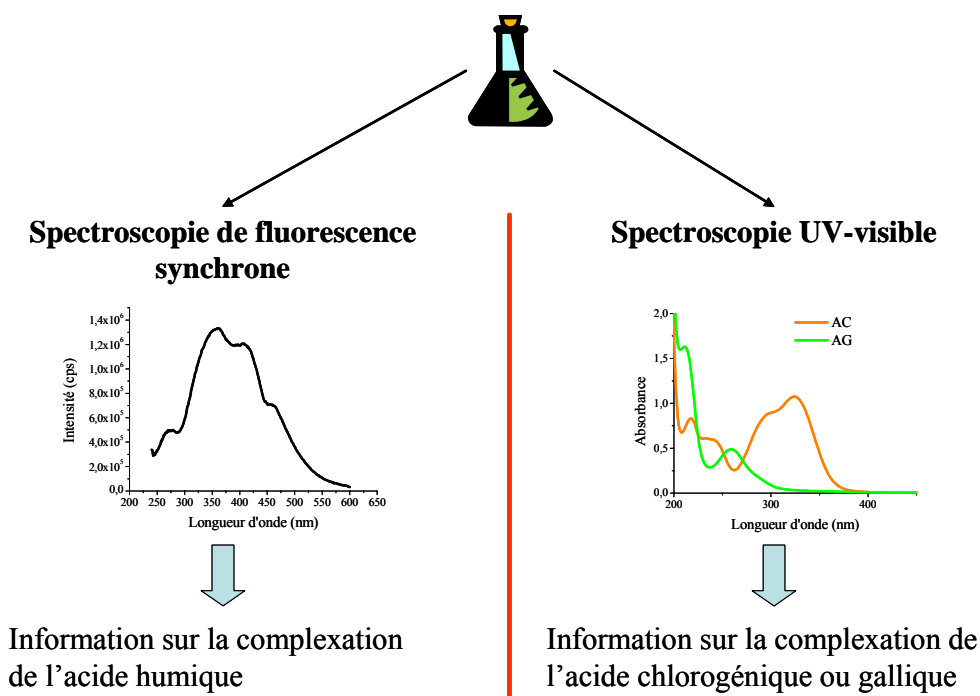


Figure 1 : Principe des mesures réalisées pour les compétitions entre acide humique (dont le spectre de fluorescence synchrone est présenté à gauche) et les acides chlorogénique et gallique (notés AC et AG sur leur spectre UV-visible ci-dessus).

Des interactions au niveau spectral (recouvrement de bandes) peuvent toutefois gêner les observations. Toutefois dans notre cas, les spectres (Figure 2 et Figure 3) montrent qu'en

UV-visible ou en fluorescence, le spectre UV-visible des précurseurs ou celui de fluorescence de l'acide humique n'est pas altéré par le mélange.

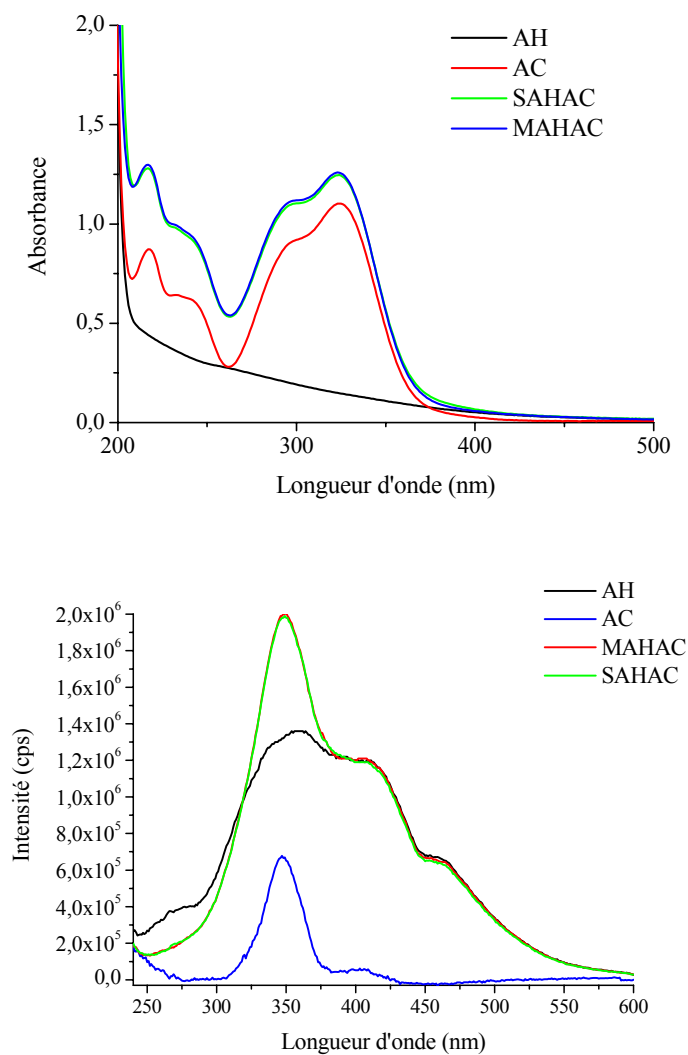


Figure 2 : Spectres UV-visible et de fluorescence des différentes espèces : acide humique (AH), acide chlorogénique (AC), mélange des deux espèces (MAHAC) et somme des spectres de l'acide humique et de l'acide chlorogénique (SAHAC). En ce qui concerne la fluorescence de SAHAC, la bande de l'eau vers 400 nm a été supprimée. Le spectre UV-visible de l'acide humique crée un fond qui n'est pas modifié par complexation ou variation de pH et peut donc être facilement soustrait. En fluorescence, le spectre de l'acide chlorogénique comporte une bande à 350 nm qui varie en intensité au cours de l'ajout de métal, nous nous intéresserons donc aux bandes à 405 et 465 nm.

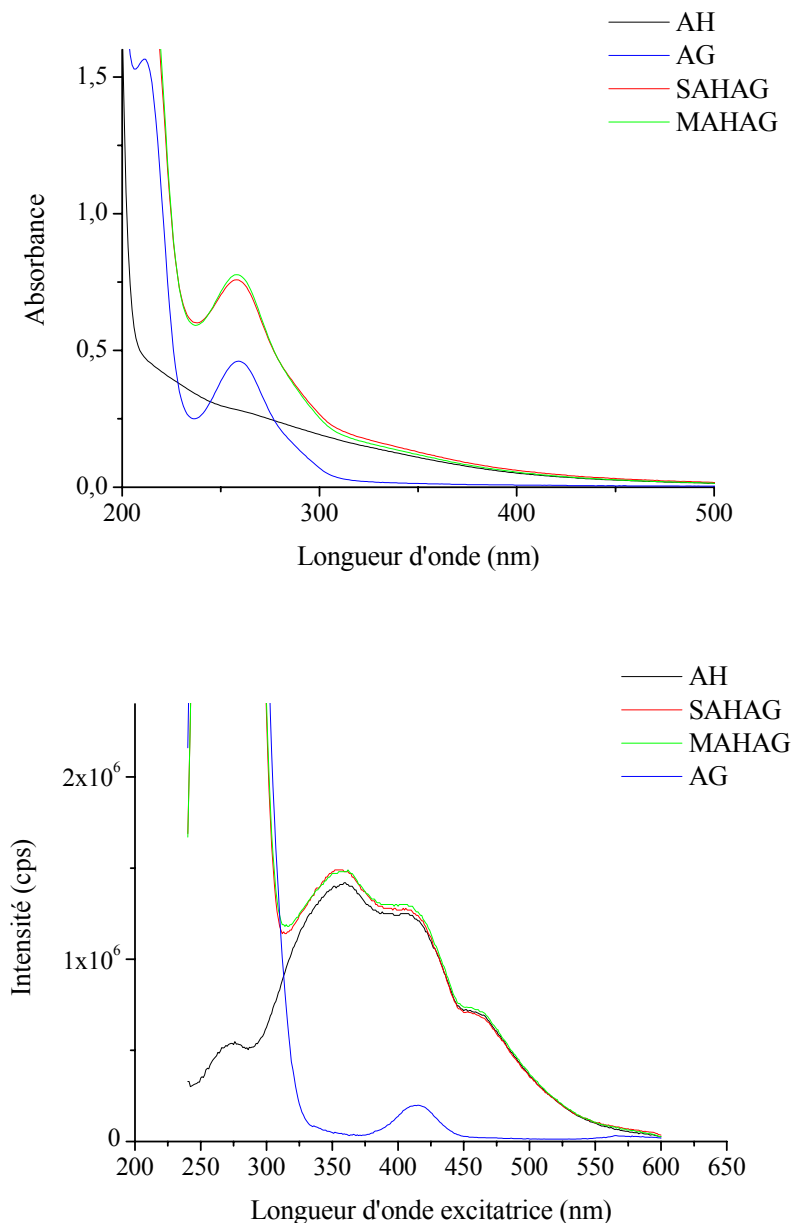


Figure 3 : Spectres UV-visible et de fluorescence des différentes espèces : acide humique (AH), acide gallique (AG), mélange des deux espèces (MAHAG) et somme des spectres de l'acide humique et de l'acide gallique (SAHAG). En ce qui concerne la fluorescence de SAHAG, la bande de l'eau vers 400 nm a été également supprimée. Même remarque pour le spectre UV-visible de l'acide humique. En fluorescence, le spectre de l'acide gallique comporte une bande à 260 nm qui varie en intensité au cours de l'ajout en métal sans apparition de nouvelles bandes, nous nous intéresserons donc aux bandes à 350, 405 et 465 nm.

3) Etudes préliminaires

a. L'acide humique

Lors de l'étude de l'acide humique IHSS dans le chapitre VI, les spectres de fluorescence obtenus lors de la complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) ont permis de déterminer une relation directe et linéaire entre l'intensité du spectre synchrone et la teneur en ion métallique.

Précédemment nous avons vu que la variation d'intensité du spectre de l'acide humique avec un ion métallique donné n'est pas la même pour l'ensemble des longueurs d'onde du spectre, le choix de la longueur d'onde d'analyse doit donc être dicté par la précision de la mesure (intensité forte) et la non-perturbation de l'observation avec la molécule organique en compétition avec l'acide humique.

Ainsi, en se plaçant à une longueur d'onde de 465 nm sur le spectre de fluorescence synchrone de l'acide humique, le rapport $\frac{I_{(465\text{nm})}}{I_{0(465\text{nm})}}$ (où I et I₀ sont les intensités de fluorescence du mélange et de l'acide humique seul à la longueur d'onde indiquée) est directement proportionnel à la quantité d'ions métalliques ajoutés sans perturbation ni de l'acide chlorogénique ni de l'acide gallique (Figure 2 et Figure 3).

Dans le cas de Al(III), Pb(II) et Zn(II), les relations suivantes (Équation 1) ont permis de déterminer dans un mélange AH/AC ou AH/AG la quantité de cations métalliques responsable de l'évolution de l'intensité du spectre de fluorescence de AH. Cette quantité calculée est en réalité l'équivalent de la quantité d'ion métallique présent si l'acide humique était seul en solution ; cette dernière ne différencie pas la quantité libre et fixée à la macromolécule mais offre une valeur de comparaison pour les différents cas de compétition AH/molécule organique. Nous appellerons par la suite cette donnée C_{Me(AH)} où Me désigne Al(III), Pb(II) ou Zn(II).

$$\frac{I_{(465\text{nm})}}{I_{0(465\text{nm})}} = -12853.C_{\text{Al(AH)}} + 0,9963$$

Équation 1 :

$$\frac{I_{(465\text{nm})}}{I_{0(465\text{nm})}} = -6462.C_{\text{Pb(AH)}} + 1$$

$$\frac{I_{(465\text{nm})}}{I_{0(465\text{nm})}} = 55,26.C_{\text{Zn(AH)}} + 1 \quad \text{ou} \quad \frac{I_{(405\text{nm})}}{I_{0(405\text{nm})}} = 193,19.C_{\text{Zn(AH)}} + 1$$

b. Les acides chlorogénique et gallique

De la même manière que la quantité d'ion métallique fixé à l'acide humique a été calculée, le spectre UV-visible du mélange AH-AC ou AH-AG nous fournit la quantité d'ion métallique fixé à l'acide chlorogénique ou d'acide gallique grâce à la variation d'absorbance aux maxima de la forme complexée ou de la molécule organique libre (Équation 2 et Équation 3).

$$\frac{A_{(356\text{nm})}}{A_{0(356\text{nm})}} = 61402.C_{\text{Al(AC)}} + 1$$

Équation 2 :

$$\frac{A_{(382\text{nm})}}{A_{0(382\text{nm})}} = 19809.C_{\text{Pb(AC)}} + 1$$

$$\frac{A_{(382\text{nm})}}{A_{0(382\text{nm})}} = 6804.C_{\text{Zn(AC)}} + 1$$

$$\frac{A_{(288\text{nm})}}{A_{0(288\text{nm})}} = 24500.C_{\text{Al(AG)}} + 1$$

Équation 3 :

$$\frac{A_{(253\text{nm})}}{A_{0(253\text{nm})}} = -3094.C_{\text{Pb(AG)}} + 1$$

La compétition entre l'acide humique, l'acide gallique et le zinc (II) n'a pas été réalisée puisque l'acide gallique ne complexe pas du tout Zn(II).

Les valeurs des concentrations obtenues à partir de l'intensité de fluorescence du mélange ($C_{\text{Me(AH)}}$ et $C_{\text{L(AH)}}$) sont converties par la suite en un pourcentage par rapport à

l'expérience sans compétition. Par exemple, si la concentration d'acide chlorogénique complexée a été évaluée à $4,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L pour un mélange AHACAl où l'on a ajouté $6 \cdot 10^{-5}$ mol/L d'aluminium (III), le « pourcentage » d'acide chlorogénique complexé est de $\frac{4,5}{6} * 100 = 75\%$.

III. Compétition entre l'acide humique et l'acide chlorogénique

1) Complexation de l'aluminium (III)

Les spectres UV-visible et de fluorescence de la compétition entre l'acide humique, l'acide chlorogénique dans la complexation de Al(III) vont permettre de déterminer les pourcentages d'ions métalliques fixés soit à l'acide humique soit à l'acide chlorogénique. Les résultats numériques des expériences seront exposés pour toutes les expériences réalisées mais seuls les spectres de l'expérience avec une concentration en Al(III) de $6 \cdot 10^{-5}$ mol/L seront commentés (les autres présentent les mêmes tendances) (Figure 4 et Figure 5).

Sur la Figure 4, les spectres UV-visible de l'acide chlorogénique, du mélange d'acide chlorogénique-Al(III) à un rapport $R = \frac{[Al(III)]}{[AC]} = 1$, et des trois mélanges acide humique-acide chlorogénique-Al(III) sont superposés. On note la présence de la bande à 356 nm caractéristique de la complexation entre l'acide chlorogénique et Al(III). Comme il a été remarqué précédemment, la présence d'acide humique ne perturbe pas l'observation de cette bande et les concentrations $C_{Al(AC)}$ peuvent être déduites aisément. Ainsi nous mettons en évidence que d'une part la présence de AH dans les trois expériences diminue de manière significative la quantité d'Al(III) fixé sur AC (intensité plus faible que le mélange AC-Al(III)), et que d'autre part l'expérience où l'acide chlorogénique est ajouté à une solution d'acide humique complexé présente de loin le moins d'acide chlorogénique lié par le cation métallique.

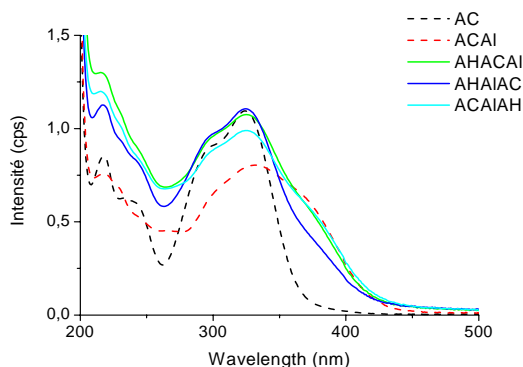


Figure 4 : Spectres UV-visible du mélange acide humique 10mg/L, acide chlorogénique $6.10^{-5}M$ et Al(III) $6.10^{-5}M$ à pH=6 (force ionique=0.1M).

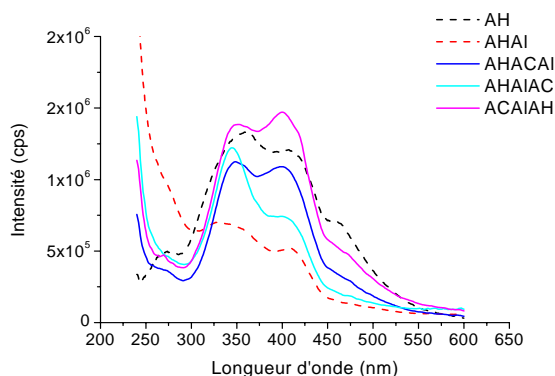


Figure 5 : Spectres de fluorescence synchrone (offset 70 nm) du mélange acide humique 10mg/L, acide chlorogénique $6.10^{-5}M$ et Al(III) $6.10^{-5}M$ à pH=6 (force ionique=0.1M).

Les deux autres expériences (celles où l'acide humique ou Al(III) est additionné en dernier) ont des teneurs en acide chlorogénique complexées très proches. Si on classe les trois expériences selon $\%_{Al(AC)}$, nous obtenons :

$$AC \text{ Al } \mathbf{AH} \geq AH \text{ AC } \mathbf{AI} > AH \text{ Al } \mathbf{AC} \text{ (selon } \%_{Al(AC)})$$

Il semble donc que les deux acides ont des pouvoirs de complexation comparable même si AC retire avec plus de difficultés les cations Al (III) déjà fixés sur AH qu'il ne le complexe en sa présence.

Les données de fluorescence qui concernent AH sont quant à elles « le symétrique » et confirment ce qui vient d'être énoncé (Figure 5). Les trois expériences montrent des taux d'AH complexé plus faibles que si AC était absent, et le classement des trois manipulations selon la quantité d'acide humique complexé est :

$$AH \text{ Al } \mathbf{AC} > AH \text{ AC } \mathbf{AI} > AC \text{ Al } \mathbf{AH} \text{ (selon } \%_{Al(AH)})$$

Ces observations confirment que les pouvoirs de chélation de AH et AC sont comparables (compétition pour la complexation) et que l'extraction d'un cation métallique d'un des deux

composés organiques par le second acide est toujours difficile. Ceci peut être corrélé au fait que Al(III) ajouté à un mélange d'AH et AC se fixe de manière très efficace.

Le tableau suivant (Tableau 1) présente les résultats pour toutes les expériences réalisées.

[Al(III)] (mol/L)	% _{Al(AC)} (UV-visible)			% _{Al(AH)} (fluorescence)		
	AH AC Al	AH Al AC	AC Al AH	AH AC Al	AH Al AC	AC Al AH
1,5.10 ⁻⁵	43	20	53	≈100	≈100	97
3.10 ⁻⁵	40	30	68	88	85	46
4,5.10 ⁻⁵	60	40	90	69	76	51
6.10 ⁻⁵	73	50	95	61	89	42

Tableau 1 : Pourcentages d'ion métallique Al(III) fixé sur l'acide chlorogénique (UV-visible) et sur l'acide humique (fluorescence). Les abréviations sont représentatives de l'ordre dans lequel les réactifs ont été introduits. $T_{AH} = 10\text{mg/L}$, $C_{AC} = 6.10^{-5}\text{M}$, C_{Al} variable, $\text{pH} = 6$, force ionique = 0,1 M.

Il faut noter que la somme des pourcentages %_{Al(AC)} et %_{Al(AH)} est souvent supérieure à 100%. En effet, la teneur en cation métallique libre n'étant pas connue, il est possible que cette quantité libre présente dans la complexation d'un des deux acides soit engagée dans la complexation de l'autre composé organique.

Les concentrations calculées à l'aide des données UV-visible (%_{Al(AC)}) montrent que la quantité d'Al(III) est toujours supérieure quand l'acide humique est ajouté en dernier et qu'elle est minimum lorsque l'acide chlorogénique est additionné au final. On retrouve le classement cité précédemment selon %_{Al(AC)} (« AC Al AH > AH AC Al > AH Al AC »).

En revanche, les données relatives à la fluorescence (%_{Al(AH)}) révèlent que le maximum d'Al(III) fixé à l'acide humique est obtenu lorsque l'acide chlorogénique est ajouté en dernier et le minimum quand l'acide humique est additionné au final. On retrouve également l'ordre selon %_{Al(AH)} trouvé ci-dessus (« AH Al AC > AH AC Al > AC Al AH »).

Quelle que soit la concentration ajoutée d'ions métalliques, on constate que le pourcentage d'acide chlorogénique intervenant dans la complexation est inférieur à celui d'acide humique complexé pour l'expérience AH AC Al. L'acide humique semble donc posséder une capacité à fixer Al(III) plus grande que AC. Ceci est confirmé par le fait que dans le sens AH Al AC, les teneurs en AC complexé sont très faibles par rapport à ceux d'AH lié à Al(III).

Ces expériences révèlent donc que l'acide humique possède un pouvoir plus grand que l'acide chlorogénique vis-à-vis d'Al(III).

2) Complexation du plomb (II)

Les spectres UV-visible et de fluorescence obtenus lors de la compétition entre l'acide humique, l'acide chlorogénique vis-à-vis de Pb(II) ont été réalisés dans les mêmes conditions que la compétition avec Al(III). Les expériences ont été conduites à des teneurs fixes en acide humique et chlorogénique (10 mg/L et 6.10^{-5} mol/L) et variables en Pb(II) (de $1,5.10^{-5}$ à 6.10^{-5} mol/L). Les spectres obtenus avec une concentration en Pb(II) de 6.10^{-5} mol/L sont illustrés Figure 6 et Figure 7.

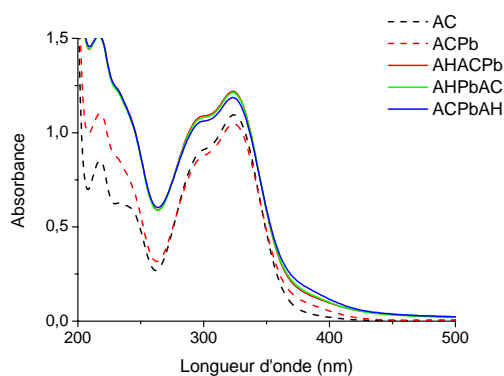


Figure 6 : Spectres UV-visible du mélange acide humique 10 mg/L , acide chlorogénique 6.10^{-5} M et Pb(II) 6.10^{-5} M à $\text{pH} = 6$ (force ionique = $0,1 \text{ M}$).

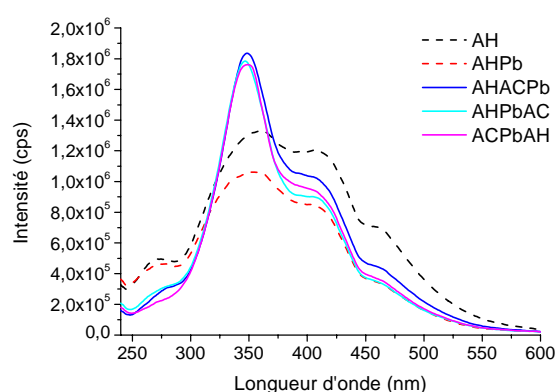
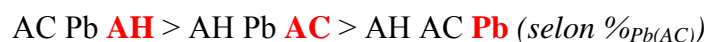


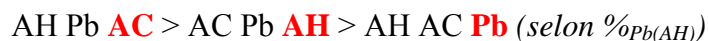
Figure 7 : Spectres de fluorescence synchrone (offset 70 nm) du mélange acide humique 10 mg/L , acide chlorogénique 6.10^{-5} M et Pb(II) 6.10^{-5} M à $\text{pH} = 6$ (force ionique = $0,1 \text{ M}$).

Les spectres UV-visible de l'acide chlorogénique, du mélange d'acide chlorogénique-Pb(II) à un rapport R=1, et des trois mélanges acide humique-acide chlorogénique-Pb(II) sont représentés sur la Figure 6. La bande caractéristique de la chélation se situe aux environs de 382 nm pour le système AC-Pb(II). Toutefois les modifications apportées au spectre de AC par la fixation de Pb(II) sont beaucoup plus faibles dans ce cas-ci. Les expériences réalisées montrent une absorbance des mélanges proche voire égale à celle de la complexation de AC seule avec Pb(II) aux mêmes concentrations. L'ordre des trois expériences selon la valeur de $\%_{Pb(AC)}$ est ici :



Parallèlement au cas de la complexation avec Al(III), ici aussi les capacités complexantes de AC et AH semblent également comparables pour la complexation de Pb(II).

Les spectres de fluorescence synchrone (Figure 7) illustrent tout comme les spectres UV-visible, une forte complexation de Pb(II) dans les trois cas étudiés (l'intensité du quenching résultant de la fixation du plomb (II) est proche de celle observée dans le système AH-Pb(II)). Le classement issu des trois manipulations selon la quantité d'acide humique complexé ($\%_{Pb(AH)}$) est ici :



En l'absence d'interactions spécifiques, le classement présent serait l'opposé de celui observé grâce aux données concernant AC (« AH AC Pb > AH Pb AC > AC Pb AH »). Effectivement, dans la situation où AC complexe un maximum de plomb (II), AH devrait en complexer un minimum. La fluorescence montre ici un comportement particulier car au lieu que l'expérience où le plomb (II) est ajouté en dernier donne une concentration $C_{Pb(AH)}$ maximum, celle-ci révèle le moins d'acide humique complexé des trois manipulations. Cette expérience est aussi celle qui à la fois possède les plus faibles quantités d'acide humique et chlorogénique impliqués dans la complexation.

Ce comportement atypique avec Pb(II) démontre une forte interaction entre les deux acides pour la complexation de Pb(II) étant donné qu'il n'y a pas de telle singularité dans la chélation de Al(III). Dans ce contexte, on peut supposer que l'acide chlorogénique gêne ou bloque des sites de fixation de Pb(II) au sein de la structure d'acide humique expliquant une baisse des quantités complexées pour les deux acides (et surtout pour AH). Ce fait particulier

montre également que même si les complexations de Al(III) et Pb(II) sont comparables, elles ne se produisent pas sur les mêmes sites de l'acide humique.

Le Tableau 2 présente les valeurs de %_{Pb(AC)} et %_{Pb(AH)} obtenues à partir des données spectrales UV-visible et de fluorescence des mélanges AH-AC-Pb(II) à différentes rapports.

[Pb(II)] (mol/L)	% _{Pb(AC)} (UV-visible)			% _{Pb(AH)} (fluorescence)		
	AH AC Pb	AH Pb AC	AC Pb AH	AH AC Pb	AH Pb AC	AC Pb AH
1,5.10 ⁻⁵	65	76	84	56	≈ 100	74
3.10 ⁻⁵	53	65	≈ 100	61	≈ 100	79
4,5.10 ⁻⁵	55	68	98	72	96	84
6.10 ⁻⁵	50	67	≈ 100	77	83	89

Tableau 2 : Pourcentages d'ion métallique Pb(II) fixé sur l'acide chlorogénique (UV-visible) et sur l'acide humique (fluorescence). Les abréviations sont représentatives de l'ordre dans lequel les réactifs ont été introduits. T_{AH} = 10mg/L, C_{AC} = 6.10⁻⁵ M, C_{Pb} variable, pH = 6, force ionique = 0,1 M.

Globalement, les quantités %_{Pb(AC)} (données UV-visible) sont toujours supérieures quand l'acide humique est ajouté en dernier et minimum lorsque Pb(II) est apporté en final. %_{Pb(AC)} est toujours très élevé (≈ 100%) et démontre une grande capacité de chélation de AC vis-à-vis de Pb(II). Le classement selon la valeur de %_{Pb(AC)} est conservé quelles que soient les concentrations en ions métallique (« AC Pb **AH** > AH Pb **AC** > AH AC **Pb** »).

Quant aux renseignements fournis par la fluorescence, %_{Pb(AH)} est toujours maximum lorsque l'acide chlorogénique est ajouté en dernier et minimum quand Pb (II) intervient en dernier. On retrouve également l'ordre selon %_{Pb(AH)} trouvé ci-dessus dans le cas d'une teneur en Pb(II) de 6.10⁻⁵M (« AH Pb **AC** > AC Pb **AH** > AH AC **Pb** »).

Si l'on compare les expériences pour toutes les concentrations de Pb(II), on remarque que les pourcentages d'acide humique et chlorogénique impliqués dans la complexation (%_{Pb(AH)} et %_{Pb(AC)}) sont proches pour le mélange AH AC Pb (50-60%). Les deux acides ont des forces comparables vis-à-vis de la fixation de Pb(II).

3) Complexation du zinc (II)

Lors de la compétition entre les deux composés organiques AH et AC, nous n'avons observé aucun effet de compétition : l'acide chlorogénique ne semble pas être capable de fixer le zinc (II) en solution en présence d'acide humique. Les spectres UV-visible des trois mélanges d'acides humique, chlorogénique et de Zn(II) sont identiques (Figure 8) et correspondent à la somme des contributions de AH et AC seuls. Si Zn(II) n'est pas complexé par l'acide chlorogénique en présence d'acide humique, il se fixe plus facilement à AH en mélange avec AC comme le montre les spectres de fluorescence Figure 9.

Toutefois, en fluorescence si les spectres des mélanges AH Zn AC et AC Zn AC révèlent que seul AH complexe le zinc (II) (l'intensité des bandes des fluorophores concernés par la complexation étant la même que celle du mélange d'acide humique-Zn(II) dans les mêmes conditions), celui du mélange AH AC Zn a une intensité plus faible, intermédiaire entre celle du spectre de AH et celui du mélange AH+Zn aux mêmes concentrations. Comme dans le cas de la compétition entre AH, AC et Pb(II), l'acide chlorogénique gêne, dans de moindres proportions la fixation de Zn(II) sur AH en mobilisant les sites potentiels de complexations des cations métalliques du zinc (II).

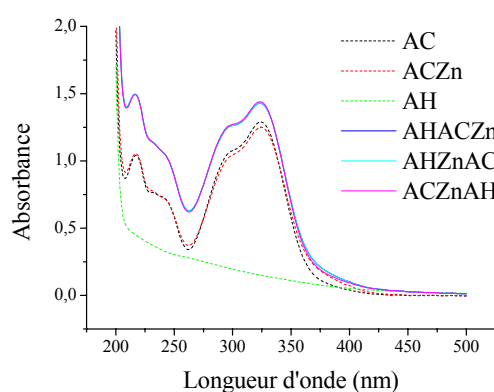


Figure 8 : Spectres UV-visible du mélange acide humique 10mg/L, acide chlorogénique $6.10^{-5}M$ et Zn(II) $6.10^{-5}M$ à pH=6 (force ionique=0.1M).

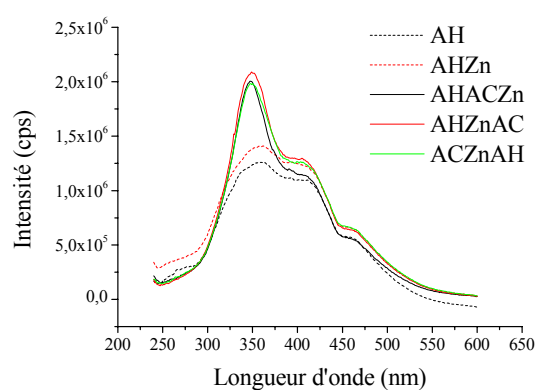


Figure 9 : Spectres de fluorescence synchrone (offset 70 nm) du mélange acide humique 10mg/L, acide chlorogénique $6.10^{-5}M$ et Zn(II) $6.10^{-5}M$ à pH=6 (force ionique=0.1M).

IV. Compétition entre l'acide humique et l'acide gallique

1) Complexation de l'aluminium (III)

L'étude de la complexation d'Al(III) par l'acide gallique (chapitre V) a montré la grande capacité de fixation de ce dernier. La mise en évidence de complexes de trois stoechiométries différentes (1:3, 1:1 et 2:1) avait permis alors de conclure que cet acide possédait un pouvoir de complexation plus grand que l'acide chlorogénique.

Dans le cadre de la compétition entre l'acide humique, l'acide gallique et Al(III), les spectres UV-visible et de fluorescence ont été obtenus dans les mêmes conditions expérimentales que la compétition entre l'acide humique, l'acide chlorogénique et Al(III) ($T_{AH} = 10 \text{ mg/L}$ et $C_{AG} = 6.10^{-5} \text{ M}$ et $C_{Al} = 1,5.10^{-5}$ à 6.10^{-5} M). Les spectres obtenus avec une concentration en Al(III) de 6.10^{-5} M sont présentés Figure 6 et Figure 7.

Les spectres UV-visible de l'acide gallique, du mélange acide gallique-Al(III) pour un rapport $R = 1$, et des trois mélanges acide humique-acide gallique-Al(III) sont reproduits sur la Figure 10. La chélation de l'aluminium (III) par l'acide gallique se caractérise par deux bandes à 288 et 351 nm.

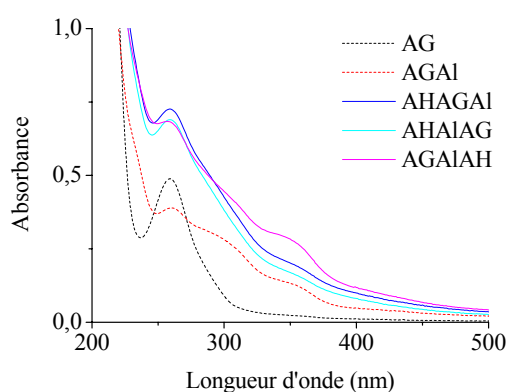


Figure 10 : Spectres UV-visible du mélange acide humique 10mg/L, acide gallique 6.10^{-5} M et Al(III) 6.10^{-5} M à pH=6 (force ionique=0.1M).

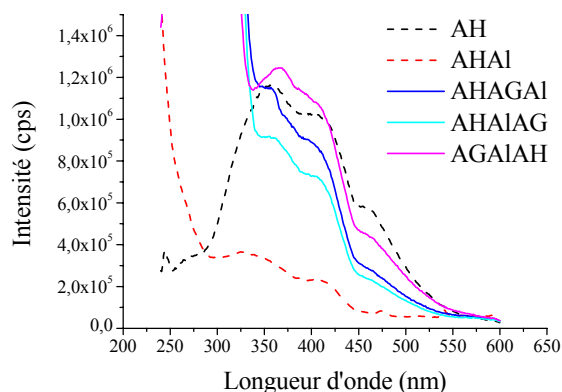


Figure 11 : Spectres de fluorescence synchrone (offset 70 nm) du mélange acide humique 10mg/L, acide gallique 6.10^{-5} M et Al(III) 6.10^{-5} M à pH=6 (force ionique=0.1M).

La présence d'acide humique (visible sur les spectres UV-visible sous la forme d'un fond plus important dans les courtes longueurs d'onde) perturbe l'observation de la variation d'intensité de la bande caractéristique de l'acide gallique libre (259 nm). En se basant sur la variation d'absorbance à 288 nm (qui est linéaire à la quantité de solution métallique ajoutée), on trouve l'ordre suivant pour les trois expériences selon la valeur de $\%_{\text{Al(AG)}}$:

$$\text{AG Al AH} > \text{AH AG Al} > \text{AH Al AG} \text{ (selon } \%_{\text{Al(AG)}}\text{)}$$

L'intensité importante des mélanges à 288 nm illustre la facilité qu'a AG de capter les ions Al(III). L'acide gallique conserve donc en grande partie son potentiel complexant pour Al(III) en présence de l'acide humique.

En fluorescence, les différences au niveau spectral entre les trois manipulations sont très nettes (Figure 11). Le quenching résultant de la complexation entre AH et Al(III) est le plus important dans le cas où l'acide gallique est ajouté en dernier (manipulation AH Al AG), et minimum dans le cas où l'acide humique est apporté en troisième (expérience AG Al AH). Le classement des trois manipulations selon la quantité d'Al(III) complexé par l'acide humique ($\%_{\text{Al(AH)}}$) est ici :

$$\text{AH Al AG} > \text{AH AG Al} > \text{AG Al AH} \text{ (selon } \%_{\text{Al(AH)}}\text{)}$$

Les valeurs de $\%_{\text{Al(AG)}}$ et $\%_{\text{Al(AH)}}$ obtenues à partir des données spectrales UV-visible et fluorescence des mélanges AH-AG-Al(III) à différents rapports de concentrations entre les espèces sont présentées Tableau 3.

Les pourcentages calculés à l'aide des données UV-visible ($\%_{\text{Al(AG)}}$) ou de fluorescence ($\%_{\text{Al(AH)}}$) montrent les mêmes tendances quelle que soit la concentration d'Al(III) ajoutée.

La quantité d'Al(III) fixé à l'acide gallique est toujours supérieure quand l'acide humique est ajouté en dernier et elle est minimale lorsque l'acide gallique est additionné au final. Le classement selon $\%_{\text{Al(AG)}}$ des trois sens d'expériences trouvé à partir des manipulations réalisées avec 6.10^{-5} M d'Al(III) est conservé pour toutes les concentrations d'ion métallique (AG Al AH > AH AG Al > AH Al AG).

[Al(III)] (mol/L)	% _{Al(AG)} (UV-visible)			% _{Al(AH)} (fluorescence)		
	AH AG Al	AH Al AG	AG Al AH	AH AG Al	AH Al AG	AG Al AH
1,5.10 ⁻⁵	75	38	69	46	99	52
3.10 ⁻⁵	63	44	73	55	92	46
4,5.10 ⁻⁵	71	68	78	65	72	37
6.10 ⁻⁵	87	74	≈ 100	76	71	35

Tableau 3 : Pourcentages d'ion métallique Al(III) fixé sur l'acide chlorogénique (UV-visible) et sur l'acide humique (fluorescence). Les abréviations sont représentatives de l'ordre dans lequel les réactifs ont été introduits. $T_{AH} = 10 \text{ mg/L}$, $C_{AG} = 6.10^{-5} \text{ M}$, C_{Al} variable, $pH = 6$, force ionique = 0,1 M.

En fluorescence, %_{Al(AH)} est maximum quand l'acide gallique est ajouté en dernier et minimum quand c'est AH qui l'est. L'ordre des expériences selon la quantité d'acide humique complexé (%_{Al(AH)}) est toujours : AH Al AG > AH AG Al > AG Al AH.

L'expérience dans le sens AH AG Al montre que les pourcentages d'Al(III) complexés par l'acide gallique sont plus élevés que ceux complexés par l'acide humique pour toutes les concentrations d'Al(III) ajoutées. Al(III) se fixe donc préférentiellement sur l'acide gallique. Ceci est confirmé au vu des pourcentages d'Al(III) complexé par AG plus grands que ceux complexés par AH dans le sens AG Al AH.

L'acide gallique montre donc un pouvoir plus grand que l'acide humique pour fixer Al(III). Dans le premier paragraphe concernant l'acide chlorogénique, nous avons montré que c'était l'acide humique, dans cette configuration qui fixait plus facilement Al(III) par rapport à AC. On peut ainsi classer les trois molécules organiques selon leur pouvoir de fixer des ions Al(III) : **AG > AH > AC**. Cet ordre est cohérent avec les études effectuées précédemment (chapitre V) sur les molécules isolées de AC ou AG où l'acide gallique avait montré une capacité plus grande que AC pour piéger Al(III).

2) Complexation du plomb (II)

La complexation de Pb(II) par les acides humique et gallique (chapitres V et VI) a montré que AH et AG fixent le plomb (II) avec plus de difficultés que l'aluminium (III). Les

données Raman recueillies pour AG montre que le plomb (II) et l'aluminium (III) se fixent sur des sites différents.

Les spectres UV-visible et de fluorescence de la compétition entre l'acide humique, l'acide gallique et Pb(II) pour des teneurs de $T_{AH} = 10 \text{ mg/L}$, $C_{AG} = 6.10^{-5} \text{ M}$ et $C_{Pb} = 6.10^{-5} \text{ M}$ sont présentés Figure 12 et Figure 13.

La caractérisation de la chélation de Pb(II) par l'acide gallique n'est pas aisée à évaluer par spectroscopie UV-visible. En effet, cette complexation est corrélée avec l'augmentation d'un fond sur le spectre UV-visible dû à la précipitation du complexe formé entre AG et Pb(II). Cependant, une relation linéaire existe entre l'absorbance à 253 ou 350 nm et la teneur en ion métallique.

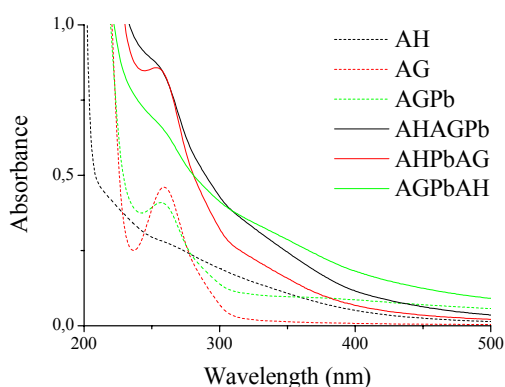


Figure 12 : Spectres UV-visible du mélange acide humique 10 mg/L, acide gallique 6.10^{-5} M et Pb(II) 6.10^{-5} M à $\text{pH} = 6$ (force ionique = 0,1 M).

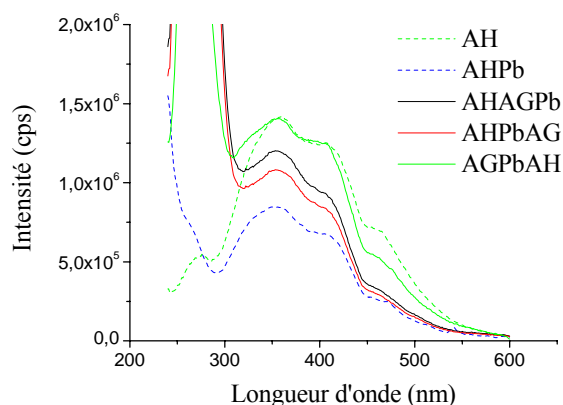
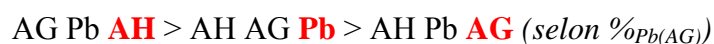
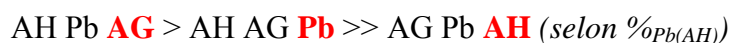


Figure 13 : Spectres de fluorescence synchrone (offset 70 nm) du mélange acide humique 10 mg/L, acide gallique 6.10^{-5} M et Pb(II) 6.10^{-5} M à $\text{pH} = 6$ (force ionique = 0,1 M).

Les absorbances des trois expériences de mise en compétition dans le système AH AG Pb révèlent que la configuration où l'acide humique est additionné en dernier montre le plus faible taux de métal complexé par l'acide gallique, et celle pour laquelle AG est ajouté au final présente la plus faible quantité d'Al(III) complexé par AG, soit dans l'ordre décroissant de $\%_{Pb(AG)}$:



Les spectres de fluorescence (Figure 13) témoignent d'une différence moins importante dans la quantité de métal complexé par AH entre chaque type d'expérience. L'ordre des 3 compétitions selon $\%_{\text{Pb(AH)}}$ est ici :



La quantité de Pb(II) complexé par AH n'atteint jamais 100% (contrairement à AG) et les taux calculés pour les expériences dans lesquelles on ajoute en dernier l'acide gallique ou le plomb (II) sont proches de ceux déterminés pour la troisième expérience (où l'acide humique est amené en dernier). Cette dernière montre moitié moins de Pb(II) complexé par AH.

Les données numériques ($\%_{\text{Pb(AG)}}$ et $\%_{\text{Pb(AH)}}$) pour les autres rapports acide/Pb(II) sont rassemblées dans le Tableau 4.

De manière identique aux observations réalisées dans le cas de la compétition avec Al(III), les classements des trois types d'expériences selon $C_{\text{Pb(AG)}}$ et $C_{\text{Pb(AH)}}$ pour le système AH-AG-Pb sont les mêmes quelque soit la teneur en Pb(II).

Au vu des valeurs de $\%_{\text{Pb(AG)}}$ calculés à partir des spectres UV-visible, la quantité de Pb(II) fixé à l'acide gallique est toujours supérieure quand l'acide humique est ajouté en dernier et elle est minimum lorsque l'acide gallique est additionné au final. Cet ordre selon $\%_{\text{Pb(AG)}}$ des trois expériences ($\text{AG Pb AH} > \text{AH AG Pb} > \text{AH Pb AG}$) est le même que celui trouvé précédemment.

Chaque expérience indique un taux de molécule d'acide gallique très différent entre les trois types de compétition ; celle où $\%_{\text{Pb(AG)}}$ est maximum atteint quasiment 100% d'AG complexé.

[Pb(II)] (mol/L)	%Pb _(AG) (UV-visible)			%Pb _(AH) (fluorescence)		
	AH AG Pb	AH Pb AG	AG Pb AH	AH AG Pb	AH Pb AG	AG Pb AH
1,5.10 ⁻⁵	79	65	93	79	91	60
3.10 ⁻⁵	86	35	89	78	89	51
4,5.10 ⁻⁵	83	39	94	76	91	64
6.10 ⁻⁵	85	30	≈ 100	78	93	42

Tableau 4 : Pourcentages d'ion métallique Pb(II) fixé sur l'acide chlorogénique (UV-visible) et sur l'acide humique (fluorescence). Les abréviations sont représentatives de l'ordre dans lequel les réactifs ont été introduits. $T_{AH} = 10 \text{ mg/L}$, $C_{AG} = 6.10^{-5} \text{ M}$, C_{Pb} variable, $pH = 6$, force ionique = 0,1 M.

A l'opposé, les données trouvées à partir des spectres de fluorescence révèlent que %Pb_(AH) est maximum quand l'acide gallique est ajouté en dernier et minimum lorsque AH est apporté à une solution d'acide gallique complexé (AH Pb AG > AH AG Pb > AG Pb AH).

Ces deux classements des trois compétitions montrent que les deux composés organiques ont des pouvoirs chélatants proches pour Pb(II) ; en effet l'acide gallique et l'acide humique sont capables de retirer une certaine quantité d'ion métallique l'un à l'autre mais pas en de très grandes proportions.

On note que pour les expériences AG Pb AH et AH AG Pb et quelque soit la concentration ajoutée de Pb(II), la quantité de métal complexé par AG est supérieure à celle complexée par AH ; et notamment pour le sens AH AG Pb, ce qui prouve que Pb(II) se fixe préférentiellement sur l'acide gallique.

Dans le cas de la complexation du Pb(II), AG montre ainsi une capacité plus importante que AH (AG > AH), en revanche dans le paragraphe précédent les acides chlorogénique et humique avaient montré des capacités envers Pb(II) proches (AH ≈ AC). Individuellement, bien que les acides chlorogénique et gallique forment tous deux des complexes de stoechiométries 1:1, la constante de formation du complexe de l'acide gallique est plus grande que celle avec AC (AG > AC). On peut alors réaliser un classement des trois molécules organiques selon leur pouvoir complexant vis-à-vis de Pb(II) : **AG > AH ≈ AC**.

V. Conclusion

Il faut noter en tout premier lieu que les états d'équilibre obtenus pour des mélanges acide humique + petite molécule organique + cation métallique ne sont pas identiques suivant l'ordre dans lequel les composés sont introduits. Ceci indique une chimie très complexe qui ne peut pas être résumée par un ensemble d'équilibre simple. Dans un modèle plus complet, il faudrait faire intervenir :

- des interactions acide humique-molécules qui peuvent modifier à la fois les pKa et l'agencement géométrique des fonctions complexantes,
- les effets stériques dû aux modifications (pH, complexation) à l'intérieur de la macromolécule.

Dans le cadre des systèmes étudiés dans ce chapitre, les expériences menées conjointement en spectroscopie UV-visible et en fluorescence ont permis dans le cadre de l'étude de la compétition entre deux molécules organiques pour la complexation d'ions métalliques de déterminer les fractions complexées de chaque composé (Tableau 5).

	% _{Me(L)} (UV)			% _{Me(AH)} (fluorescence)		
	AH L Me	AH Me L	L Me AH	AH L Me	AH Me L	L Me AH
AC-Al(III)	95	50	73	61	89	42
AC-Pb(II)	50	67	≈ 100	77	83	89
AG-Al(III)	87	74	≈ 100	76	71	35
AG-Pb(II)	85	30	≈ 100	78	93	42

Tableau 5 : Pourcentages d'ions métalliques Al(III) ou Pb(II) noté Me fixés sur l'acide chlorogénique ou l'acide gallique (L) et sur l'acide humique. Les abréviations sont représentatives de l'ordre dans lequel les réactifs ont été introduits. $T_{AH} = 10 \text{ mg/L}$, $C_L = 6.10^{-5} \text{ M}$, $C_{Me} = 6.10^{-5} \text{ M}$, $pH=6$, force ionique = 0.1 M.

Ainsi nous avons montré que l'acide chlorogénique complexe de manière préférentielle Pb(II) par rapport à l'acide humique tandis que la macromolécule complexe plus facilement Al(III) et Zn(II). Le cas de la complexation de Zn(II) au sein du système AH-AC révèle que l'acide chlorogénique a un pouvoir complexant nettement inférieur à celui de

AH (il n'entre pas en compétition en sa présence). Mais en ce qui concerne la complexation de Al(III) et Pb(II), des interactions ont lieu entre AH et AC. Dans le système AH-AC-Al(III), AC empêche la complexation Al(III) par AH en « bloquant » des sites potentiels de fixation de AH ($\%_{Me(L)} > \%_{Me(AH)}$ pour l'expérience dans le sens AH Al AC). Ce même fait peut être évoqué dans le cas de la fixation de Pb(II) mais la gêne occasionnée pour la complexation de AH est beaucoup plus grande (inversement des classements attendus selon $\%_{Pb(AC)}$ et $\%_{Pb(AH)}$; dans les deux cas : AC Pb AH > AH AC Pb > AH Pb AC).

Ceci montre bien que la complexation entre AH et Pb(II) est plus spécifique qu'entre AH et Al(III) ou que le nombre de site mis en jeu (qui sont différents pour les deux ions métalliques cf. chapitre VI et VII) est plus important dans le cas de Al(III).

La complexation de l'acide gallique quant à elle met en évidence que AG chélate plus facilement que AH les cations Al(III) et Pb(II) (sans interactions spécifiques) mais que de la même manière que pour AC, la complexation de Zn(II) se fait exclusivement au niveau de AH.

Si nous élargissons ces résultats aux systèmes naturels possédant des macromolécules d'acide humique (sol, sédiment, etc...), le Tableau 5 met en évidence que la disponibilité potentielle des ions métalliques dépend à la fois de la molécule organique associée à l'acide humique et du métal. Dans le cas d'Al(III) (AG > AH > AC), l'acide humique va mobiliser une plus grande quantité d'ion métallique en présence de AC que de AG. Par contre dans le cas de Pb(II) (AG > AH ° AC), le système métallo-humique est davantage perturbé étant donné que les quantités de cations métalliques fixés aux molécules organiques sont toujours plus élevées que dans le cas de la complexation d'Al(III). Les phénomènes de transfert du plomb (II) seront donc plus importants que ceux pour l'aluminium (III). Quant à la disponibilité du zinc (II), elle reste dominée par sa fixation avec les macromolécules d'acide humique.

VI. Bibliographie

1. Adriano, D. C. (1986) *Trace Elements in the Terrestrial Environment*.
2. Alloway, B. J. (1995) *Heavy Metals in Soils, Second Edition* (Blackie Academic & Professional).
3. Bradl, H. B. (2004) *Journal of Colloid and Interface Science* **277**, 1-18.
4. Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (1989) *Trace Elements in Soils and Plants*.
5. Kononova, M. M. (1966) *Soil Organic Matter: Its Nature, Its Role in Soil Formation and in Soil Fertility. 2nd ed.*
6. MacCarthy, P. (2001) *Soil Science* **166**, 738-751.
7. Schnitzer, M. (1978) *Developments in Soil Science* **8**, 1-64.
8. Stengel, P., Gelin, S., & Editors (1998) *Soil: Fragile Interface*.
9. Stevenson, F. J. (1982) *Humus Chemistry* (Wiley, New York).
10. Dycus, P. J. M., Healy, K. D., Stearman, G. K., & Wells, M. J. M. (1995) *Separation Science and Technology* **30**, 1435-1453.
11. Gueguen, C., Koukal, B., Dominik, J., & Pardos, M. (2003) *Chemosphere* **53**, 927-934.
12. Martinez, G. A., Traina, S. J., & Logan, T. J. (1998) *Journal of Colloid and Interface Science* **204**, 33-44.
13. Karthikeyan, K. G. & Chorover, J. (2002) *Chemosphere* **48**, 955-964.
14. Kalis, E. J. J., Temminghoff, E. J. M., Weng, L., & van Riemsdijk, W. H. (2006) *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 702-711.
15. Lo, K. S. L., Yang, W. F., & Lin, Y. C. (1992) *Toxicological and Environmental Chemistry* **34**, 139-153.
16. Mackenzie, K., Georgi, A., Kumke, M., & Kopinke, F.-D. (2002) *Environmental Science and Technology* **36**, 4403-4409.
17. Larrivee, E. M., Elkins, K. M., Andrews, S. E., & Nelson, D. J. (2003) *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**, 32-45.

Conclusion générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans la thématique "Environnement " du LASIR et plus précisément dans l'axe de recherche « modèles chimiques du transfert et de la rétention de métaux polluants ». Pour appréhender les phénomènes régissant le piégeage de polluants par les substances humiques, nous avons choisi d'aborder le problème par l'étude de molécules modèles qui présentent des fonctions complexantes caractéristiques, avant d'entreprendre une étude de la complexation par un acide humique standard.

Ce travail ayant pour but de contribuer à la compréhension des interactions métallo-humiques, a été dirigé selon plusieurs directions :

(i) une partie consacrée à l'étude de modèles de la matière organique qui a consisté à : déterminer les différents complexes formés entre des composés mono-sites (3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 3',4'-dihydroxyflavone), multi-sites (quercétine, acides chlorogénique et gallique) et les cations métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II) ; établir un classement des sites de complexations présents et appréhender les effets de compétition de sites au sein d'une même structure ;

(ii) une étude approfondie d'un acide humique standard (AH) ainsi que sa complexation par un ion métallique polluant (Al(III), Pb(II) ou Zn(II)) pour visualiser les effets de la complexation de ces ions par un AH et classer les différents polluants selon leur capacité à se fixer sur la macromolécule ;

(iii) la réalisation de compétitions :

- entre ions métalliques pour la complexation avec un AH afin de vérifier le classement précédent des trois polluants,
- entre acide humique et composé organique de faible poids moléculaire pour simuler le milieu naturel où coexistent des molécules de tailles variées, et apprécier le rôle de chacun d'eux dans la fixation des espèces métalliques.

Les objectifs du premier point ont été atteints grâce à l'association de techniques spectroscopiques et de calculs de chimie quantique. L'étude de la complexation des flavonoïdes mono-sites a permis de mettre en évidence de nombreux résultats :

- les stoechiométries et les constantes de stabilité ont été trouvées pour la chélation des trois hydroxyflavones avec les trois ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II), dans deux milieux différents (MeOH et MeOH-H₂O à pH=6) ;
- la complexation de l'ion métallique s'accompagne de la déprotonation des fonctions hydroxyles du ligand, et par conséquent une augmentation de pH facilite cette déprotonation et conduit à des complexes de stoechiométrie plus élevée expliquant que quel que soit le ligand, la stoechiométrie du complexe formé dans le méthanol pur est inférieure à celle obtenue dans le mélange eau/méthanol à pH = 6.
- de plus, pour une quantité donnée d'ions métalliques ajoutée, le pourcentage de ligand libre est toujours supérieur dans le solvant mixte que dans le méthanol pur. La complexation d'un cation métallique est donc plus importante dans le méthanol que dans le solvant mixte à pH = 6 malgré des stoechiométries supérieures.

Toutes ces données ont permis de réaliser la classification des trois sites de chélation (α -hydroxy-carbonyle, β -hydroxy-carbonyle et catéchol) selon leur capacité de complexation, pour chacun des ions métalliques, dans un milieu donné.

La complexation des métaux par la quercétine (présentant les trois sites précédents en compétition) a montré que le premier site impliqué dans la fixation du métal est toujours celui qui possède la plus grande capacité lorsqu'il est étudié individuellement. Ce comportement est encourageant pour extrapoler des raisonnements faits à partir de molécules simples à des composés plus complexes.

A pH = 6, nous connaissons ainsi le classement des cations métalliques selon leur capacité à être complexé par les sites étudiés :

- α -hydroxy-carbonyle : Al(III) > Pb(II) \geq Zn(II)
- β -hydroxy-carbonyle : Al(III) > Zn(II) > Pb(II)
- catéchol : Zn(II) > Al(III) > Pb(II)

L'étude des acides chlorogénique et gallique, molécules possédant chacune les sites de complexation acide carboxylique et catéchol, a permis de mettre en évidence que malgré les différences structurales, Al(III), Pb(II) ou Zn(II) se fixe toujours sur le même type de site : la complexation de Al(III) se produit au niveau des sites catéchols (et présente les taux de ligand

complexés les plus élevés) et celle de Pb(II) et Zn(II) sur les fonctions acides des deux composés.

La confrontation de l'ensemble des résultats obtenus à partir des molécules modèles permet de classer le pouvoir de complexation des différents sites étudiés vis-à-vis d'un cation métallique donné:

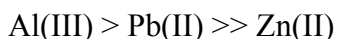
Al(III): α -hydroxy-carbonyle > catéchol > β -hydroxy-carbonyle et carboxylate

Pb(II): carboxylate > catéchol > α -hydroxy-carbonyle > β -hydroxy-carbonyle

Zn(II): carboxylate > catéchol > β -hydroxy-carbonyle > α -hydroxy-carbonyle

L'étude par fluorescence synchrone d'un acide humique standard a permis de mettre en évidence différents types de bandes d'émission présentant de fortes dépendances au pH et pouvant être attribuées à des fluorophores particuliers. La compétition entre deux ions métalliques dans le processus de complexation a permis de montrer que les effets de diminution et d'exaltation de l'intensité du spectre de AH sont les conséquences de mécanismes très différents et que les constantes de complexation (constantes de Stern Volmer) ne peuvent être comparées si leurs signes arithmétiques sont différents, contrairement à ce qui peut être reporté dans la littérature. La différence des effets produits par l'ajout des cations métalliques sur le spectre de AH reflète des comportements différents, indiquant des mécanismes de fixation distincts et une spécificité des interactions métallo-humiques. L'aluminium (III) est apparu comme ayant très peu de spécificité vis-à-vis des sites de AH contrairement à Pb(II) et Zn(II) beaucoup plus sélectifs. Nous avons pu recueillir de cette façon le classement des trois ions métalliques en fonction des zones de fluorescence du spectre de l'acide humique :

- zone 1 : en dessous de 300 nm (zone d'interférences entre Al(III) et Zn(II))
Al(III) > Zn(II) > Pb(II)
- zone 2 : entre 300 et 335 nm (caractéristique des fluorophores polyphénoliques)
Zn(II) > Al(III) > Pb(II)
- zone 3 : entre 335 et 380 nm (caractéristique des fluorophores acides carboxyliques)
Zn(II) > Al(III) > Pb(II)
- zone 4 : au dessus de 380 nm (fluorophores de types hydroxyyles)



Un parallèle entre les études de complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) menées sur les molécules modèles et sur l'acide humique permet de faire les observations suivantes:

- Al(III) se complexe très facilement quel que soit le site et d'une manière générale, c'est l'ion le plus complexé parmi les trois cations métalliques étudiés. Il présente, cependant, une préférence plus marquée pour les fonctions hydroxyles et hydroxy-carbonyles que pour les fonctions carboxylates.

- Pb(II) et Zn(II) se fixent préférentiellement sur les fonctions carboxylates, même si Zn(II) a une affinité certaine pour la fonction catéchol.

D'une manière globale, Pb(II) est l'ion qui se complexe le plus difficilement sur les différents sites.

Zn(II) est le cation qui présente le plus de singularités: il change de site préférentiel en fonction du milieu d'étude; il provoque des effets différents de Al(III) et Pb(II) sur l'émission de fluorescence de l'acide humique. La grande sensibilité de Zn(II) à son environnement peut, éventuellement, expliquer des résultats contradictoires observés entre les modèles et l'acide humique. En effet, alors que Pb(II) est plus complexé par les fonctions carboxylates des acides gallique et chlorogénique que Zn(II), le phénomène opposé est observé avec l'acide humique, dans la zone 3, susceptible d'être représentative des fonctions acides.

Si on se focalise sur les fonctions polyphénoliques de l'acide humique qui présentent des bandes d'émission dans les zones 2 et 4 du spectre de fluorescence synchrone de ce composé, et en admettant un comportement identique de Zn(II) vis-à-vis des fonctions de l'acide humique et des flavonoïdes, il est possible d'émettre certaines hypothèses:

- Le classement des trois cations dans la zone 2 étant identique à celui obtenu pour la fonction catéchol, il serait envisageable de penser que cette zone soit caractéristique de telles fonctions.

- De la même manière, le même classement est observé pour la zone 4 et le site α -hydroxy-carbonyle; là encore, cette zone pourrait être caractéristique d'une émission de ce type de fluorophores.

Il est bien évident que de telles hypothèses mériteraient d'être vérifiées en considérant un plus grand nombre de molécules modèles et d'ions métalliques.

Le dernier objectif que nous nous étions fixé concernant le rôle de l'acide humique et des molécules de faible poids moléculaires dans la rétention des espèces métalliques a été réalisé au moyen d'expériences combinant spectroscopies UV-visible et de fluorescence pour obtenir respectivement des informations sur les « petites » molécules et l'acide humique. Nous avons pu établir les classements des trois molécules organiques (AH : acide humique, AC : acide chlorogénique et AG : acide gallique) pour la complexation des cations métalliques :

Al(III) : $AG > AH > AC$

Pb(II) : $AG > AC > AH$

Zn(II) : $AH > AC \gg AG$

Le plomb (II) apparaît ici comme l'ion le plus mobile étant donné sa préférence pour les molécules de faible taille et le zinc (II) comme le polluant le plus stable vis-à-vis de sa plus grande capacité de fixation par l'acide humique comparé aux deux plus petits acides. Cependant, les pourcentages d'espèces métalliques extraits de l'acide humique sont relativement faibles et celui-ci reste un véritable « réservoir toxique » au sein des milieux naturels.

L'ensemble de ce travail a permis de montrer l'utilité de l'étude de modèles pour une meilleure compréhension des processus de complexation des ions métalliques par les acides humiques, et notamment l'attribution des fonctions impliquées dans la fixation des polluants. Il a également mis en évidence la complexité des mécanismes engendrés par l'apport d'un ion métallique à un acide humique en solution, en montrant notamment qu'un simple suivi de réaction de complexation ne permet pas de comparer de manière immédiate l'affinité de différents métaux pour cette macromolécule. Des études complémentaires pourraient être envisagées afin de confirmer les sites mis en jeu dans la fixation des polluants ou de déterminer le mode d'interaction entre ion métallique et acide humique.

Titre :

Apport des spectroscopies moléculaires à l'étude des mécanismes de fixation d'ions métalliques polluants par les substances humiques. Complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) par des systèmes modèles.

Résumé :

Les substances humiques (SH) sont issues de la dégradation de résidus organiques et représentent la partie la plus importante de la matière organique des systèmes naturels. Les SH sont capables de piéger de nombreux polluants comme les métaux lourds et jouent donc un rôle majeur dans la rétention des ions métalliques. Leurs propriétés complexantes sont dues principalement à certaines fonctions récurrentes : les groupements carboxyliques et phénoliques.

Dans une 1^{ère} partie, l'étude de la complexation de molécules modèles possédant des sites similaires à ceux rencontrés dans les biopolymères naturels a permis d'évaluer les capacités complexantes des fonctions les plus répandues (catéchol, hydroxy-carbonyl et acide carboxylique). L'association de techniques spectroscopiques et de calculs de chimie quantique a permis d'établir un classement des pouvoirs chélatants des composés mono-sites vis-à-vis des ions métalliques Al(III), Pb(II) et Zn(II), et a montré que ce type de classement est conservé lorsque les sites sont en compétition au sein d'une même structure.

Dans une 2nde partie, l'examen par fluorescence synchrone de la complexation des 3 métaux polluants par un acide humique standard (AH) a mis en évidence des comportements différents pour chacun d'eux, reflétant des mécanismes de fixation distincts et une spécificité des interactions métallo-humiques. Nous avons ainsi pu établir un classement du pouvoir complexant de AH vis à vis des 3 cations, en accord avec celui obtenu pour les modèles. Enfin, la compétition entre AH et deux molécules organiques de faible poids moléculaires a montré que les pourcentages de polluants extraits de l'acide humique sont faibles et que celui-ci reste un véritable « réservoir toxique » au sein des milieux naturels.

Mots clés :	Acide humique	Spectroscopies Moléculaires	Plomb (II)
	Molécules Modèles	Calculs Quantiques	Zinc (II)
	Complexation	Aluminium (III)	

Title :

Contribution of the molecular spectroscopies to the study of the fixing mechanisms by three polluting metal ions with humic substances. Complexation of Al(III), Pb(II) and Zn(II) by model systems.

Abstract :

The humic substances (HS) result from the degradation of organic residues and represent the greatest part of the organic matter of the natural systems. The HS are able to trap many pollutants like heavy metals and play a major role in the metal ions retention. Their chelating properties are due mainly to some recurring functions: carboxylic and phenolic groups.

In a 1st part, the study of the complexation of model molecules involving similar sites to those met in the natural biopolymers makes it possible to know the chelating capacities of the most widespread functions (catechol, hydroxy-carbonyl and carboxylic acid). Spectroscopic techniques combined with quantum chemical calculations provides us the chelating capacities classification of the mono-site compounds toward the metallic ions Al(III), Pb(II) and Zn(II). We show whereas that this type of classification is preserved when the sites are in competition within the same structure.

In a 2nd part, the examination by synchronous fluorescence of the 3 polluting metals complexation by a standard humic acid (HA) made it possible to highlight different behaviors for each one of them, reflecting distinct fixing mechanisms and a specificity of the metal-humic interactions. We have established a classification of the chelating powers of HA towards the 3 cations in agreement with those obtained by the models. Lastly, the competition between HA and two organic molecules of low molecular size have shown that the percentages of pollutants extracted to the humic acid are weak and this one remains a "toxic reservoir" in the natural environments.

Key words :	Humic Acid	Molecular Spectroscopies	Lead (II)
	Models Molecules	Quantum Calculations	Zinc (II)
	Complexation	Aluminium (III)	
