



**HAL**  
open science

# Biogéochimie structurale du zinc et du plomb par spectroscopie EXAFS : interactions avec des acides humiques, des parois cellulaires de champignon, et des lichens

Géraldine Sarret

► **To cite this version:**

Géraldine Sarret. Biogéochimie structurale du zinc et du plomb par spectroscopie EXAFS : interactions avec des acides humiques, des parois cellulaires de champignon, et des lichens. Ingénierie de l'environnement. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 1998. Français. NNT : . tel-00801052

**HAL Id: tel-00801052**

**<https://theses.hal.science/tel-00801052>**

Submitted on 15 Mar 2013

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

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

OBSERVATOIRE DE GRENOBLE  
et  
LABORATOIRE DE GEOPHYSIQUE INTERNE ET TECTONOPHYSIQUE

# THESE

présentée par

**Géraldine Sarret**

pour obtenir le titre de

**Docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble I**

**Spécialité: Géophysique - Géochimie - Géomécanique**

**Biogéochimie structurale du zinc et du plomb par  
spectroscopie EXAFS:  
Interactions avec des acides humiques, des parois cellulaires de  
champignon, et des lichens**

Date de soutenance: 9 Janvier 1998

Composition du jury:

Jean Cases	Président	Directeur de recherches, CNRS, Nancy
Jacques Berthelin	Rapporteur	Directeur de recherches, CNRS, Nancy
Denis Raoux	Rapporteur	Directeur de recherches, CNRS, Grenoble
Bernard Besnainou	Examineur	Chef de service, CEA, Cadarache
Jean-François Legrand	Examineur	Professeur, Université J. Fourier, Grenoble
Alain Manceau	Examineur	Directeur de recherches, CNRS, Grenoble
Chantal Van Haluwyn	Examineur	Professeur, Université de Lille II

THESE DE DOCTORAT  
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

Titre de l'ouvrage:

**BIOGEOCHIMIE STRUCTURALE DU ZINC ET DU  
PLOMB PAR SPECTROSCOPIE EXAFS:  
INTERACTIONS AVEC DES ACIDES HUMIQUES, DES PAROIS  
CELLULAIRES DE CHAMPIGNON, ET DES LICHENS**

Auteur: **Géraldine SARRET**

Etablissement: **Observatoire de Grenoble  
Laboratoire de Géophysique Interne et  
Tectonophysique**

**RESUME**

Le risque écotoxicologique des métaux présents dans le milieu naturel dépend beaucoup plus de leur statut physico-chimique que de leur concentration totale. Afin de déterminer ce statut, nous avons étudié par spectroscopie EXAFS les interactions au niveau moléculaire du zinc et du plomb avec différents systèmes naturels organiques: des acides humiques (AH), constituants de la matière organique des sols; des parois cellulaires de champignons filamenteux, utilisés comme biosorbants pour le traitement d'eaux chargées en métaux; et des lichens, utilisés comme bioindicateurs de pollution.

- Pour les deux métaux étudiés, les AH possèdent une distribution de sites d'affinités différentes. Les ligands majoritaires sont des groupements carboxyles monodentates et des molécules d'eau, la proportion de molécules d'eau augmentant quand l'affinité du site diminue. Pour le zinc, les sites de plus faible affinité forment des complexes de sphère externe, où le métal est solvate par 6 molécules d'eau, et lié aux groupements fonctionnels des AH par des liaisons faibles.

- Les parois cellulaires du champignon *Penicillium chrysogenum* possèdent deux sites de complexation pour Zn et Pb: environ 90% sont des groupements phosphate, constituant les sites de plus haute affinité pour Zn, et 10% sont des groupements carboxyle, constituant les sites de plus haute affinité pour Pb.

- Dans le lichen hyperaccumulateur *Diploschistes muscorum*, Zn et Pb sont immobilisés sous forme de sels d'oxalate. Il s'agit d'un mécanisme physiologique adaptatif, qui n'existe pas chez les espèces tolérantes: dans *Cladonia subulata*, le zinc est complexé par un acide organique moins fort complexant que l'oxalate, probablement le malate; dans *Xanthoria parietina*, le plomb est piégé de façon passive par complexation sur les macromolécules de la paroi cellulaire des filaments fongiques. L'étude de ces trois systèmes a permis d'évaluer le potentiel et les limites de la spectroscopie d'absorption X pour l'étude des systèmes organiques naturels. Elle ouvre des perspectives intéressantes dans le domaine du traitement biologique des pollutions métalliques, comme la phytoremédiation ou la bioremédiation.

**MOTS-CLES**

spéciation - EXAFS - zinc - plomb - biosorption -  
complexation - bioindication - hyperaccumulation - tolérance

OBSERVATOIRE DE GRENOBLE  
et  
LABORATOIRE DE GEOPHYSIQUE INTERNE ET TECTONOPHYSIQUE

# THESE

présentée par

**Géraldine Sarret**

pour obtenir le titre de

**Docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble I**

Spécialité: **Géophysique - Géochimie - Géomécanique**

**Biogéochimie structurale du zinc et du plomb par  
spectroscopie EXAFS:  
Interactions avec des acides humiques, des parois cellulaires de  
champignon, et des lichens**

Date de soutenance: 9 Janvier 1998

Composition du jury:

Jean Cases	Président	Directeur de recherches, CNRS, Nancy
Jacques Berthelin	Rapporteur	Directeur de recherches, CNRS, Nancy
Denis Raoux	Rapporteur	Directeur de recherches, CNRS, Grenoble
Bernard Besnainou	Examineur	Chef de service, CEA, Cadarache
Jean-François Legrand	Examineur	Professeur, Université J. Fourier, Grenoble
Alain Manceau	Examineur	Directeur de recherches, CNRS, Grenoble
Chantal Van Haluwyn	Examineur	Professeur, Université de Lille II

## Remerciements

Tout a commencé par un concours de circonstances, qui m'a amené presque par hasard au LGIT pour mon stage de DEA. Ensuite, tout s'est enchaîné très vite, et me voilà déjà trois ans plus tard, encore toute étourdie.

Je voudrais avant tout remercier Jean Cases, qui est un peu à l'origine de tout ça, je suis très heureuse qu'il ait accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie aussi Denis Raoux et Jacques Berthelin d'avoir bien voulu être les rapporteurs de ce travail, dont certaines parties sont bien éloignées de leurs domaines de prédilection respectifs.

Merci à Alain Manceau qui a dirigé ce travail, pour son enthousiasme de chercheur qu'il a su me communiquer, sa confiance, son exigence dans le travail, et pour les nombreuses heures passées à lire et relire ma prose.

Mes remerciements vont aussi à Chantal Van Haluwyn pour m'avoir guidé sur les chemins de la lichénologie grâce à sa passion pour ces drôles de petites plantes. Je remercie Bernard Besnainou et Jean-François Legrand pour avoir accepté de juger ce travail et pour tout l'intérêt qu'ils y ont porté.

Je remercie aussi Michel Mench et toute l'équipe de biogéochimie des éléments traces de l'INRA de Bordeaux pour m'avoir toujours accueillie chaleureusement et m'avoir fait partager leurs connaissances. Je remercie également Jean-Claude Roux, qui est à l'origine de la partie « champignons », pour sa gentillesse et son enthousiasme.

Merci à l'équipe de la ligne CRG de l'ESRF, en particulier Jean-Louis et Yvonne, toujours prêts à venir nous dépanner à des heures indues, les deux Olivier, Dédé, et Jean-Jacques.

Je salue bien sur toute l'équipe des géochimistes du LGIT: Laurent Charlet et Lorenzo, que j'ai embêtés maintes fois avec mes questions de chimiste néophyte, une pensée toute particulière pour Martine, sa bonne humeur légendaire et son endurance sur électrophorèse, et pour Bruno et le temps qu'il a su me donner sans compter (sacrée endurance, lui aussi !). Merci bien sûr à Laurent, en espérant n'avoir pas trop abusé de ma position de chouchou... Merci à mes compagnons de route Manue, Céline, Uta, Jean-Claude, Michel, et Alix la petite dernière. Quand ça va pas, souvenez-vous, pour ceux qui les ont vécus, de ces mois de Juillet-Août à l'ombre du portakabin, ou des manip à cinq dans l'ex-labo de chimie. Ca aide à relativiser, vous verrez !

Une pensée à tous nos voisins géophysiciens et géomécaniciens de l'IRIGM, sans oublier les secrétaires et Sara-la-main-verte.

Et enfin, un grand merci à ma famille et à la tribu de Paquier en général, village un peu spécial où sont ancrées mes racines.

## **SOMMAIRE**

## SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
GLOSSAIRE	5
INTRODUCTION GENERALE	7
<b>CHAPITRE I. SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X</b>	<b>11</b>
I.1. INTRODUCTION	11
I.2. PRINCIPE	12
I.3. FORMALISME	14
<i>I.3.1. Equation générale</i>	<i>14</i>
<i>I.3.2. Approximations</i>	<i>15</i>
I.4. ANALYSE DES DONNEES	16
<i>I.4.1. Extraction du spectre EXAFS</i>	<i>16</i>
<i>I.4.2. Simulation numérique</i>	<i>18</i>
I.4.2.1. Programmes utilisés: FEFF7 et FITEX	18
I.4.2.2. Fonctions utilisées	19
I.4.2.3. Calcul en diffusion simple	28
I.4.2.4. Calcul en diffusion multiple	28
I.5. MISE EN OEUVRE EXPERIMENTALE	29
<i>I.5.1. Le rayonnement synchrotron</i>	<i>29</i>
<i>I.5.2. Configurations de la ligne de lumière</i>	<i>31</i>
I.6. LA SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION X APPLIQUEE AUX ECHANTILLONS NATURELS	31
<b>CHAPITRE II. CHIMIE DE COORDINATION DU ZINC ET DU PLOMB</b>	<b>37</b>
II.1. INTRODUCTION	37
II.2. LE ZINC	37
<i>II.2.1. Quelques généralités sur la chimie de coordination du zinc</i>	<i>37</i>
<i>II.2.2. Etude EXAFS de quelques composés de référence</i>	<i>39</i>
II.2.2.1. Composés minéraux	39
II.2.2.2. Composés organiques	41
<i>II.2.3. Conclusion</i>	<i>56</i>
II.3. LE PLOMB	57
<i>II.3.1. Généralités sur la chimie de coordination du plomb</i>	<i>57</i>
<i>II.3.2. Etude EXAFS de quelques composés de référence</i>	<i>61</i>
II.3.2.1. Composés minéraux	61
II.3.2.2. Composés organiques	63
II.4. CONCLUSION	67

<b>CHAPITRE III. MECANISMES DE COMPLEXATION DU ZINC ET DU PLOMB PAR LES SUBSTANCES HUMIQUES</b>	<b>69</b>
III.1. INTRODUCTION	69
III.2. ETAT DES CONNAISSANCES	70
III.2.1. Définitions	70
III.2.2. Genèse des substances humiques	70
III.2.3. Structure et composition des substances humiques	71
III.2.4 Interactions avec les éléments traces	75
III.2.4.1. Approche macroscopique	75
III.2.4.2. Approche microscopique	76
III.3. MATERIAUX ET METHODES	78
III.3.1. Extraction et caractérisation	78
III.3.2. Complexation	78
III.3.3. Absorption X	79
III.4. RESULTATS ET DISCUSSION	81
III.4.1. Description des AH non complexés	81
III.4.1.1. Analyse élémentaire des acides humiques non complexés	81
III.4.1.2. Comparaison des spectres RMN	81
III.4.2. Etude des complexes Zn-AH	83
III.4.2.1. Spectres EXAFS	83
III.4.2.1.1. Evolution en fonction de la concentration en zinc	83
III.4.2.1.2. Comparaison des AH à concentrations en zinc équivalentes	85
III.4.2.1.3. Comparaison avec les composés de référence	85
III.4.2.2. Paramètres structuraux	87
III.4.2.2.1. Complexes à faible [Zn] ( $3.1 \cdot 10^{-3}$ - $1.5 \cdot 10^{-2}$ mmol/g)	87
III.4.2.2.2. Complexes à [Zn] intermédiaire ( $7.6 \cdot 10^{-2}$ mmol/g)	89
III.4.2.2.3. Complexes à forte [Zn] ( $4.9 \cdot 10^{-1}$ mmol/g)	91
III.4.2.2.4. Complexes à très forte [Zn] (7.6 mmol/g)	91
III.4.2.3. Synthèse des résultats	94
III.4.3. Etude des complexes acide humique - Pb	96
III.4.3.1. Spectres EXAFS	96
III.4.3.2. Paramètres structuraux	99
III.5. CONCLUSION	101
<b>CHAPITRE 4. MECANISMES DE COMPLEXATION DU ZINC ET DU PLOMB SUR LA PAROI CELLULAIRE D'UN CHAMPIGNON FILAMENTEUX</b>	<b>103</b>
INTRODUCTION	103
STRUCTURAL DETERMINATION OF ZN AND PB BINDING SITES IN <i>PENICILLIUM CHRYSOGENUM</i>	

CELL WALL BY EXAFS SPECTROSCOPY	104
Abstract	105
Introduction	106
Background	107
Materials and Methods	108
Results and Discussion	109
Sorption isotherms.	109
Zn K-edge EXAFS.	110
Pb L <sub>3</sub> -edge EXAFS.	112
From Microscopic to Macroscopic	113
Acknowledgments	114
Literature cited	115
Figures caption	118
<b>CHAPITRE V. SPECIATION DU ZINC ET DU PLOMB DANS LES LICHENS</b>	<b>125</b>
V.1. INTRODUCTION	125
V.2. ETAT DES CONNAISSANCES	126
V.2.1. Méthodes analytiques d'étude des lichens	126
V.2.1.1. Concentration, composition	126
V.2.1.2. Localisation des éléments métalliques	126
V.2.1.3. Spéciation des éléments métalliques	127
V.2.2. Mécanismes d'accumulation des éléments métalliques	127
V.3. SPECIATION DU ZINC ET DU PLOMB DANS TROIS LICHENS CONTAMINES	130
V.3.1. Description des sites et des espèces étudiées	130
V.3.1.1. Auby (Nord)	130
V.3.1.2. Paimboeuf (Loire Atlantique)	132
V.3.2. Méthodes	132
V.3.2.1. Analyse élémentaire	132
V.3.2.2. Dosage des acides organiques	133
V.3.2.3. Diffraction et absorption X	134
V.3.3. Résultats des analyses chimiques	134
V.3.4. Mécanismes de bioaccumulation	136
V.3.4.1. Analyse par DRX	136
V.3.4.2. Analyse par spectroscopie EXAFS	138
V.3.4.2.1. Spéciation du plomb et du zinc dans <i>Diploschistes muscorum</i> et <i>Xanthoria parietina</i>	138
MÉCANISME OF LICHEN RESISTANCE TO METALLIC POLLUTION	139

<i>Abstract</i>	140
<i>Introduction</i>	141
<i>Material and Method</i>	142
<i>Results and Discussion</i>	142
Speciation of Zn in <i>Diploschistes muscorum</i>	142
Speciation of Pb in <i>Diploschistes muscorum</i>	143
Speciation of Pb in <i>Xanthoria parietina</i>	144
<i>Comparative mechanisms of resistance</i>	145
<i>Acknowledgments</i>	145
<i>Literature cited</i>	146
<i>Figure Caption</i>	149
V.3.4.2.2. Spéciation du zinc dans <i>Cladonia subulata</i>	150
V.4. CONCLUSION	161
<b>CONCLUSION</b>	<b>163</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>165</b>
<i>ANNEXE FEFF7</i>	167
<i>ANNEXE DVLS (Distance-Valence Least-Squares)</i>	171
<i>ANNEXE Acides humiques</i>	173
EXAFS study of the nature of zinc complexation sites in humic substances as a function of Zn concentration	173
Abstract	173
1. Introduction	173
2. Experimental	174
3. Results and discussion	174
3. 1 Reference compounds	174
3. 2 Zn complexed humic acids	175
4. Conclusion	176
Acknowledgments	176
5. References	176
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>179</b>

## GLOSSAIRE

Certains termes employés en géochimie de l'environnement possèdent des définitions différentes selon les auteurs. Par conséquent, il nous a semblé utile de préciser, pour chacun d'entre eux le sens dans lequel il sera employé dans ce manuscrit.

**Éléments traces:** Éléments chimiques appartenant à la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> série de transition et dont la concentration dans un système donné (sol, roche, eau, plante) est faible (< 1000 ppm environ). Lorsque leur concentration est plus élevée, on ne peut plus parler de traces, on emploie alors les termes de **métaux**, **métaux lourds**, ou **éléments métalliques**, ces trois termes étant considérés comme équivalents. *N.B.* L'appellation « $\square$ métal $\square$ » a un sens générique et ne fait pas référence aux propriétés physiques de l'élément considéré dans son degré d'oxydation 0.

**Contamination, pollution:** On parle de contamination ou de pollution si la concentration en métaux dans un sol ou dans une plante est anormalement élevée, c'est-à-dire supérieure aux valeurs moyennes du fond géochimique ou des plantes [1]. La contamination d'un sol peut être d'origine géochimique (naturelle) ou anthropique.

**Spéciation:** Ensemble des **formes chimiques** ou **états physico-chimiques** ou encore **états cristallochimiques** d'un élément dans un système donné (sol, eau, plante ...).

**Abréviations utilisées:**

AH: acide humique

AF: acide fulvique

CN: nombre de coordination (CN = 6 dans un octaèdre, et 4 dans un tétraèdre)

DRX: diffraction des rayons X

EXAFS: extended X-ray absorption fine structure

FDR: fonction de distribution radiale

MO: matière organique

SH: substances humiques

**INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

Le plomb et le zinc sont parmi les polluants métalliques les plus importants en terme de quantité émise dans l'environnement. Les émissions anthropiques de ces deux éléments sont respectivement 28 et 3 fois supérieures aux flux naturels (altération des roches, émissions volcaniques, ...) [2, 3]. Elles affectent fortement et durablement le cycle biogéochimique des éléments traces par accumulation dans certains compartiments, comme les sols (Fig. 1) et peuvent conduire, à terme, à l'intoxication chronique des organismes les plus sensibles. L'ampleur de la contamination des milieux naturels par le plomb et le zinc s'explique par leur utilisation très ancienne (depuis l'antiquité pour le plomb) et massive. De nos jours, le plomb est principalement utilisé dans les batteries, comme pigment dans les peintures et comme agent antidétonnant dans l'essence [4, 5]. En 1980, le trafic automobile était responsable de 70 à 75% des émissions atmosphériques de plomb [6]. Récemment, ce flux a largement diminué grâce à l'utilisation de l'essence sans plomb dans les pays occidentaux. Le zinc, quant à lui, est principalement utilisé dans les industries de galvanisation et les alliages. C'est un constituant commun des effluents industriels et miniers et des boues de station d'épuration [7], ce qui contribue à accentuer la concentration en zinc dans les sols, ces boues étant généralement utilisées comme fertilisant.

Le plomb est un élément hautement toxique [8], qui serait en partie responsable de la chute de l'empire romain [9]. Aujourd'hui, la concentration sanguine moyenne est proche de la limite toxicologique admise (0.2 mg/l), la marge de sécurité étant donc quasi inexistante pour ce métal [10]. Chaque année en France, on relève des cas de saturnisme chez des enfants vivant dans des habitations anciennes. Contrairement au plomb, le zinc est un élément essentiel pour les êtres vivants. Bien que sa toxicité soit moins grande que celle du plomb, ce métal peut engendrer des pathologies, notamment articulaires, s'il est présent en forte concentration [11].

Il est aujourd'hui admis que le risque écotoxicologique des métaux présents dans le milieu naturel dépend beaucoup plus de leur statut physico-chimique que de leur concentration totale. Or, dans le milieu naturel, les éléments métalliques peuvent être présents à l'état d'ion libre, adsorbés sur une surface, précipités sous forme minérale, complexés avec des molécules organiques, etc. Si les métaux sont présents sous une forme soluble, leur mobilité, leur biodisponibilité et donc le risque de toxicité sont importants. A l'inverse, les formes insolubles présentent un risque limité. La connaissance de la forme chimique des éléments traces dans les systèmes naturels contaminés (sol, eau, plante, ...) est donc une donnée essentielle pour l'évaluation du risque écotoxicologique.

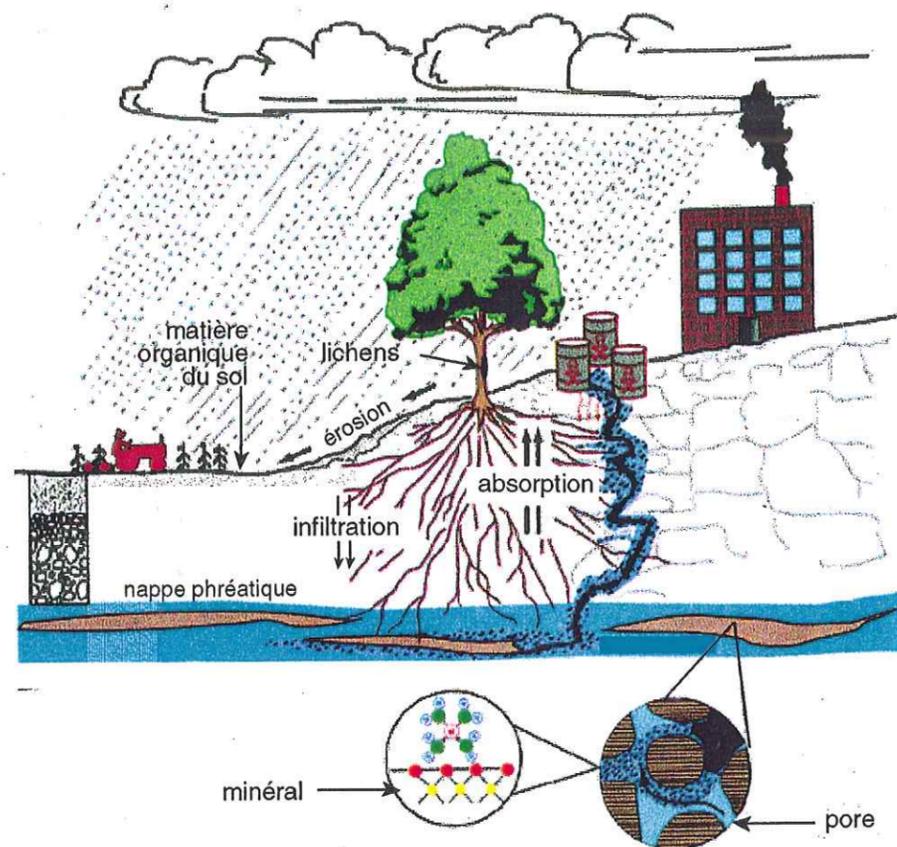


Figure 1: Interactions des polluants dans l'environnement

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux compartiments essentiels du cycle biogéochimique des éléments métalliques que sont les sols et les végétaux (Fig. 1). Dans les sols, qui constituent le principal puits de décharge des métaux dans l'environnement, les éléments métalliques sont majoritairement associés aux fractions organiques et minérales. Cette étude a été focalisée sur les acides humiques, polymères naturels à forte capacité de complexation, qui sont, avec les acides fulviques, les constituants les plus stables de la matière organique des sols. L'objectif était de caractériser au niveau moléculaire les mécanismes de complexation du zinc et du plomb par ces macromolécules. Dans le deuxième compartiment étudié, l'étude a porté plus spécifiquement sur les champignons filamenteux et les lichens. Les premiers sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire, la biomasse morte, sous-produit de cette activité, pouvant être valorisée pour le traitement des eaux chargées en métaux grâce aux propriétés biosorbantes de la paroi cellulaire des champignons. Nous avons ainsi étudié les mécanismes de complexation du plomb et du zinc sur les parois cellulaires de *Penicillium chrysogenum* en couplant l'approche macroscopique par chimie de solution et

l'approche microscopique par spectroscopie d'absorption X. Les lichens présentent l'intérêt majeur d'être des bioindicateurs de la qualité de l'air et en particulier de permettre le suivi des pollutions métalliques. Certaines espèces sont seulement tolérantes aux métaux, d'autres développent une résistance, et peuvent accumuler des quantités très élevées (jusqu'à plusieurs % de leur poids sec) sans dommage apparent pour l'organisme. Nous avons étudié différentes espèces exposées à des pollutions par les éléments métalliques. L'objectif était de caractériser les mécanismes extrêmement efficaces de résistance et d'hyperaccumulation des métaux chez ces végétaux inférieurs.

Dans chacun de ces deux systèmes naturels, la forme chimique du zinc et du plomb a été étudiée par spectroscopie d'absorption X. L'application de cette méthode à des échantillons naturels organiques, comme les acides humiques ou les plantes, est très récente puisque la première publication sur le sujet date de 1996 [12]. Les difficultés intrinsèques à ces systèmes sont en particulier induites par la complexité structurale des échantillons, la faible concentration en métaux dans ces systèmes et par le fait que l'environnement du métal cible (Zn, Pb) soit constitué exclusivement d'atomes légers (O, C, N, S, P). Ce travail avait donc aussi pour objectif d'évaluer les possibilités et les limites de cette méthode pour l'étude structurale des éléments traces dans les systèmes organiques naturels.

**CHAPITRE I.**

**SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X**

## **CHAPITRE I. SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X**

### **I.1. INTRODUCTION**

Les oscillations EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) ont été observées pour la première fois en 1920 par Fricke et Hertz, mais il faut attendre les années 1970 pour que soit proposée la première formulation mathématique et une méthode d'analyse de ces oscillations par transformée de Fourier [13]. Cette technique a connu son développement le plus important au cours de ces vingt dernières années, grâce à l'apparition du rayonnement synchrotron. Actuellement, les recherches théoriques en cours concernent surtout l'analyse de la région du seuil et la prise en compte des phénomènes de diffusion multiple. La spectroscopie d'absorption X bénéficie des avancées technologiques du rayonnement synchrotron, qui délivre un flux de photons X toujours plus important et un faisceau de mieux en mieux focalisé. Cela a permis de diminuer le temps d'acquisition et d'abaisser les limites de détection en concentration des éléments chimiques. Il faut noter que ces progrès techniques ne sont effectifs que s'ils s'accompagnent d'une amélioration de la qualité des détecteurs, principalement d'une augmentation du taux de comptage et de leur discrimination en énergie. Les détecteurs solides multi-éléments résolus en énergie permettent de répondre à ces besoins.

Les applications de la spectroscopie d'absorption X sont multiples [14, 15], que ce soit en chimie, physique des matériaux et des surfaces, en catalyse et en biologie. L'utilisation de la spectroscopie d'absorption X en biogéochimie de l'environnement, dernier né des domaines d'application, suscite un intérêt croissant, en particulier pour l'étude de systèmes naturels non perturbés. De plus, les développements récents en absorption X (EXAFS rapide, REFLEXAFS, DAFS, microXAS) ouvrent de nouvelles perspectives dans ce domaine [16].

L'objet de ce chapitre n'est pas de reprendre toute la théorie de l'absorption X, mais de donner au lecteur les clés nécessaires pour comprendre le principe et la mise en oeuvre de cette méthode. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter aux nombreux ouvrages récents et très complets sur le sujet [17-20].

## I.2. PRINCIPE

Cette méthode consiste à mesurer l'absorbance  $\mu x$  de l'échantillon en fonction de l'énergie incidente du rayonnement. En mode de transmission,  $\mu x$  est défini par la loi de Beer-Lambert:

$$I = I_0 \exp(-\mu x) \quad (I-1)$$

où  $I_0$  et  $I$  correspondent respectivement à l'intensité du faisceau incident et transmis, et  $x$  à l'épaisseur de l'échantillon (Fig. I-1). Pour un atome donné, l'absorbance  $\mu x$  présente des augmentations brutales à certaines valeurs d'énergie, appelées seuils d'absorption. La valeur  $E_0$  de l'énergie d'un seuil d'absorption, ou énergie de Fermi, dépend de la nature de l'atome étudié. A cette énergie, il se produit une transition électronique d'un niveau de coeur (1s pour un seuil K, 2p pour un seuil L<sub>II</sub> ou L<sub>III</sub>) vers un état excité.

### • La région XANES

Pour  $E \leq E_0$ , l'électron passe de son état fondamental à un état électronique excité situé en dessous du niveau de Fermi (Fig. I-1). L'analyse de cette zone fournit des informations sur la structure électronique de l'atome étudié. Pour  $E_0 \leq E \leq E_0 + 20-50$  eV, l'électron est éjecté vers le continuum mais son énergie cinétique  $E_c = hv - E_0$  est faible, et son libre parcours moyen est très grand (plusieurs dizaines d'angströms; Fig. I-2). De ce fait, l'onde associée au photo-électron sonde un large domaine spatial, et il peut se produire des phénomènes de diffusion multiple avec les atomes voisins. Cette région proche du seuil d'absorption est appelée XANES (X-ray absorption near-edge structure).

### • La région EXAFS

Pour  $E_0 + 50 \text{ eV} \leq E \leq E_0 + 1000$  eV, l'énergie cinétique du photo-électron est suffisante pour qu'il soit considéré comme libre. Dans le cas d'un gaz mono-atomique, l'atome est isolé et la décroissance de  $\mu$  après le seuil est monotone. En revanche, pour tout autre composé, la sphère de coordination de l'atome étudié contient d'autres atomes. L'onde électromagnétique associée au photo-électron est rétrodiffusée par ces atomes, et interfère avec l'onde émergente, ce qui donne lieu aux oscillations EXAFS (Fig. I-1). L'étude de ces oscillations fournit des informations structurales sur l'environnement de l'élément étudié, *i.e.*, la distance, la nature, le nombre, et la cohérence des couches d'atomes entourant l'atome absorbeur. Dans ce travail, seule la région EXAFS sera étudiée.

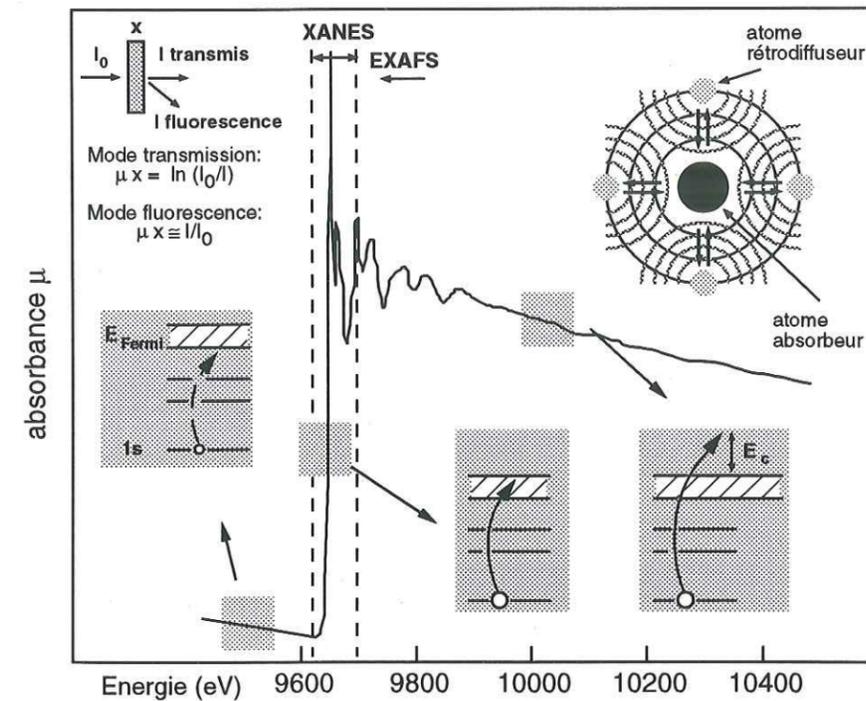


Figure I-1: Principe physique de la spectroscopie d'absorption des rayons X, exemple d'un spectre au seuil K du zinc

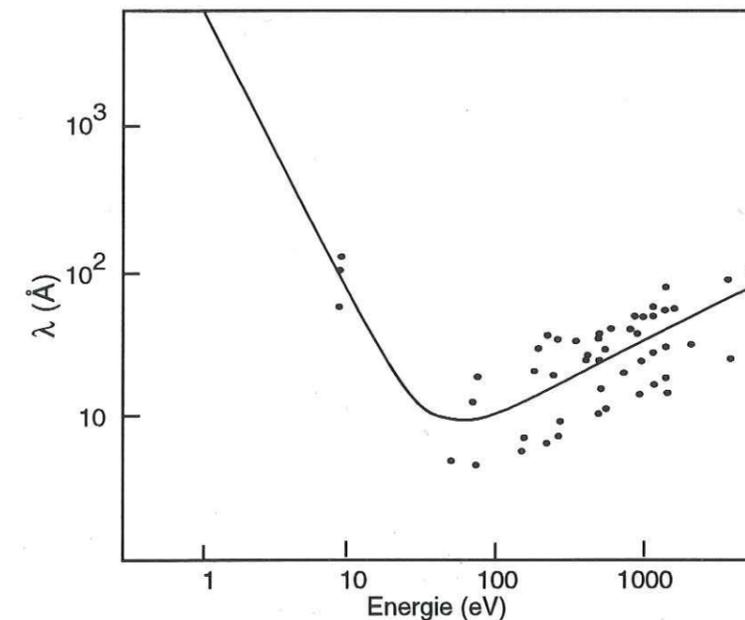


Figure I-2: Courbe universelle du libre parcours moyen de l'électron en fonction de son énergie cinétique (d'après Seah et Dench, 1979; Teo, 1986)

La spectroscopie d'absorption X n'est sensible qu'à l'ordre local ( $\sim 2-4 \text{ \AA}$ ), et ne permet pas d'accéder à l'ordre à moyenne et longue distance à cause du libre parcours moyen limité du photo-électron. Il est donc possible d'étudier par cette méthode des composés désordonnés, amorphes ou mal cristallisés. De plus, elle est spécifique d'un élément, ce qui est très avantageux pour l'étude de systèmes naturels polymétalliques et polycristallins. C'est donc une sonde structurale *locale et chimiquement sélective*.

### I.3. FORMALISME

#### I.3.1. Equation générale

L'interaction rayonnement matière peut être décrit par la règle d'or de Fermi, qui suppose que la transition est de nature dipolaire:

$$\mu = 4\pi^2 n c \hbar \omega \sum_{i,f} \left| \langle f_f | \vec{e} \cdot \vec{r} | f_i \rangle \right|^2 \delta(E_i + \hbar\omega - E_f) \quad (I-2)$$

où

- $n$  est la densité d'atomes considérés.
- $f_i$  est la fonction d'onde de l'électron dans l'état initial,  $f_f$  celle de l'électron dans l'état final.
- $\vec{e} \cdot \vec{r}$  est l'hamiltonien d'interaction rayonnement-matière dans l'approximation dipolaire, produit scalaire du champ électrique du photon et du vecteur position du photo-électron.

L'équation EXAFS, dans le formalisme d'onde sphérique et de la diffusion simple est la suivante:

$$\chi(k) = -S_0^2 \sum_i \frac{N_i}{kR_i^2} |\phi_i(\pi, k)| e^{-2\sigma_i^2 k^2} e^{\lambda(k)} \sin[2kR_i + \varphi_i(k) + 2\delta_c(k)] \quad (I-3)$$

- avec  $k = \sqrt{\frac{2m_e}{\hbar^2}(\hbar\nu - E_0)}$  (I-4), où  $m_e$  est la masse de l'électron,  $\hbar\nu$  l'énergie du photon incident et  $E_0$  l'énergie d'ionisation de l'élément absorbant.
- $S_0^2$ : terme de réduction d'amplitude dû aux effets multi-électroniques.
- $N_i$ : nombre de voisins de type  $i$  situés à la distance  $R_i$  de l'atome absorbant.
- $R_i$ : longueur effective du chemin  $i$ .

- $|\phi_i(\pi, k)|$ : amplitude de rétrodiffusion de l'atome de type  $i$ .
- $\sigma_i$ : facteur de Debye-Waller dans l'approximation d'une distribution gaussienne comprend un terme de désordre statique (distribution des distances) et dynamique (agitation thermique).
- $\lambda$ : libre parcours moyen de l'électron. Ce terme prend en compte les processus de diffusion inélastique du photo-électron par les électrons de valence (Fig. I-2).
- $\delta_c(k)$ : fonction de déphasage de l'atome central.
- $\varphi_i(k)$ : fonction de déphasage de l'atome rétrodiffuseur.

#### Remarques

Le terme en sinus, qui est la composante oscillante, contient un terme lié à la distance interatomique, mais aussi des termes électroniques liés à la nature des atomes ( $\varphi_i$  et  $\delta_c$ ). La fréquence des oscillations dépend donc de la distance interatomique, mais aussi de la nature des atomes. Le terme d'amplitude dépend du nombre de voisins ( $N_i$ ), et également du numéro atomique des atomes rétrodiffuseurs dans la couche  $i$  ( $\phi_i$ ). L'expression comporte deux facteurs d'atténuation. Le premier est dû au fait que l'électron a un libre parcours moyen limité  $\lambda$ , qui est une fonction de  $k$  donc de l'énergie de l'électron (Fig. I-2). Le deuxième traduit le désordre de la structure par l'intermédiaire du facteur de Debye-Waller  $\sigma$ .

#### I.3.2. Approximations

Il faut garder en mémoire que cette formulation est basée sur plusieurs approximations:

- La transition est de nature dipolaire (approximation dipolaire électrique).
- L'électron est éjecté d'un niveau 1s.
- Les fonctions d'onde  $f_i$  et  $f_f$  sont mono-électroniques: seul le photo-électron éjecté du niveau 1s participe au processus d'absorption, il n'y a pas d'interaction entre les électrons.
- Le potentiel des atomes est de symétrie sphérique, de rayon  $R$ .
- L'onde sortante est une onde sphérique.
- La distribution des distances est harmonique, et donnée par une distribution gaussienne pas trop élargie.
- L'interaction entre le photo-électron et l'atome voisin est une diffusion simple, c'est-à-dire que le trajet du photo-électron est un aller-retour entre l'absorbant et le rétrodiffuseur. Cette approximation est valable pour des valeurs de  $k$  supérieures à  $3-4 \text{ \AA}^{-1}$ , et pour les premières couches atomiques. Comme nous le verrons ultérieurement, au-delà de la première couche et

en fonction de la géométrie de l'arrangement des atomes, la diffusion multiple peut avoir une intensité non-négligeable.

## I.4. ANALYSE DES DONNEES

### I.4.1. Extraction du spectre EXAFS

Lors d'une expérience, les données enregistrées sont  $I_0$ , l'intensité avant échantillon, et  $I$ , l'intensité après passage dans l'échantillon. L'absorbance  $\mu x$  est donnée par la relation (I-1) en mode de transmission, et par  $\mu x \approx I/I_0$  en mode de détection par fluorescence (Fig. I-1).

L'absorbance  $\mu x$  mesurée contient une composante due à la matrice ( $\mu_0$ ), et une autre due à l'atome absorbeur lui-même ( $\mu_1$ ), dont il faut s'affranchir pour obtenir la fonction d'onde  $\chi(k)$ . On a ainsi la relation:

$$\chi = \frac{\mu - \mu_1}{\mu_1 - \mu_0} \quad (\text{I-6})$$

$\mu_0$  après seuil est déterminé en extrapolant l'absorption mesurée avant seuil. On utilise pour cela une fonction polynomiale, ou la méthode de Lengeler (Fig. I-3-a).  $\mu_1$  est déterminé à l'aide d'une fonction spline, constituée par plusieurs polynômes du troisième degré adjacents (Fig. I-3-b). La fonction d'onde  $\chi(E)$  ainsi obtenue est alors convertie en  $\chi(k)$  suivant la relation (I-5) (Fig. I-3-c). Pour pouvoir comparer les spectres entre eux, il faut choisir la position du seuil toujours de la même manière. Dans toute cette étude, le seuil a été choisi à la mi-hauteur du saut d'absorption (Fig. I-3-b).

La fonction  $\chi(k)$  est alors multipliée par une puissance de  $k$  (1, 2 ou 3) selon la région du spectre que l'on veut privilégier. Par exemple, si on observe un battement (région où l'amplitude des oscillations s'annule à cause d'une interférence destructive entre deux couches atomiques) à haut  $k$ , on choisira une puissance de  $k$  élevée afin de donner un poids plus important à cette région, et de bien séparer les deux couches. La transformée de Fourier de la fonction  $k^n \chi(k)$  permet de passer de l'espace réciproque en  $\text{\AA}^{-1}$  à l'espace réel en  $\text{\AA}$  (Fig. I-3-d). Comme le domaine en  $k$  de  $\chi(k)$  est limité alors que le domaine d'intégration s'étend de 0 à  $+\infty$ , les effets de coupure entraînent la présence de lobes sur le module de la transformée de Fourier qui n'ont pas de signification structurale. Pour atténuer ces pics parasites, on pondère  $\chi(k)$  par une fenêtre d'apodisation minimisant les effets de coupure. La fenêtre de Kaiser permet cela

sans affecter de façon significative l'amplitude des pics [21]. La fonction de distribution radiale (FDR) obtenue, qui est le module des parties réelles et imaginaires de la TF, permet alors de visualiser la distribution des couches atomiques autour de l'atome absorbeur. Il faut noter que les distances que l'on obtient sont décalées par rapport aux distances réelles à cause des termes de déphasage  $\delta_c$  et  $\varphi_i$  contenus dans la fonction sinus (Eq. I-3). Ce décalage est fonction de la distance, et surtout de la nature de chaque voisin, puisque  $\varphi_i$  dépend de la nature de la couche atomique.

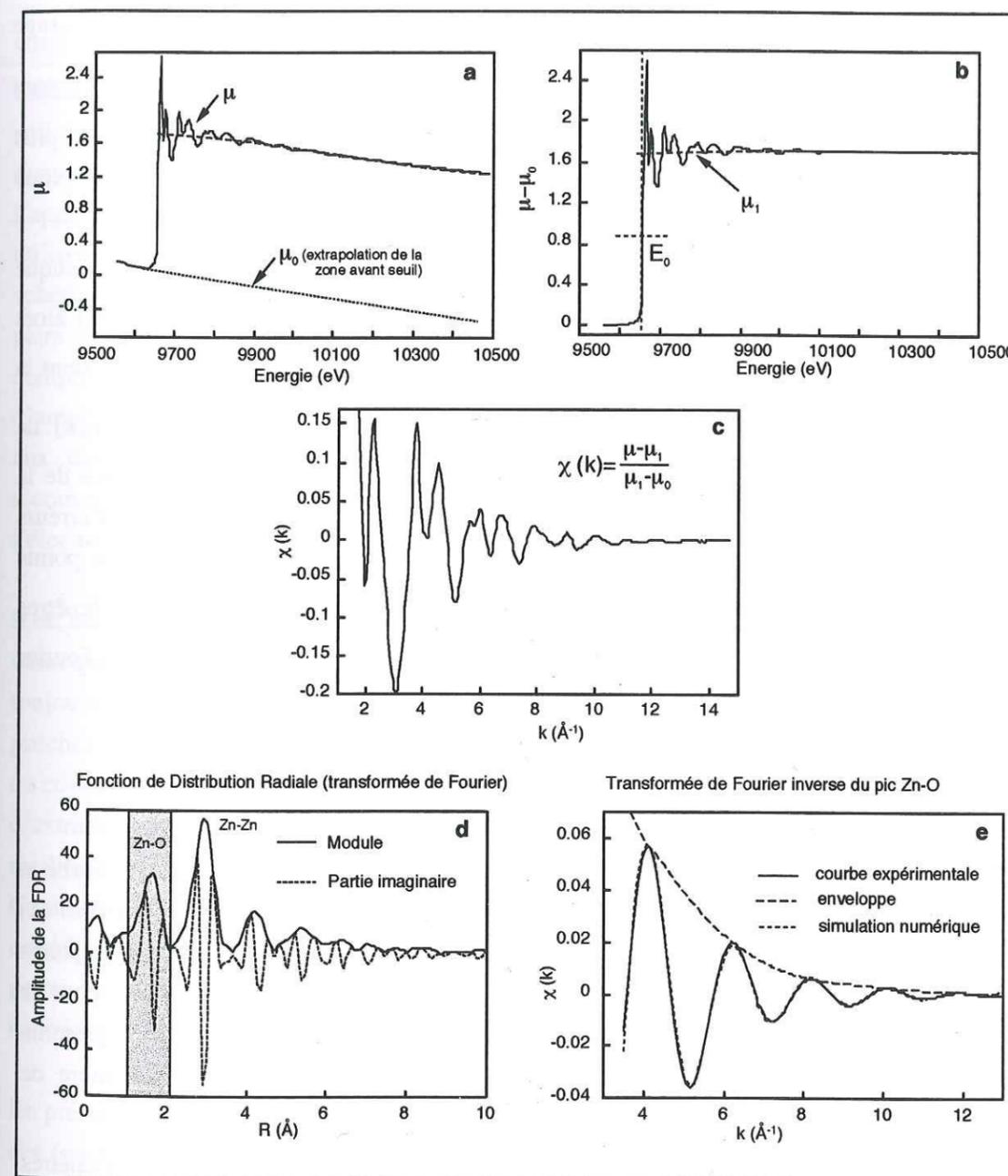


Figure I-3: Etapes de l'extraction et de l'analyse des données

### I.4.2. Simulation numérique

Pour déterminer les distances interatomiques réelles  $R$ , ainsi que la nature et le nombre de voisins  $N$  et le facteur de Debye-Waller  $\sigma$  de chaque couche atomique, on simule numériquement la fonction  $\chi(k)$  expérimentale par son expression théorique (I-3) (Fig. 1-3-e). Pour cela, un certain nombre de termes doivent être connus: le libre parcours moyen  $\lambda(k)$  pour chaque couche atomique, les fonctions d'amplitude de rétrodiffusion  $|\phi_i(k)|$  et de déphasage  $\varphi_i(k)$  de chaque atome  $i$ , et la fonction de déphasage de l'atome central  $\delta_c(k)$ . Ces termes sont soit extraits à partir de spectres de composés de référence, dont la structure doit être la plus proche possible de celle du composé inconnu, soit calculés de façon théorique. Nous comparerons chacune de ces fonctions dans le paragraphe IV. 2. 2.

La simulation numérique peut se faire sur le spectre total  $\chi(k)$ , mais il est souvent plus pratique de simuler chaque couche atomique séparément car le nombre de paramètres ajustés est alors moins grand. De plus, on s'affranchit des contributions des couches éloignées ( $R \geq 4 \text{ \AA}$ ) dont la prise en compte dans la simulation est délicate. Pour cela, on isole la contribution  $\chi_i(k)$  de chaque couche atomique par filtrage par transformée de Fourier (Fig. 1-3-d). Si les pics de la fonction de distribution radiale sont bien séparés, le filtrage n'introduit pas d'erreurs significatives [22]. Le nombre de paramètres ajustés ne doit pas dépasser le nombre de points indépendants  $P_i$  donné par la formule de Nyquist:  $P_i = 2\Delta k \Delta R/\pi$ , où  $\Delta k$  et  $\Delta R$  sont les fenêtres dans l'espace réciproque (fenêtre d'intégration) et réel (bornes de la transformée de Fourier inverse) pour la couche considérée.

#### I.4.2.1. Programmes utilisés: FEFF7 et FITEX

- FEFF7 est un programme qui permet de réaliser des calculs *ab initio* en onde courbe et qui utilise le formalisme de la diffusion multiple. Dans cette étude, il a été utilisé à deux fins: (1) Pour calculer des fonctions d'amplitude, de déphasage et de libre parcours moyen de paires atomiques données qui seront utilisées, comme les fonctions tabulées de McKale, pour la simulation des contributions de diffusion simple des couches atomiques par le programme FITEX, (2) Pour étudier les phénomènes de diffusion multiple dans un certain nombre de composés de référence.

- FITEX est un programme de simulation numérique qui permet d'affiner les paramètres structuraux d'un spectre  $\chi(k)$  par minimisation du carré des écarts. Ce programme utilise l'approximation de diffusion simple et des fonctions d'amplitude et de déphasage calculées par

FEFF à partir de composés de référence dont la structure est connue, ou expérimentales. Dans cette étude, il a été utilisé pour toutes les simulations numériques en diffusion simple.

#### I.4.2.2. Fonctions utilisées

La simulation numérique requiert la connaissance du libre parcours moyen  $\lambda(k)$  pour chaque couche atomique, des fonctions d'amplitude de rétrodiffusion  $|\phi_i(k)|$  et de déphasage  $\varphi_i(k)$  de chaque atome proche voisin  $i$ , et de la fonction de déphasage de l'atome central  $\delta_c(k)$ . Ces fonctions sont soit expérimentales, *i.e.*, extraites à partir de l'étude de composés de référence, soit théoriques. Trois types de fonctions d'amplitude et de déphasage calculées *ab initio* sont disponibles. (1) Les fonctions tabulées par Teo et Lee [23] ont été calculées dans l'approximation onde plane, *i.e.* elles ne dépendent pas de  $R$ . Elles ne sont presque plus utilisées actuellement. (2) Les fonctions de McKale et al. [24] utilisent l'approximation onde sphérique et ignorent la dépendance en énergie de l'électron. Elles ont été calculées pour une paire isolée de distance interatomique 2.5 et 4 Å, et sont interpolées pour les distances comprises entre ces deux valeurs. (3) Le programme FEFF7 permet de calculer des fonctions d'amplitude, de déphasage et de libre parcours moyen pour une structure donnée. Contrairement aux deux formalismes précédents, FEFF7 calcule des potentiels dits moléculaires par recouvrement des potentiels de chaque atome, et prend en compte la dépendance en énergie de l'électron.

Il est admis que malgré les erreurs introduites lors de l'extraction des fonctions expérimentales, telles que l'effet de coupure lors du filtrage par transformée de Fourier [22], ces fonctions sont toujours préférables aux fonctions calculées *ab initio*. En effet, si les deux structures sont proches, la transférabilité des fonctions d'amplitude, de déphasage et de libre parcours moyen du composé de référence au composé étudié est très bonne [25]. De plus, comme la procédure d'extraction du spectre EXAFS est la même pour les deux composés, la précision sur  $N$  sera meilleure. Cependant, on ne dispose pas toujours de composés de référence appropriés? Contrairement à la plupart des solides inorganiques, la structure d'un grand nombre de complexes métal-molécule organique n'est pas connue, et les contributions des différentes paires atomiques d'une référence ne sont pas toujours séparables. Dans ce cas, on utilise des fonctions théoriques.

En prenant le cas des paires Zn-O et Pb-O, nous allons étudier les différences entre chacune de ces fonctions, et évaluer leur transférabilité d'un composé à un autre, ou entre deux mêmes paires atomiques situées à des distances différentes au sein d'un même composé.

- Paire zinc-oxygène

La figure I-4-a présente les fonctions d'amplitude expérimentales (extraites de la première couche de ZnO, à 1.98 Å), tabulées par McKale pour  $d(\text{Zn-O}) = 2.5$  et 4 Å, et calculées à l'aide du code FEFF pour la paire Zn-O au sein de la structure ZnO d'une part, et en l'absence de voisins d'autre part. Ces fonctions ne peuvent pas être comparées telles quelles car le terme de libre parcours moyen utilisé pour les fonctions FEFF est calculé *ab initio* par le programme, alors qu'on utilise une fonction paramétrée (fonction 1 ou 2 dans la figure I-4-b) pour les fonctions McKale et expérimentales. La fonction paramétrée utilisée classiquement est la fonction 2:  $\exp(-2R/\lambda)$ . Elle ne rend pas compte du fait que le libre parcours moyen est très grand à bas  $k$ , on préfère donc utiliser la fonction 1. Cependant, comme on fixe généralement la borne inférieure de l'intervalle de simulation vers 3-4 Å<sup>-1</sup>, ces deux fonctions sont équivalentes pour la simulation (Fig. I-4-b).

La figure I-4-c compare les fonctions amplitude\*fonction de libre parcours moyen. Elles décroissent toutes très rapidement dès 5 Å<sup>-1</sup>. Ceci provient du faible pouvoir de rétrodiffusion des atomes d'oxygène, qui n'ont que 8 électrons. En conséquence, les oscillations EXAFS seront très amorties. Les fonctions McKale et FEFF sont inférieures à l'expérimentale,  $N$  sera donc surestimé si on utilise ces fonctions théoriques. On peut facilement calculer le facteur de correction à apporter à  $N$ : C'est le rapport entre l'intégrale de la fonction expérimentale et l'intégrale de la fonction théorique sur la zone 4-14 Å<sup>-1</sup> (zone de simulation numérique habituelle). Il varie de 0.85 à 0.93 selon le type de fonction. L'écart entre les fonctions expérimentales et théoriques est donc compris entre 5 et 15%, ce qui est très bon par rapport à la précision globale sur  $N$ , qui est de 20%. La comparaison des deux fonctions FEFF (avec et sans voisins) montre que la présence de voisins autour de la paire Zn-O diminue légèrement la fonction d'amplitude, la différence sur  $N$  étant de 10% environ.

La figure I-4d compare les fonctions de déphasage total pour la paire Zn-O. Les fonctions FEFF sont quasiment superposées à l'expérimentale, alors que les fonctions McKale ont une pente nettement différente. Cela devrait induire un décalage en fréquence des simulations numériques. La figure I-4e compare les simulations pour la paire Zn-O à 1.98 Å obtenues avec la fonction FEFF et McKale. On voit que le décalage des fonctions d'onde calculées par FEFF et McKale est minime, et n'existe que pour  $k < 4$  Å<sup>-1</sup>. Notons que l'écart de pente est compensé par un  $\Delta E$  de -5 eV pour la simulation FEFF, et de -8 eV pour la simulation McKale (Fig. I-4e). L'écart de  $R$  entre les deux simulations n'est que de 0.01 Å. On peut donc considérer que les fonctions de déphasage calculées par McKale sont tout à fait valables, et équivalentes aux fonctions FEFF.

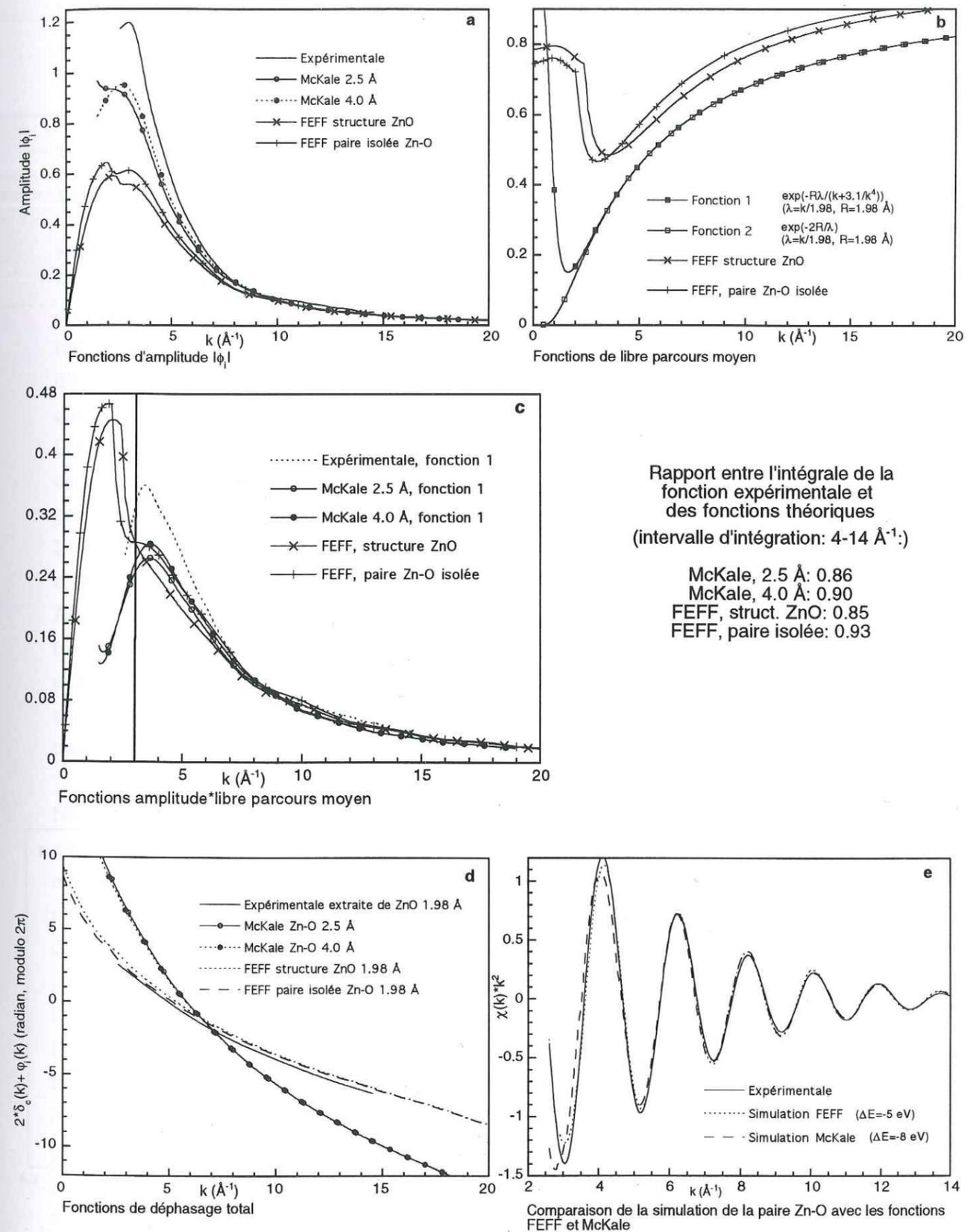


Figure I-4: Comparaison des fonctions d'amplitude et de déphasage théoriques et expérimentales pour la paire Zn-O

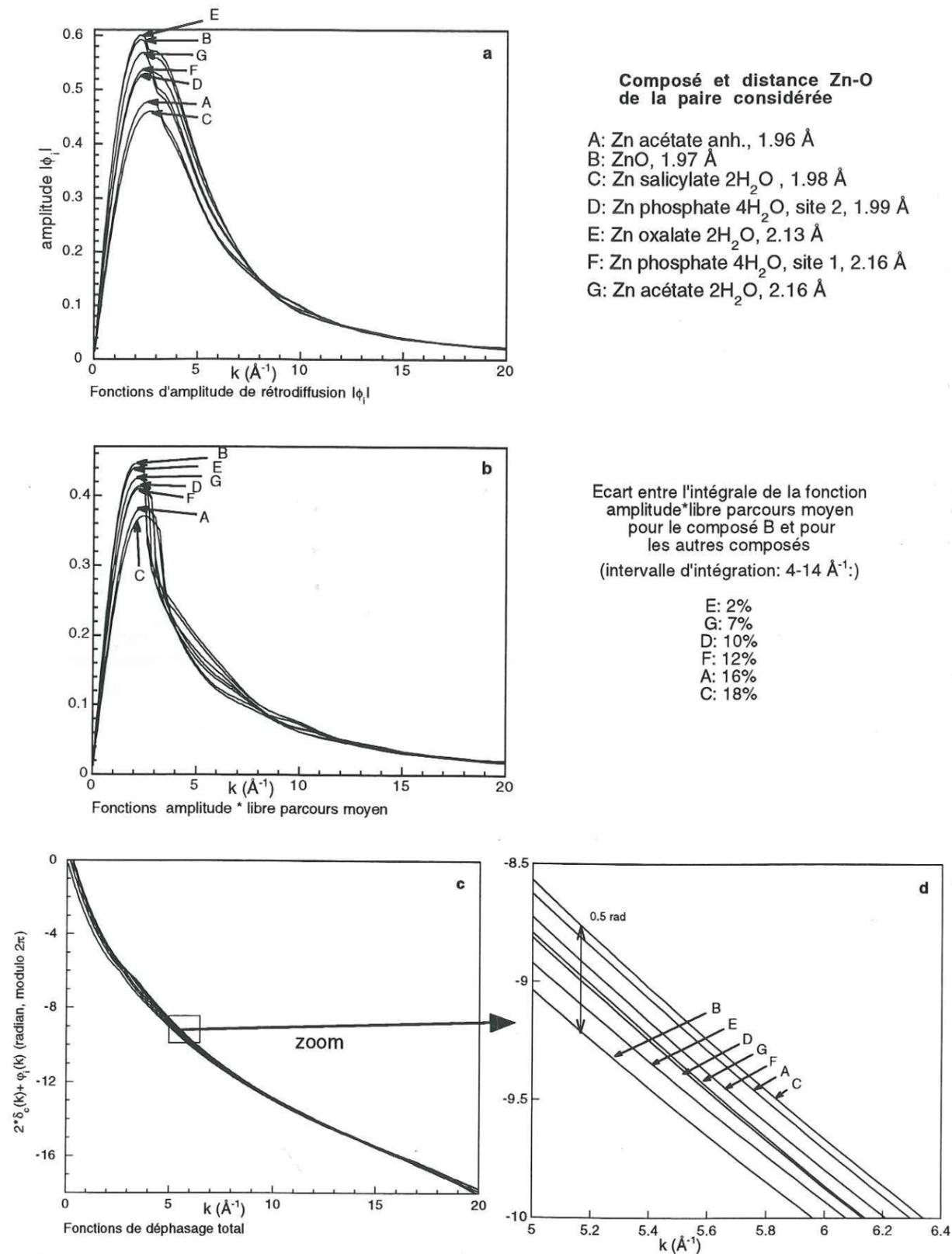


Figure I-5: Comparaison des fonctions d'amplitude et de déphasage calculées par FEFF pour différents composés du zinc

Nous allons maintenant étudier l'influence de la nature et de l'arrangement des atomes voisins sur les fonctions d'amplitude, de déphasage et de libre parcours moyen. La figure I-5 compare ces fonctions pour la paire Zn-O à des distances proches ( $d(\text{Zn-O})=1.98 - 2.16 \text{ \AA}$ ) dans différents composés du zinc. Les figures I-5a et I-5b montrent que le voisinage de la paire Zn-O a une influence sur la fonction d'amplitude et libre parcours moyen jusqu'à  $8 \text{ \AA}^{-1}$  environ. La fonction de libre parcours moyen n'atténue pas uniformément la fonction d'amplitude, mais modifie sa forme en fonction de la structure du composé. La comparaison des intégrales de la fonction amplitude\*libre parcours moyen pour chaque composé montre que l'écart maximal sur  $N$  est de 18%. Notons que cet écart peut être important même entre deux composés organiques, comme l'oxalate et le salicylate de zinc dihydrate. L'environnement atomique a donc une influence non négligeable sur la fonction d'amplitude. La transférabilité des fonctions d'amplitude n'est possible que si les composés ont des structures proches. Sinon, on risque de diminuer sensiblement la précision sur  $N$ .

Les figures I-5c et I-5d montrent que les fonctions de déphasage dépendent aussi sensiblement de l'environnement atomique, et cela dans le même sens que la fonction amplitude\*libre parcours moyen (l'ordre BEDGFAC est presque conservé entre la Fig. I-5b et la Fig. I-5c). L'écart maximal entre deux fonctions de déphasage est de 0.5 rad, ce qui est très faible. Il n'entraîne pas de différence de  $R$  perceptible lors de la simulation numérique.

Ainsi, le transfert des fonctions d'amplitude et de déphasage pour une couche atomique donnée (ici la première couche) d'un composé à l'autre peut introduire une erreur significative sur  $N$ , mais pas sur  $R$ . Cela milite donc pour l'utilisation du code FEFF, qui calcule ces fonctions pour un environnement donné, par exemple un cluster de structure aussi proche que possible de celle du composé inconnu.

Nous allons maintenant étudier l'influence de la distance interatomique sur les fonctions d'amplitude et de déphasage. Pour cela, on a comparé les fonctions des paires Zn-O du monoxyde de zinc (ZnO) à des distances  $R$  différentes (Fig. I-6). La fonction d'amplitude de rétrodiffusion de l'oxygène pour la première distance (1.98 Å) se détache des autres, mais la dépendance en distance est minimale. Par contre, la fonction amplitude\*libre parcours moyen est fortement influencée par  $R$ , ce qui est normal car le libre parcours moyen du photoélectron varie fortement en fonction de la distance interatomique (Fig. I-6b). En conséquence, les écarts entre l'intégrale de ces fonctions, qui correspondent aux écarts sur  $N$  déterminés lors des simulations numériques, augmentent avec la distance  $R$ . Ainsi,  $N$  sera sous-estimé de 20 à 30% si on utilise des fonctions d'amplitude et de libre parcours moyen provenant de la première couche Zn-O pour simuler la deuxième couche d'oxygène. La transférabilité de la fonction amplitude\*libre parcours moyen d'une couche à une autre couche située à une distance différente n'est donc pas bonne.

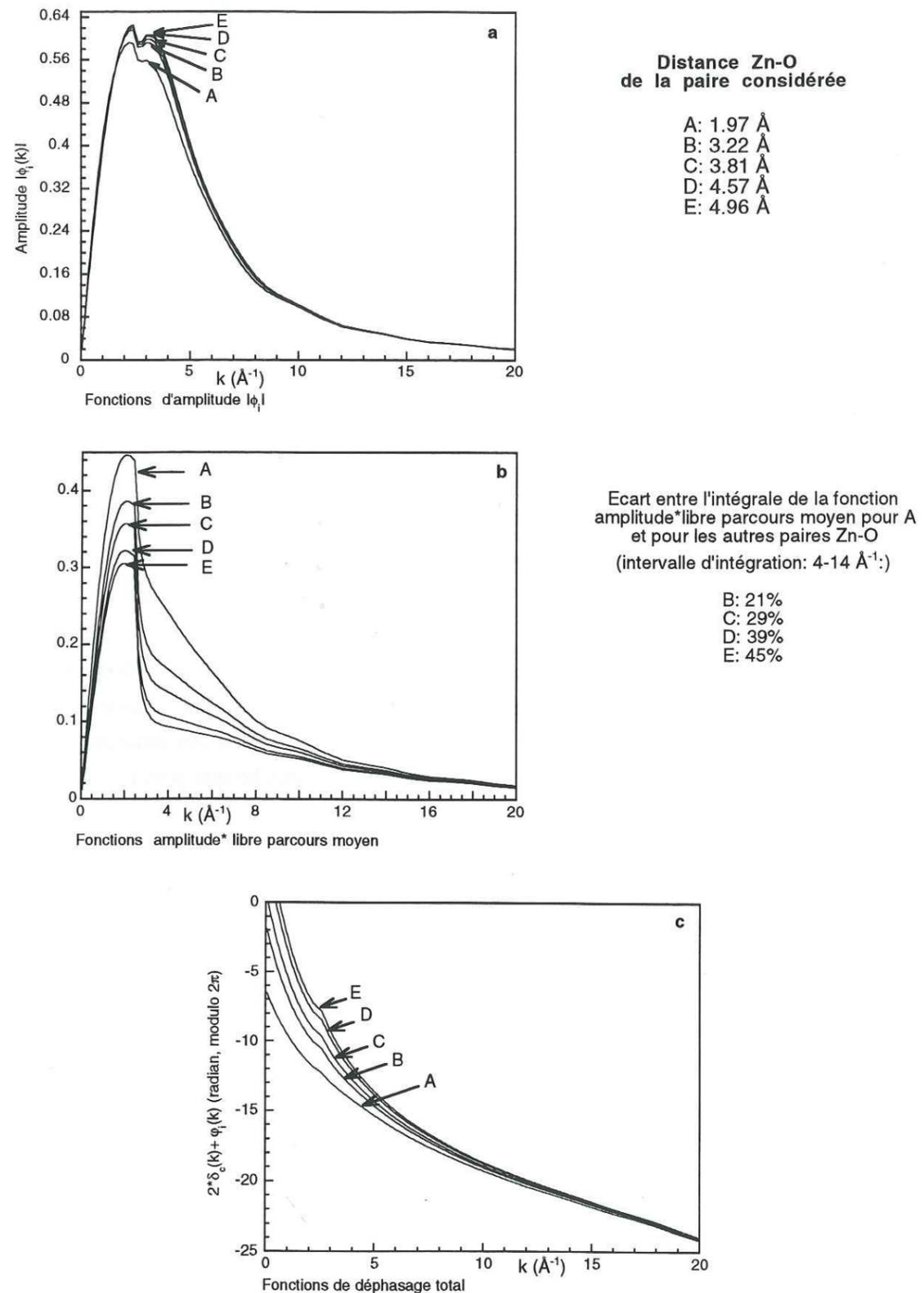


Figure I-6: Comparaison des fonctions d'amplitude et déphasage calculées par FEFF pour différentes paires Zn-O du monoxyde de zinc

Les fonctions de déphasage se décalent verticalement à bas  $k$  quand  $R$  augmente (Fig. I-6c). Nous avons calculé les fonctions de déphasage pour d'autres composés du plomb (PbO) et d'autres métaux comme Fe (pyrite), ce phénomène semble général. On ignore la cause physique de ce phénomène, qui n'est pas observé avec les fonctions de McKale (Fig. I-4d). Au cours des ajustements, cette différence est compensée par le décalage en énergie  $\Delta E$ . Par exemple, pour la simulation de la structure ZnO,  $\Delta E = 5$  eV pour la première couche d'oxygène à 1.98 Å, et 9 eV pour la quatrième couche à 4.57 Å.

• *Paire plomb-oxygène*

La figure I-7 compare les fonctions d'amplitude et de déphasage total pour la paire Pb-O dans différents composés. On observe, de la même façon que pour la paire Zn-O, une dépendance en fonction de l'environnement atomique. La figure I-8 montre les mêmes évolutions des fonctions d'amplitude et de déphasage pour la paire Pb-O en fonction de  $R$  que pour la paire Zn-O, et on retrouve en particulier le décalage vertical de la fonction de déphasage à bas  $k$ .

• *Conclusion*

Ces comparaisons montrent que les résultats obtenus avec les fonctions McKale et FEFF sont très proches. Cependant, McKale ne fournit pas la fonction de libre parcours moyen, qui doit être déterminée à partir d'une structure connue. La transférabilité des fonctions d'amplitude\*libre parcours moyen et de déphasage pour une même couche de coordination est possible si les deux composés ont des structures proches. Par contre, on ne peut pas transférer ces fonctions d'une couche atomique à une autre si les distances interatomiques sont notablement différentes. Les fonctions FEFF présentent l'avantage d'être calculées pour un cluster donné, par contre on observe à bas  $k$  un décalage vertical anormal des fonctions de déphasage. La précision sur  $N$  et  $R$  est de 10% et 0.01 Å si on utilise des fonctions d'amplitude, de libre parcours moyen et de déphasage appropriées, mais dans le cas contraire la précision peut diminuer de façon dramatique. Au cours de ce travail, nous avons utilisé des fonctions expérimentales et, à défaut, des fonctions calculées par FEFF pour la structure étudiée.

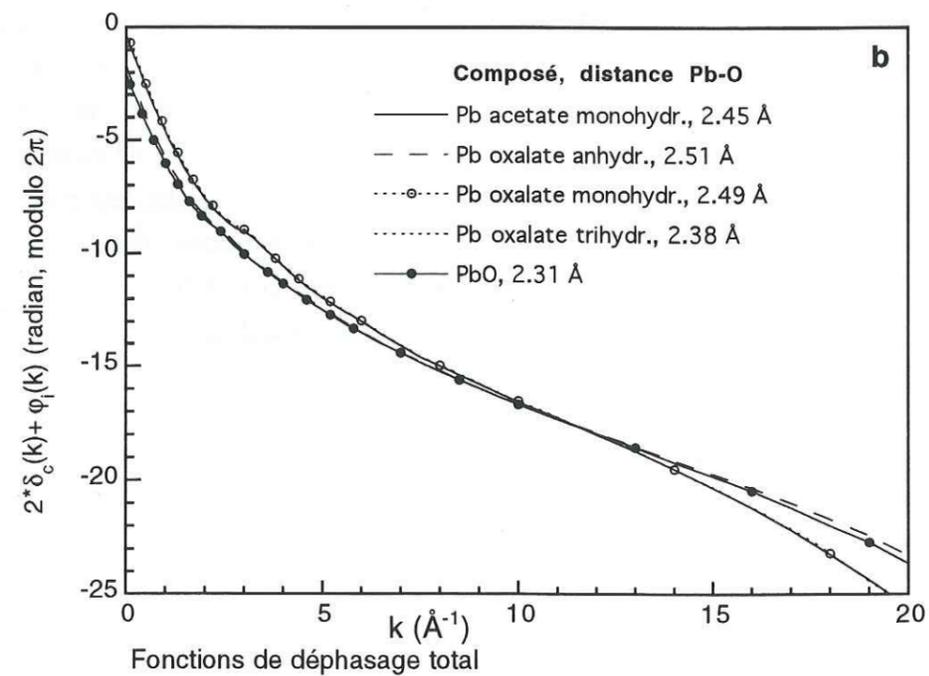
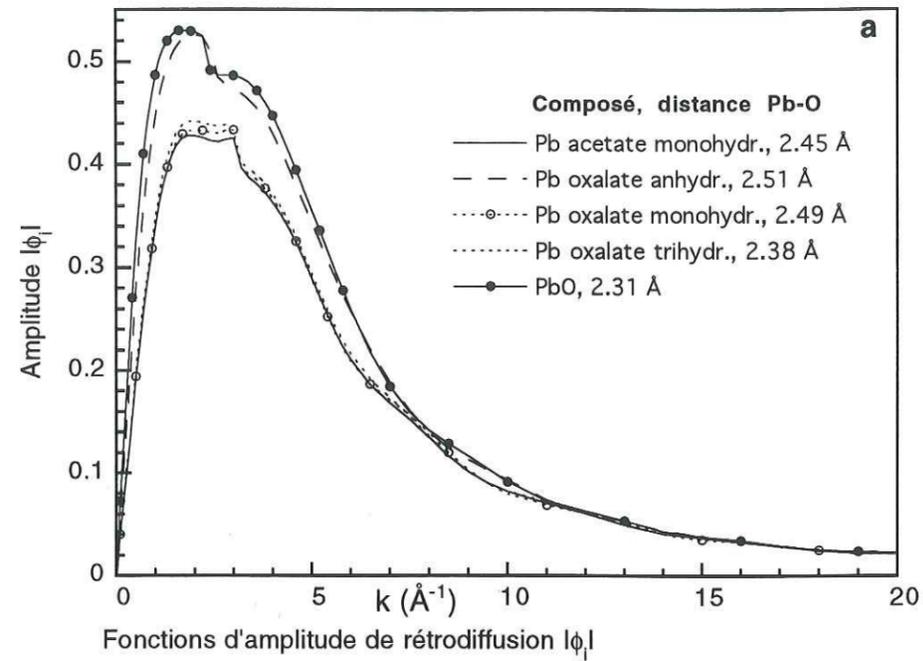


Figure I-7: Fonctions d'amplitude et de déphasage calculées par FEFF pour la paire Pb-O dans différents composés du plomb

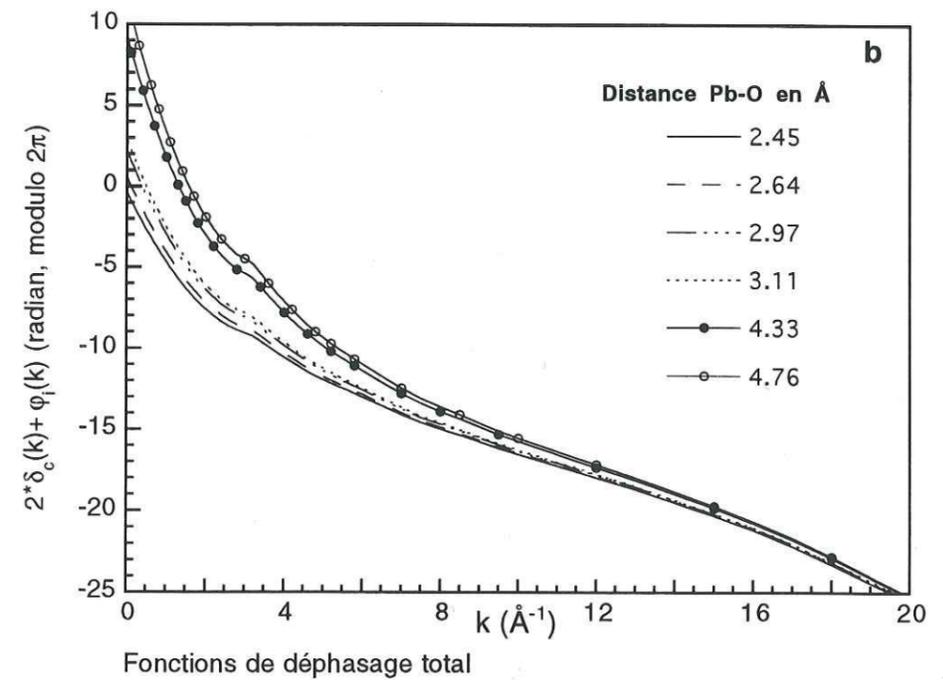
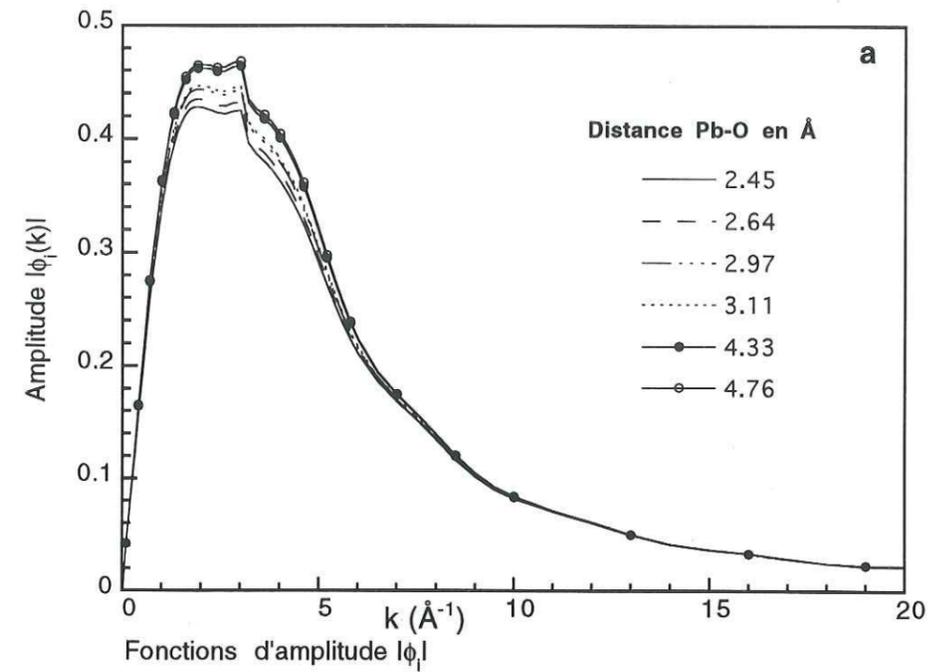


Figure I-8: Fonctions d'amplitude et de déphasage calculées par FEFF pour les paires Pb-O de l'acétate de plomb trihydrate

### 1.4.2.3. Calcul en diffusion simple

Le programme de simulation numérique utilise l'algorithme de minimisation par les moindres carrés. Les paramètres ajustés sont  $N$ ,  $R$ ,  $\sigma$ . Si on utilise des fonctions expérimentales,  $\lambda$  et  $\Delta E$  sont fixés à  $\lambda_{\text{exp}}$  et 0 respectivement. Si on utilise des fonctions FEFF, les  $\Delta E$  pour chaque couche sont déterminés à partir de la simulation de composés de référence. Il faut noter que certains paramètres sont fortement corrélés entre eux:  $N$ ,  $\lambda$ ,  $\sigma$  d'une part, et  $R$  et  $\Delta E$  d'autre part. Le programme de minimisation peut fournir plusieurs solutions, on élimine celles sans signification physique ( $M_2$ , Fig. I-9) vers lesquelles le programme peut éventuellement converger.

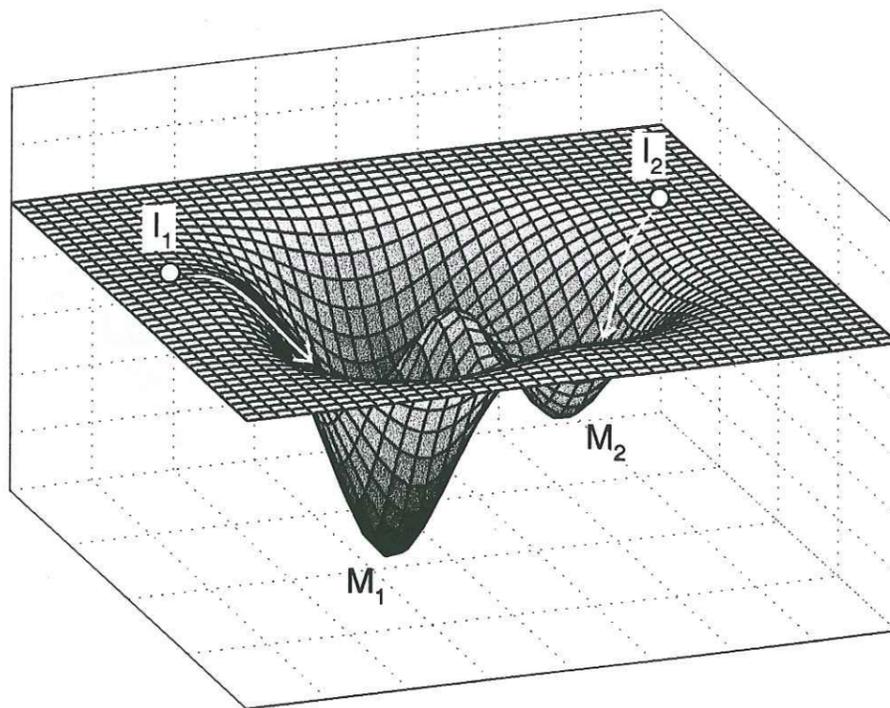


Figure I-9: Minima de la fonction « $\square$  somme des carrés des écarts  $\square$ »

### 1.4.2.4. Calcul en diffusion multiple

Pour certains arrangements atomiques, par exemple lorsque les atomes sont alignés, la diffusion multiple n'est pas limitée à bas  $k$ , mais affecte l'ensemble du spectre EXAFS. L'analyse en diffusion simple s'avère alors insuffisante. A l'heure actuelle, FEFF7 ne permet pas d'affiner une structure en prenant en compte la diffusion multiple. Ce programme permet seulement de quantifier les effets de la diffusion multiple pour une structure donnée. En pratique, on ajuste les sigmas pour les différents chemins afin d'obtenir le meilleur accord possible entre le spectre

calculé et le spectre expérimental. On détermine ainsi l'importance relative des différents chemins (voir annexe).

## I.5. MISE EN OEUVRE EXPERIMENTALE

### I.5.1. Le rayonnement synchrotron

Le rayonnement synchrotron est une radiation électromagnétique émise par des électrons ou positrons se déplaçant à des vitesses ultra-relativistes le long d'une trajectoire circulaire à grand rayon de courbure (dans la suite, on parlera uniquement d'électrons pour simplifier). Ce type de rayonnement tient une place prépondérante dans de nombreux domaines scientifiques, grâce d'une part à sa très large distribution spectrale (depuis le proche infrarouge jusqu'aux rayons X durs, *i.e.*, de quelques eV à  $10^5$  eV) et d'autre part à l'intensité du flux de photons délivré [26]. Les électrons sont introduits dans l'anneau de stockage qui est maintenu sous ultravide. Différents modes de remplissage de l'anneau sont possibles: soit les électrons occupent toute une partie de l'anneau, soit ils sont répartis en un ou plusieurs paquets isolés. Un système de radiofréquence permet de leur redonner l'énergie qu'ils ont perdue lors de l'émission de la radiation synchrotron. Le rayonnement est émis au niveau des aimants de courbures ou des éléments d'insertion (onduleurs ou wigglers). Les wigglers sont utilisés pour produire un flux élevé sur une large gamme spectrale, les onduleurs délivrent un faisceau d'une très grande brillance mais dans un domaine énergétique assez restreint. Chaque source de lumière est caractérisée par son énergie critique d'émission et son flux de photons en fonction de l'énergie. Ces paramètres dépendent de l'énergie des électrons dans l'anneau (6 GeV à l'ESRF, 1.85 à DCI) et des caractéristiques de l'aimant (Fig. I-10).

Les expériences en transmission ont été effectuées au LURE sur la ligne EXAFS 1, celles en fluorescence à SRS (Daresbury, GB) sur la ligne wiggler 9.2 pour les échantillons moyennement dilués, et à l'ESRF sur la ligne CRG/IF située sur l'aimant de courbure BM32 pour les plus dilués.

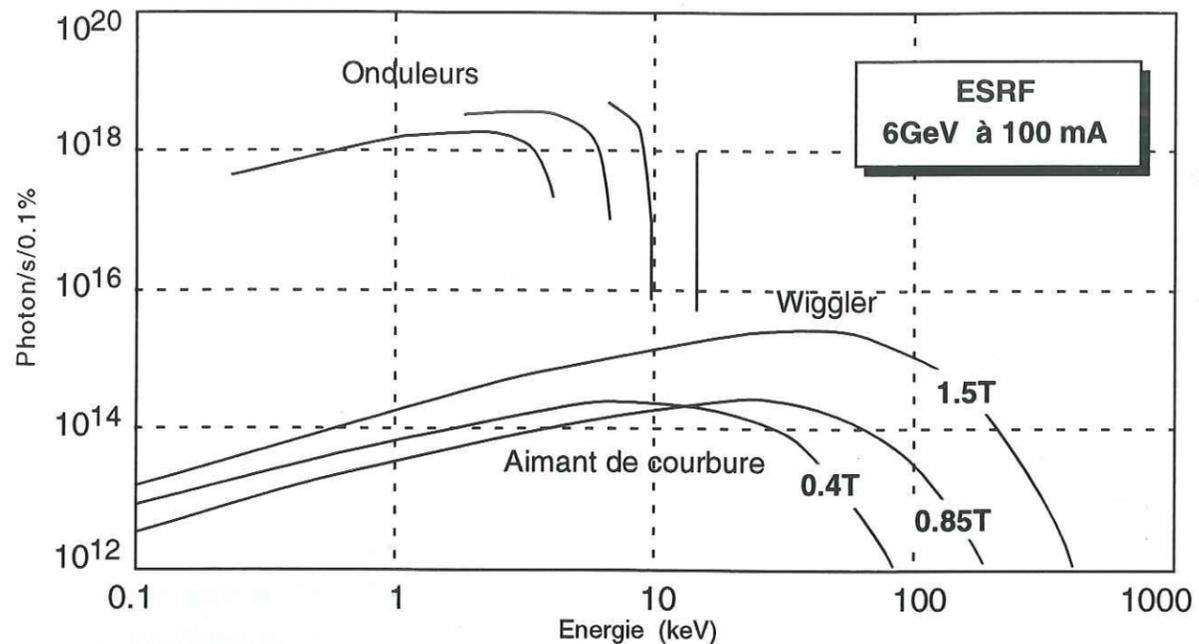


Figure I-10: Comparaison des flux délivrés à l'ESRF par les différents aimants

I.5.2. Configurations de la ligne de lumière

Une ligne de lumière est classiquement composée d'un monochromateur (double cristal de silicium) qui permet de sélectionner une longueur d'onde selon la loi de Bragg à partir du faisceau blanc, d'un ou plusieurs miroirs pour rejeter les longueurs d'onde harmoniques, de fentes verticales et horizontales pour collimater le faisceau, d'un détecteur I<sub>0</sub> (chambre à ionisation ou diode), et d'un détecteur I. En mode de transmission, le détecteur est une chambre à ionisation ou une diode, en mode de fluorescence c'est un photomultiplicateur ou un détecteur résolu en énergie. La figure I-11 montre le dispositif en mode de transmission.

Le monochromateur de la ligne BM32 de l'ESRF est équipé d'un courbeur sur le second cristal, qui permet de focaliser sagittalement le faisceau. La largeur du faisceau focalisé est de quelques centaines de microns. Cela permet (1) l'utilisation de la totalité du flux, le faisceau n'étant pas tronqué par les fentes, (2) l'étude d'échantillons de petite taille, (3) une bonne résolution spatiale sur l'échantillon. En contrepartie, la mesure est plus sensible aux inhomogénéités de l'échantillon. Ces derniers doivent donc être aussi homogènes que possible. Les poudres sont broyées, tamisées, puis pressées sous forme de pastilles du type de celles utilisées en spectroscopie infrarouge. Le détecteur de fluorescence utilisé est un détecteur au germanium résolu en énergie comprenant 15 éléments (Canberra). Le taux de comptage est de 1 à 3 millions de photons/s selon le mode de remplissage de l'anneau. La ligne est également équipée d'un cryostat à hélium permettant l'enregistrement des spectres à 10K.

I.6. LA SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION X APPLIQUEE AUX ECHANTILLONS NATURELS

Les échantillons naturels ou biologiques sont généralement des systèmes hétérogènes, polymétalliques, peu ou mal cristallisés, et qui sont le siège d'équilibres physico-chimiques dynamiques entre la phase solide et la solution. Les concentrations en métaux sont très variables, de l'état d'«éléments traces» jusqu'à plusieurs % pour certains sols contaminés ou certains végétaux hyperaccumulateurs. Une information structurale sur l'état des métaux, en plus des données apportées par l'étude chimique, est indispensable pour caractériser précisément le système. L'apport de la diffraction X à l'étude de ces systèmes dépend fortement de la cristallinité des composés. Si celle-ci est faible, les pics de diffraction sont larges, peu intenses, et noyés dans le signal de la phase amorphe. Cette méthode n'est donc pas applicable à tous les échantillons. La plupart des autres méthodes spectroscopiques non métallospécifiques (infrarouge, RMN de l'hydrogène ou du carbone) fournissent un signal dont l'interprétation est parfois délicate, et pas toujours quantitative. La spectroscopie d'absorption X possède de nombreux atouts qui en font un bon candidat pour l'étude de ces systèmes naturels. Elle permet

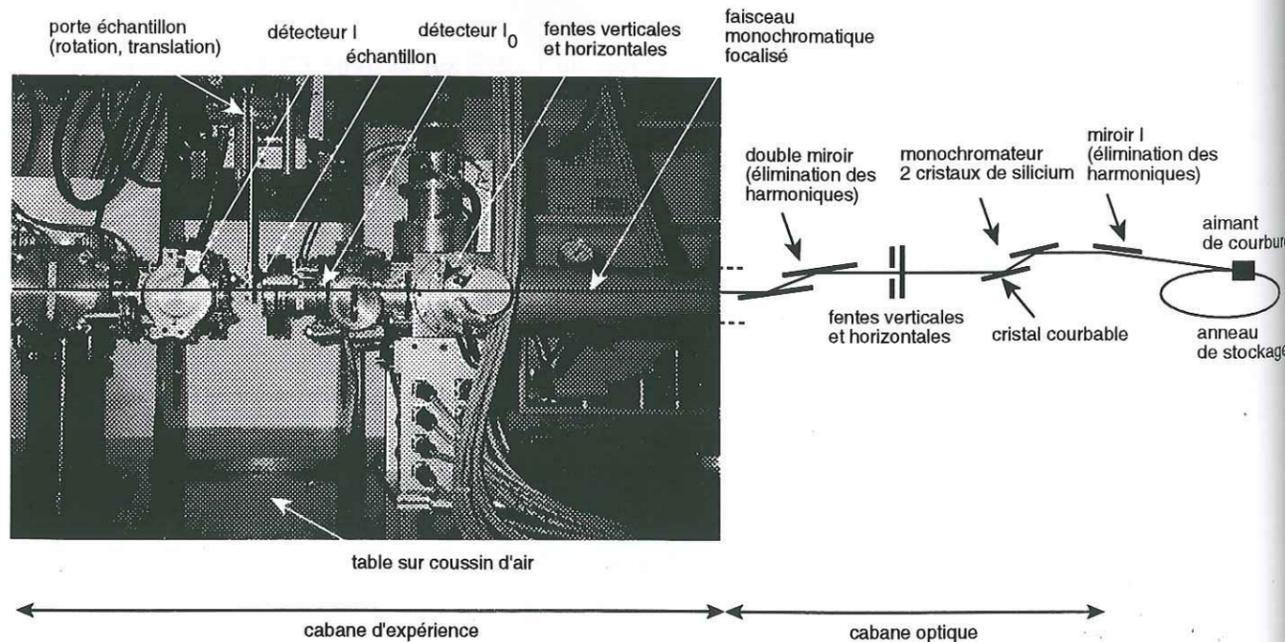


Figure I-11: Dispositif expérimental de la ligne D32 de l'ESRF en mode de transmission

une étude de l'échantillon non perturbé (sauf cas rare de composés photosensibles). C'est une sonde locale et spécifique, *i.e.*, sensible à l'environnement à courte distance, dans un rayon de 4-5 Å environ autour du métal cible. La limite de détection actuelle est de 100 à 500 mg/Kg selon la nature du métal étudié et la composition chimique de la matrice. Cette méthode est utilisée depuis le début des années 80 pour l'étude d'échantillons inorganiques naturels, et depuis 1995 pour l'étude des végétaux [12, 27-29].

L'étude des complexes métal-composés organiques par spectroscopie d'absorption X présente certaines spécificités: Les atomes qui constituent l'environnement du métal (O, C, N, S, P) ont des numéros atomiques faibles et voisins. De plus, les arrangements atomiques sont en général plus désordonnés que dans le cas des minéraux. Tous ces facteurs concourent à produire un signal EXAFS de faible amplitude. Dans ce cas, l'analyse classique par simulation numérique peut être délicate au-delà de la première sphère de coordination. L'approche par comparaison avec des spectres de composés modèles, appelés encore «standards» peut alors s'avérer très pertinente. Cette démarche était classiquement utilisée pour l'analyse de la partie XANES, pour laquelle le formalisme est plus complexe et n'a été développé que très récemment. Grâce à l'unicité de la signature spectrale de chaque composé, cette démarche analytique permet d'obtenir rapidement et simplement des informations assez précises sur des systèmes inconnus. Elle nécessite l'acquisition préalable d'une base de données exhaustive des spectres EXAFS des composés possibles pour chaque métal.

La spectroscopie d'absorption X rencontre cependant certaines limitations dans l'étude des systèmes naturels:

- Les signaux des différents éléments présents dans la matrice peuvent interférer, selon la position de leurs seuils d'absorption. Par exemple, nous avons étudié le plomb au seuil  $L_{III}$  (13055 eV) dans le lichen *Xanthoria parietina*. Or, il se trouve que ce lichen contient également du brome dont le seuil K est à 13473 eV. A cette énergie, une partie des photons incidents sont absorbés par le brome, ce qui constitue un déficit de photons incidents pour le plomb. Par conséquent, le nombre de photons de fluorescence émis par les atomes de plomb diminue. Si le détecteur n'est pas résolu en énergie, il comptabilise les photons de fluorescence du plomb et du brome. Comme le rendement de fluorescence de ces deux éléments n'est pas le même, on observe un décrochement du spectre EXAFS, et en plus le signal provenant des atomes de plomb est brouillé par les oscillations dues au brome. Si le détecteur est résolu en énergie, seule la fluorescence du plomb est comptabilisée, mais on observe aussi un décrochement du spectre EXAFS du à la diminution du nombre de photons de fluorescence provenant du plomb. Dans les deux cas, les oscillations EXAFS au-delà de  $10 \text{ \AA}^{-1}$  environ sont masquées par le seuil du brome (Fig. I-12).

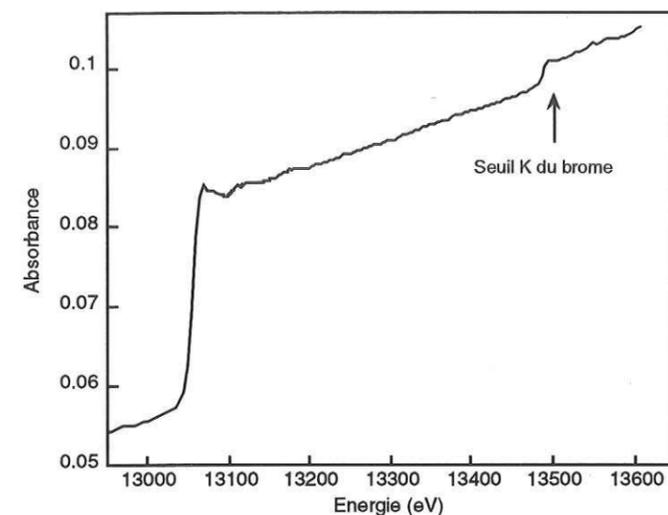


Figure I-12: Spectre EXAFS du lichen *Xanthoria parietina* au seuil  $L_{III}$  du plomb

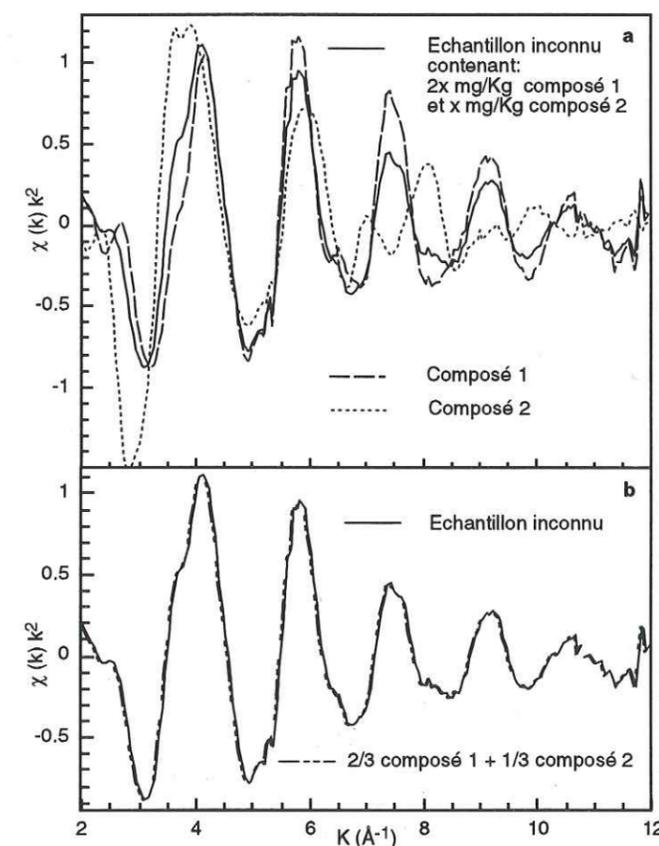


Figure I-13: Spectre EXAFS brut et normalisé d'un échantillon contenant deux composés de zinc

La spectroscopie d'absorption X fournit une information sur l'environnement *moyen* du métal dans un échantillon. Si un échantillon inconnu contient deux composés de zinc, le spectre EXAFS enregistré peut être décrit comme la somme pondérée des spectres de chaque composé (Fig. I-13a, b). Si la concentration du composé 1 est deux fois plus grande que celle du composé 2, on a:

$$\chi_{\text{échantillon inconnu}} = 2/3 \chi_{\text{composé 1}} + 1/3 \chi_{\text{composé 2}}$$

Evidemment, en pratique on n'a pas accès directement à ces deux spectres. Pour déterminer la spéciation du zinc dans l'échantillon, il faut les retrouver à partir de  $\chi_{\text{échantillon inconnu}}$ .

Trois conséquences peuvent être tirées de ce constat:

- Le signal des phases minoritaires (<10%) est difficile à percevoir et à analyser, car l'amplitude de leur contribution est très faible.
- Les phases désordonnées, dont l'amplitude est plus faible que les autres, sont moins facilement identifiables et risquent d'être sous-estimées. La figure I-14 compare le spectre EXAFS normalisé de l'oxalate de zinc dihydrate à celui de l'acétate de zinc dihydrate. Le premier composé possède une structure très ordonnée avec deux oxalates chélatants symétriques, la distribution des distances est faible. Par contre, l'arrangement du deuxième composé est moins ordonné, et la distribution de distance est plus grande. En conséquence, on observe une nette diminution d'amplitude du spectre EXAFS entre l'oxalate et l'acétate. On a comparé des combinaisons linéaires de ces deux composés: CL1 contient 80% d'oxalate + 20% d'acétate, CL2 contient 80% d'acétate + 20% d'oxalate. La contribution de l'oxalate dans les combinaisons linéaires a beaucoup plus d'influence sur le spectre final que celle de l'acétate: CL2 est décalée en fréquence par rapport au spectre de l'acétate de zinc dihydrate, alors que CL1 n'est pas décalée par rapport au spectre de l'oxalate de zinc dihydrate.
- De même, les spectres des phases organiques ont une amplitude faible par rapport aux phases minérales, car l'environnement du métal cible est constitué exclusivement d'atomes légers (C, O, N, S), dont l'amplitude de rétrodiffusion est faible. Ces phases sont donc sous-estimées par rapport aux phases minérales. Ainsi, la figure I-15 montre une nette différence d'amplitude entre le spectre de ZnO et celui de l'acétate de zinc dihydrate. Soit la combinaison linéaire CL1 contenant 80% de ZnO + 20% Zn acétate dihydrate. Supposons que CL1 soit le spectre d'un échantillon inconnu. Si, au vu de la grande similitude avec le spectre de ZnO et de son amplitude légèrement plus faible, on estime que dans cet échantillon inconnu, 85% du zinc est sous forme ZnO (composé n°1), on commet une erreur de 5% seulement. Si on cherche alors à déterminer la forme chimique des 15% de zinc restants (composé n°2), on peut le faire par différence:

$$\text{composé n}^\circ 2 = (\text{CL1} - 0.85 * \text{ZnO}) / 0.15$$

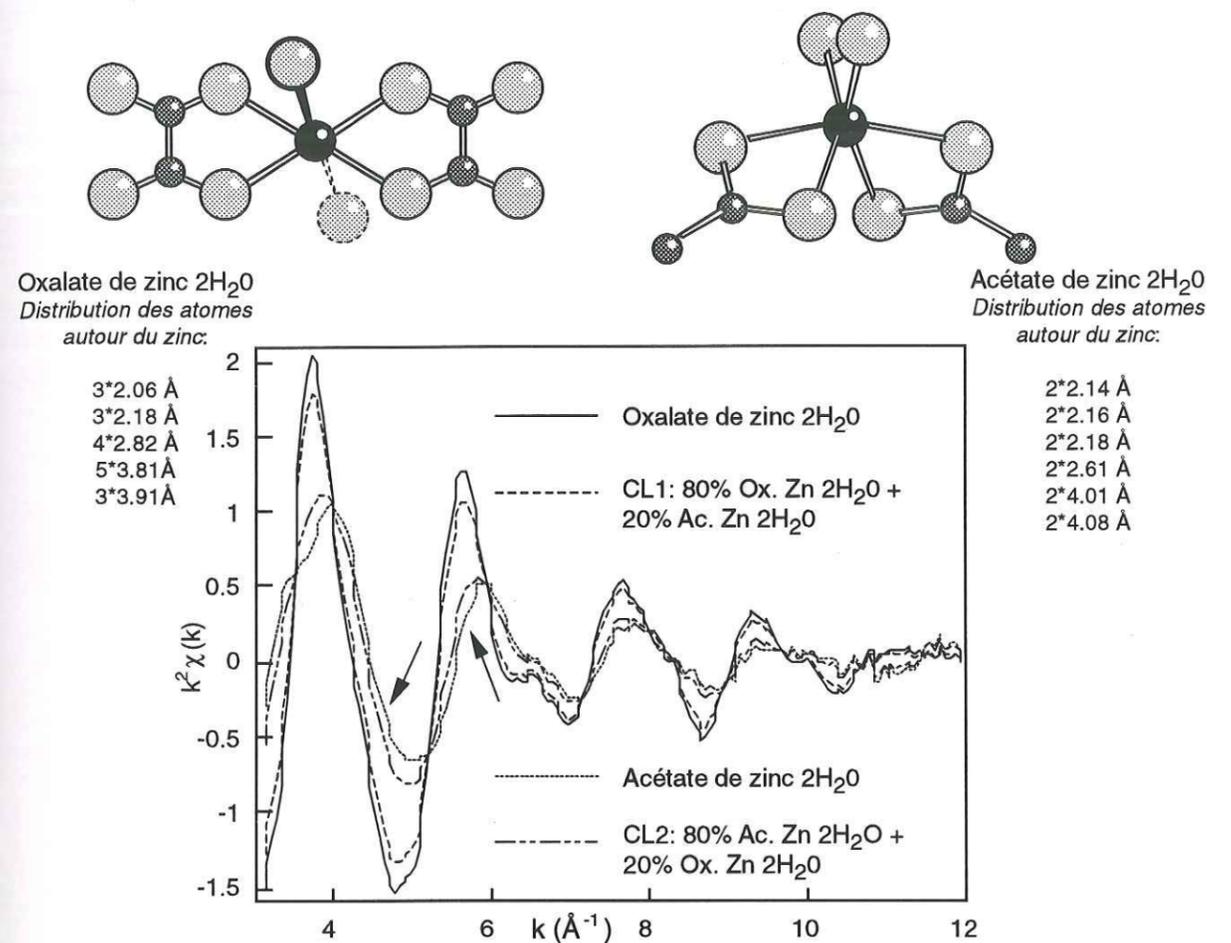


Figure I-14: Influence du désordre de la structure sur l'amplitude du spectre

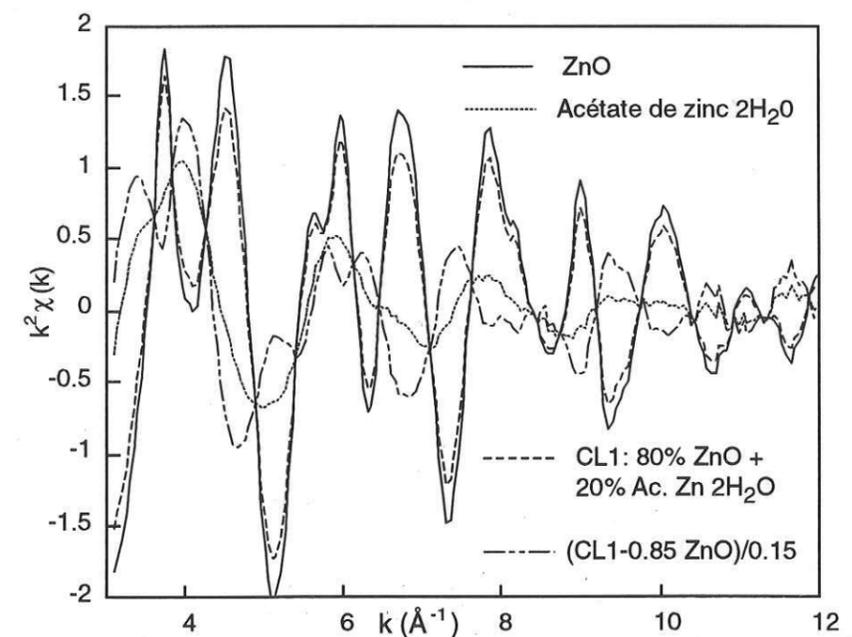


Figure I-15: Difficulté d'identification d'une phase organique minoritaire

On obtient alors un spectre nettement différent de celui de l'acétate de zinc. L'erreur de 5% sur le premier composé est donc fortement amplifiée si le deuxième composé est minoritaire. Ainsi, l'identification de ce dernier sera délicate.

Dans le cas d'échantillons naturels, l'EXAFS fournit une information structurale très précise sur les phases majoritaires, et beaucoup moins sur les phases minoritaires.

## **CHAPITRE II.**

### **CHIMIE DE COORDINATION DU ZINC ET DU PLOMB**

## CHAPITRE II. CHIMIE DE COORDINATION DU ZINC ET DU PLOMB

### II.1. INTRODUCTION

Dans les molécules organiques, les principaux ligands des éléments métalliques sont les groupements carboxyle (COOH), hydroxyle (OH), sulfhydryle (SH), phosphoryle ( $\text{PO}_4\text{H}_3$ ), et amine ( $\text{NH}_2$ ), appartenant à des chaînes aliphatiques ou aromatiques. La sphère de coordination d'un métal lié à ce type de composé est donc constituée exclusivement d'atomes légers (C, O, N, S, P), dont l'amplitude de rétrodiffusion est faible. En conséquence, les oscillations EXAFS pour de tels composés étant de faible amplitude et s'amortissant rapidement (en général, on n'observe plus d'oscillations au-delà de  $14 \text{ \AA}^{-1}$ ), les spectres des composés organiques contiennent généralement moins d'informations structurales que ceux des composés minéraux. De plus, les atomes C, O, N d'une part, et P, S d'autre part possèdent des numéros atomiques proches. Il n'est donc pas possible de les différencier par cette méthode. Dans ces conditions, il est important d'évaluer la sensibilité de l'EXAFS pour les composés organiques, objet de cette étude: Jusqu'à quelle distance peut-on obtenir des informations structurales ? Dans quelle mesure peut-on différencier les atomes, les groupes fonctionnels et les chaînes carbonées où sont fixés ces ligands ? Lorsqu'on ne peut déterminer précisément la nature des atomes, la connaissance des seuls paramètres distances interatomiques  $R$  et nombre de voisins  $N$  est-elle suffisante pour identifier les ligands ? Pour répondre à ces questions, nous allons étudier quelques composés minéraux et organiques simples du zinc et du plomb. Ces composés ont été choisis afin de représenter le plus grand nombre d'environnements des métaux, en fonction de la nature des ligands et de leur arrangement. La base de donnée ainsi constituée sera utilisée par la suite pour l'étude de systèmes plus complexes.

### II.2. LE ZINC

#### II.2.1. Quelques généralités sur la chimie de coordination du zinc

La figure II-1 présente les distributions atomiques radiales autour du zinc pour quelques composés minéraux et organiques, classés par nombre de coordination (CN) croissant. Du fait de sa configuration électronique  $3d^{10} 4s^2$ , les orbitales 3d ont tendance à être symétriques, et les polyèdres de coordination sont généralement réguliers [30]. Il n'y a pas de géométrie privilégiée comme c'est le cas pour le cuivre divalent dont les polyèdres sont très asymétriques du fait de l'effet Jahn-Teller. La diversité des structures des polyèdres de coordination du zinc explique

que ce métal soit le deuxième élément après le fer en terme de quantité présente dans les organismes vivants, agissant le plus souvent comme cofacteur d'enzymes [31]. Le zinc est le plus souvent en coordination tétraédrique ou octaédrique, plus rarement en coordination 5. Cette simplicité des arrangements atomiques fait que pour un type d'environnement ou de ligand donné, les distances interatomiques sont faiblement dispersées. Par exemple en coordination tétraédrique les distances Zn-O sont comprises entre 1.90 et 2.00 Å, avec une moyenne de 1.95 Å (Fig. II-1). En coordination octaédrique, elles sont comprises entre 2.00 et 2.20 Å, avec une moyenne de 2.10 Å. Ce constat montre qu'il est possible de déterminer la coordination du zinc uniquement sur la base des distances Zn-O et sans connaître *N*. Ceci est très utile dans le cas de composés chimiquement et structuralement complexes comme les substances humiques, où la diversité des ligands est une source de désordre, qui diminue la précision sur *N*. La figure II-1 montre que le zinc est le plus souvent en coordination tétraédrique dans les composés anhydres, et en coordination octaédrique dans les composés hydratés.

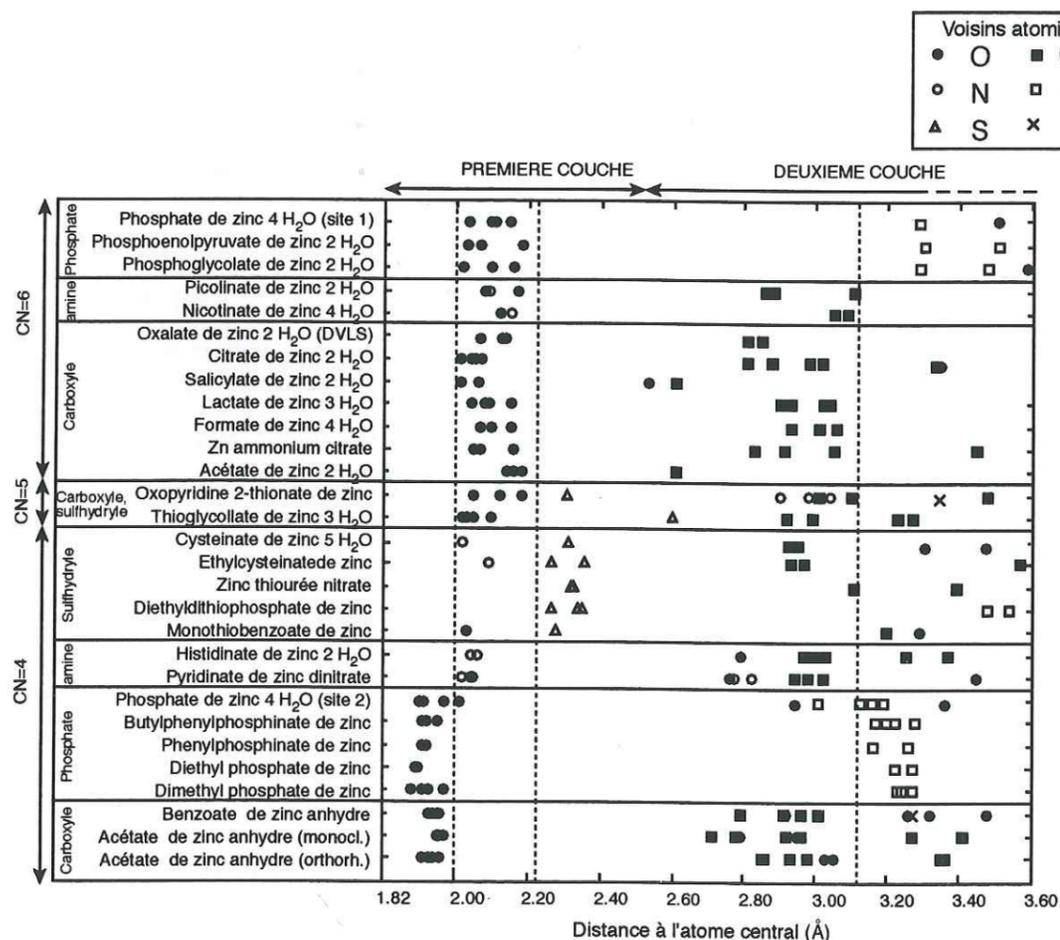


Figure II-1: Distribution radiale des voisins atomiques du zinc pour quelques composés

Les distances Zn-S sont supérieures de 0.2 à 0.3 Å environ aux distances Zn-O. Cela s'explique par la différence de rayon ionique entre S (1.84 Å) et O (1.26 Å) [32, 33]. De même  $\langle d(\text{Zn-P}) \rangle$

est supérieure à  $\langle d(\text{Zn-C}) \rangle$ . Par contre, les distances Zn-N se confondent avec les distances Zn-O, ces deux atomes ne peuvent être différenciés. La figure II-1 montre donc que dans le cas du zinc, l'EXAFS permet de différencier les ligands carboxyle + hydroxyle + amine des ligands phosphoryle et sulfhydryle. Notons que les analyses chimiques peuvent compléter de façon appréciable les résultats EXAFS, pour permettre de trancher entre carboxyle + hydroxyle et amine. Il est aussi possible de bloquer chimiquement certains types de groupements (estérification des carboxyles, par exemple) pour étudier sélectivement chaque ligand [34].

## II.2.2. Etude EXAFS de quelques composés de référence

### II.2.2.1. Composés minéraux

Nous avons choisi comme références minérales le monoxyde de zinc car il possède une première couche d'oxygène tétraédrique,  $\text{Zn}^{2+}$  en solution aqueuse pour sa première couche d'oxygène octaédrique, la sphalérite pour sa première couche de soufre tétraédrique, et l'hopéite pour sa deuxième couche contenant du phosphore. La figure II-2 présente les fonctions de distribution radiale de ces composés de référence, et le tableau II-1 les paramètres structuraux déterminés par diffraction des rayons X, et par EXAFS pour  $\text{Zn}^{2+}$  en solution aqueuse, en négligeant la diffusion multiple.

Tableau II-1: Paramètres structuraux de quelques références minérales

Composé	méthode	Première couche			Deuxième et troisième couche		
		atome	R (Å)	N	atome	R (Å)	N
$\text{ZnO}^1$	DRX	O	1.98	3	Zn	3.21	6
		O	1.99	1	Zn	3.25	6
$\text{Zn}^{2+}_{\text{aq}}^2$	EXAFS	O	1.94-2.17	6	Zn	4.57	6
		O	2.12	6	O	4.57	6
Hopéite <sup>4</sup>	DRX	O	1.94	2	O	2.90	0.66
		O	2.04	1.33	P	3.16	3.33
		O	2.13	1.33	O	3.40	0.66
$\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2, 4\text{H}_2\text{O}$		O			Zn	3.40	1.33
Sphalérite <sup>5</sup> $\text{ZnS}$	DRX	S	2.34	4	Zn	3.83	12

<sup>1</sup> [35], <sup>2</sup> [36], <sup>3</sup> Pour cette simulation, nous avons utilisé des fonctions d'amplitude et de déphasage expérimentales, extraites à partir du spectre de  $\text{ZnO}$ ;  $\Delta\sigma = 0.00$  Å. <sup>4</sup> [37], <sup>5</sup> [38].

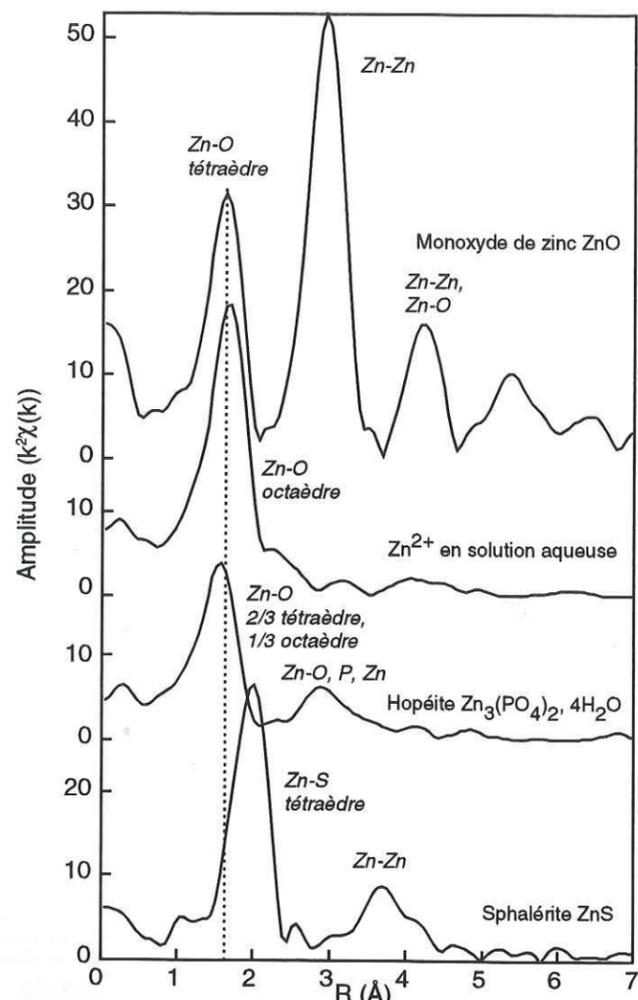
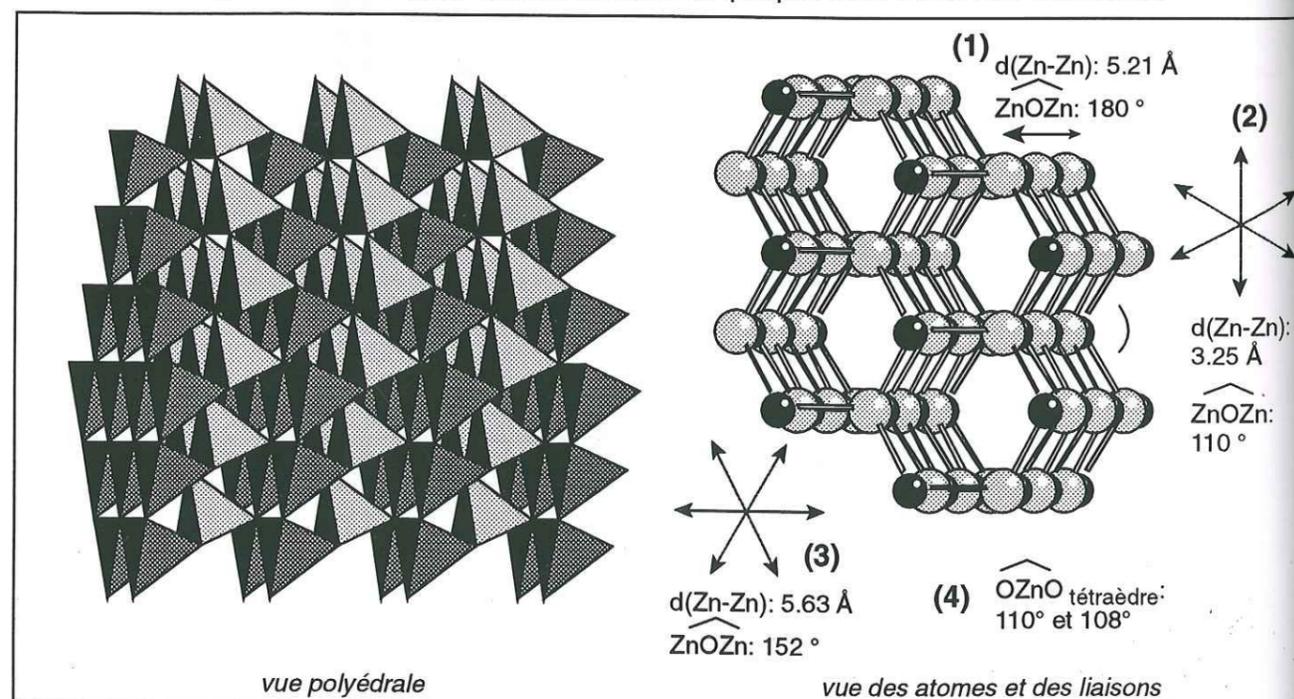


Figure II-2: Fonctions de distribution radiale de quelques minéraux de référence du zinc

Figure II-3: Structure de ZnO  
40

Le monoxyde de zinc est constitué de tétraèdres réguliers liés par leurs sommets (Fig. II-3). La structure présente des alignements d'atomes Zn et O alternés où chaque atome de zinc possède un voisin oxygène à 1.99 Å, et un autre oxygène diamétralement opposé à 3.21 Å (alignements (1) sur la Fig. II-3). La distance entre deux atomes de zinc suivant cette direction est de 5.20 Å. On observe d'autres familles d'alignements -Zn-O-, mais les oxygènes intercalaires sont légèrement (3) ou fortement (2) décalés par rapport à l'axe des atomes de zinc. Les phénomènes de diffusion multiple à l'intérieur du tétraèdre (4) ou des chaînes -Zn-O- de type 2 sont faibles car les angles (OZnO) et (ZnOZn) sont proches de 90°. La diffusion multiple au sein des trois premières couches de coordination est de faible intensité (Fig. II-2). Les fonctions d'amplitude et de déphasage pour la paire Zn-O ont été extraites à partir de la première couche de coordination. Par contre, la diffusion multiple au sein des chaînes de type 1 et 3 est non négligeable, et produit des contributions à grande distance (> 5.2 Å).

La figure II-2 montre que le premier pic de la FDR de  $Zn^{2+}$  en solution aqueuse est décalé par rapport à celui de ZnO. En effet, à pH 3, tout le zinc est sous forme  $Zn^{2+}$ , et solvaté par 6 molécules d'eau, la coordination est donc octaédrique [36]. La distance Zn-O déterminée par EXAFS pour cette couche d'eau d'hydratation est de 2.12 Å. La FDR de l'hopéite possède une amplitude très faible par rapport aux autres composés. Ceci provient d'un désordre structural important (Fig. II-2). En effet, le zinc occupe deux sites différents: 2/3 est en site tétraédrique, et 1/3 en site octaédrique. Dans le tableau II-1, les distances données sont la moyenne de ces deux sites. La distribution des distances est donc importante, la deuxième couche de coordination contient non seulement du phosphore, mais aussi de l'oxygène et du zinc. On ne peut donc pas extraire les fonctions d'amplitude et de déphasage pour la paire Zn-P à partir de cette référence. Le premier pic de la FDR de la sphalérite ZnS est très nettement décalé par rapport à celui des trois autres composés, dont la première couche de coordination est composée d'atomes d'oxygène. En effet, dans la sphalérite le zinc est lié à 4 atomes de soufre et  $\langle d(Zn-S) \rangle$  est supérieure de 0.3 Å environ à  $\langle d(Zn-O) \rangle$  des autres composés. Les atomes de soufre forment un tétraèdre régulier, il a donc été possible d'extraire les fonctions d'amplitude et de déphasage pour la paire Zn-S à partir de cette référence.

#### II.2.2.2. Composés organiques

Les composés organiques de référence ont été choisis de façon à couvrir le plus d'environnements possibles du zinc. Les ligands possèdent une chaîne aliphatique ou aromatique, les oxygènes liés au zinc appartiennent à des fonctions carboxyle (mono ou bidentate), alcool, ou à des molécules d'eau, les environnements sont soit tétraédriques, soit octaédriques. Les spectres EXAFS et les fonctions de distribution radiale de ces composés sont présentés figure II-4 et II-5.

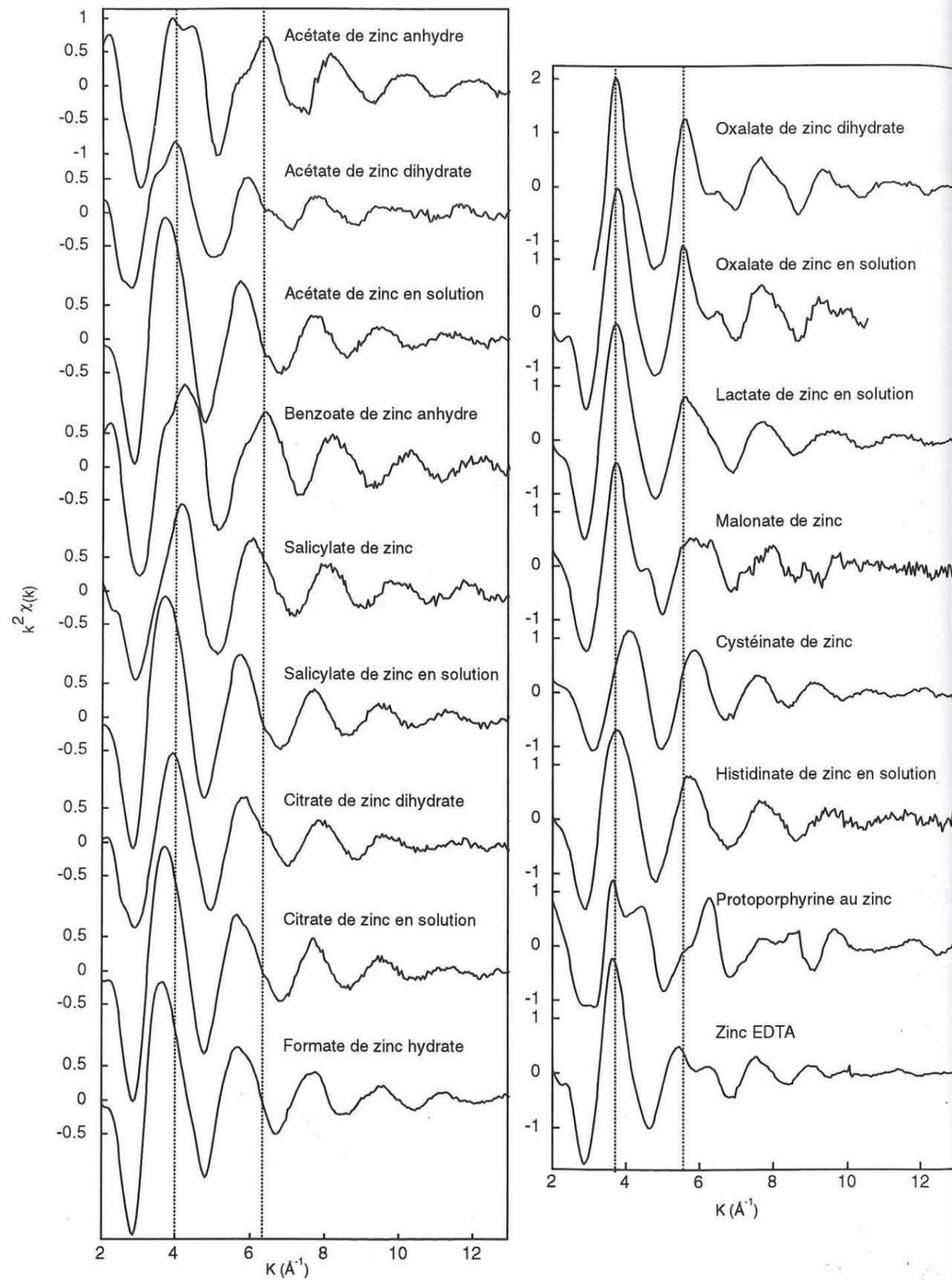


Figure II-4: Spectres EXAFS des composés organiques de référence du zinc

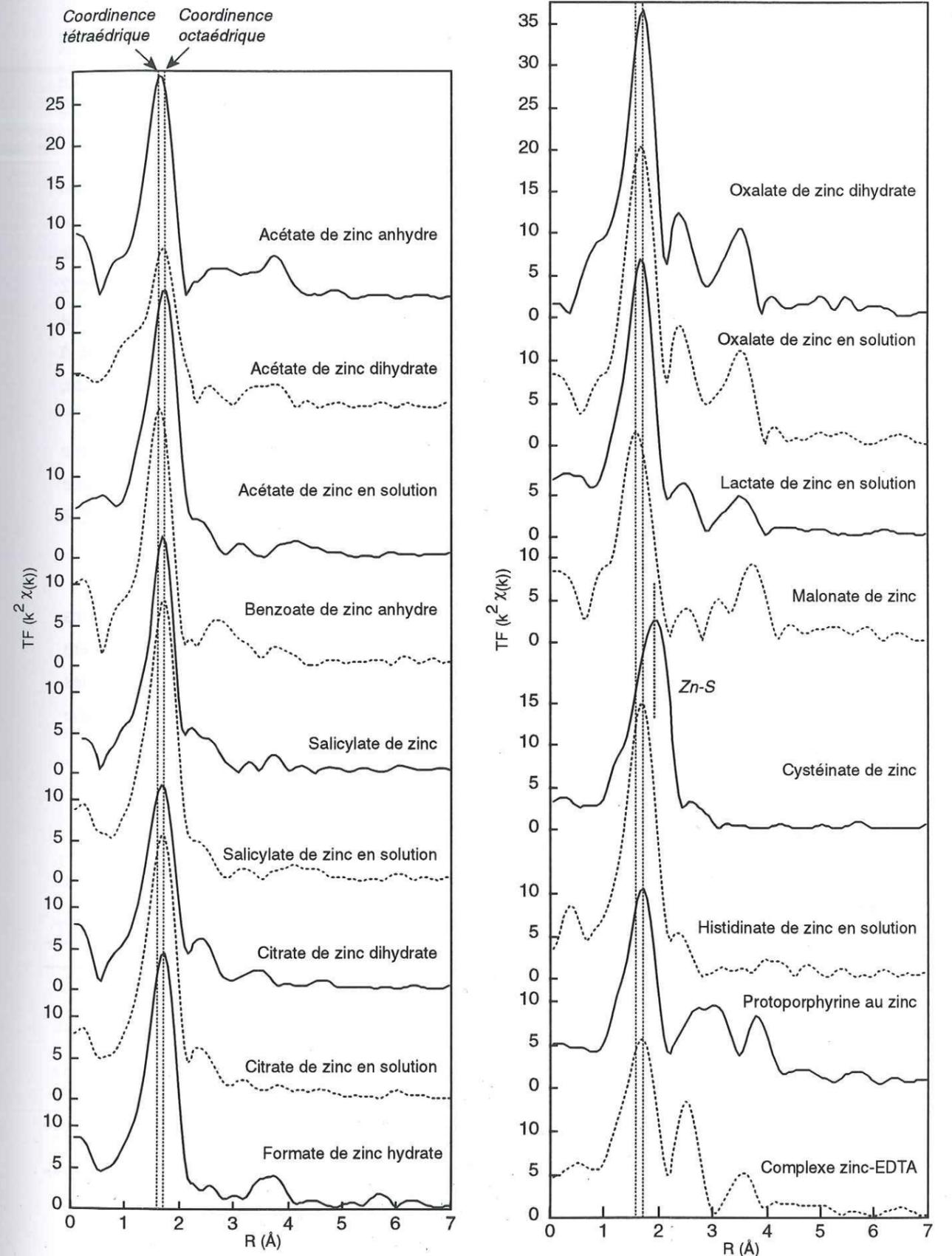


Figure II-5: Fonctions de distribution radiale des composés organiques de référence du zinc (bornes en  $k$ : 3.2-13  $\text{\AA}^{-1}$ ).

La grande diversité des arrangements atomiques se traduit par d'importantes différences en fréquence et en amplitude.

- **Fréquence:** On observe un décalage de 0.1 Å environ du maximum du premier pic de la FDR entre une coordinence 4 et 6. Le premier pic du complexe zinc-cystéine, qui correspond à un tétraèdre de soufre, est décalé de 0.2 Å par rapport à un pic d'oxygène en coordinence octaédrique.
- **Amplitude:** Pour une même coordinence, on observe d'importants écarts d'amplitude selon l'importance du désordre atomique. Comparons par exemple l'oxalate et le citrate de zinc dihydrates. L'amplitude des pics de la FDR est presque deux fois plus importante pour le premier composé. Dans l'oxalate de zinc dihydrate, le zinc est lié à 2 oxalates bidentates et 2 molécules d'eau (voir II.2.2.2.2), l'arrangement est particulièrement symétrique. La structure du citrate de zinc dihydrate n'est pas connue précisément, mais est comparable à celle du citrate de nickel dihydrate [39]. Le zinc est lié à une molécule de citrate tridentate, une autre monodentate, et 2 molécules d'eau. Les distances interatomiques de la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> couche sont fortement distribuées (Fig. II-1). Ainsi, le nombre d'atomes dans chaque couche de coordination est similaire dans les deux composés, mais leur arrangement dans l'espace est bien différent, ce qui explique la différence d'amplitude des spectres EXAFS et des FDR des deux composés.

La simple comparaison des spectres EXAFS et des FDR permet d'accéder à des informations structurales simples comme la coordinence ou la nature des atomes constitutifs de la première couche de coordination (O ou S). Nous allons maintenant étudier plus précisément le spectre des composés les plus caractéristiques de chaque type de ligand (aliphatiques, aromatiques, mono ou bidentates) afin de définir d'éventuels critères d'identification pour chaque type de ligand.

### II.2.2.2.1. Oxalate de zinc dihydrate

L'acide oxalique est un diacide carboxylique simple (formule chimique COOH-COOH), synthétisé par de nombreux organismes végétaux et animaux. Il est présent en plus ou moins grande quantité dans l'environnement (sols, plantes, eaux naturelles, etc...) et grâce à ses propriétés chélatantes, il peut jouer un rôle important dans l'altération des minéraux [40, 41], l'immobilisation [42] ou le transport des cations [43]. Cet acide présente donc un intérêt en soi, dans ce travail il sera aussi utilisé comme composé modèle de complexe à ligand diacide aliphatique.

Les sels d'oxalate de nombreux métaux (Fe, Mn, Co, Ni, Zn) ont des structures isomorphiques, constituées par des chaînes parallèles -(oxalate-métal)<sub>n</sub> [44] (Fig. II-6). Les positions atomiques de l'oxalate de zinc dihydrate déterminées par Deyrieux n'ont pas été jugées fiables à cause d'un désaccord entre les distances interatomiques déterminées par EXAFS et par

DRX. Par ailleurs, le calcul des valences de liaisons montre que les atomes de zinc sont sous-saturés (1.89 unités de valence au lieu de 2), et les atomes de C sursaturés (4.51 unités de valence au lieu de 4) (Tableau II-2). Nous avons donc effectué un nouvel affinement de cette structure à l'aide du code DVLS (Distance-Valence Least Squares, voir annexe 2). Les paramètres de maille déterminés par Deyrieux ont été conservés, seules les positions atomiques ont été ajustées. Les résultats sont reportés dans les tableaux II-2 et II-3.

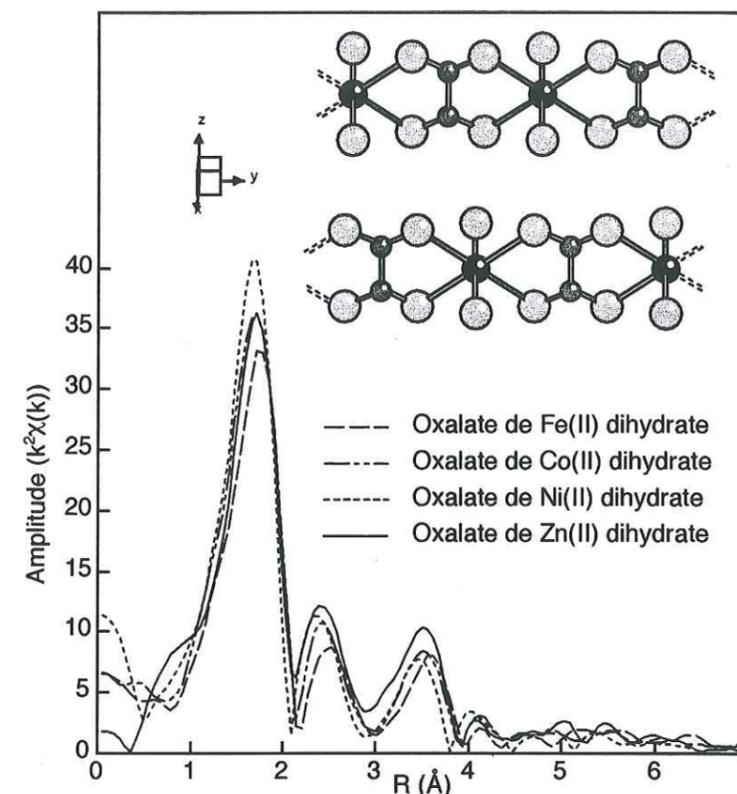


Figure II-6: Comparaison des fonctions de distribution radiale de sels métalliques d'oxalate dihydrates (bornes de la transformée de Fourier: 3.4-13.5 Å<sup>-1</sup>).

Tableau II-2: Valences de liaison de l'oxalate de zinc dihydrate

atome	avant affinement <sup>1</sup>				après affinement			
	x	y	z	$\sum_j s_{ij}$	x	y	z	$\sum_j s_{ij}$
Zn	0.000	0.175	0.250	1.89	0.000	0.127	0.250	1.98
C	0.047	0.676	0.348	4.51	0.016	0.622	0.345	4.02
Oa	0.086	0.483	0.421	2.03	0.086	0.438	0.416	1.99
Ob	0.086	0.866	0.421	2.09	0.072	0.815	0.415	1.99
O (H <sub>2</sub> O)	0.179	0.175	0.250	-	0.203	0.127	0.309	-

<sup>1</sup> [44].  $\sum_j s_{ij}$  est la somme des valences de liaisons de chaque atome, et est exprimée en unités de valence.

Tableau II-3: Distribution radiale autour du zinc dans l'oxalate de zinc dihydrate

avant affinement		après affinement	
atome	R (Å)	atome	R (Å)
O (H <sub>2</sub> O)	2*2.112	O (H <sub>2</sub> O)	2*2.084
Oa	2*2.138	Oa	2*2.128
Ob	2*2.142	Ob	2*2.131
C	2*2.804	C	2*2.806
C	2*2.814	C	2*2.854
Ob	2*3.968	O (H <sub>2</sub> O)	2*3.800
Oa	2*3.969	Oa	2*3.900
Oa, Ob	4*3.973	Ob	2*3.912
O (H <sub>2</sub> O)	2*4.078	Oa	2*3.940
		Ob	2*3.941

Pour une meilleure compréhension, par la suite les oxygènes Oa et Ob seront renommés O1 pour la première couche de coordination, et O2 pour la troisième.

Dans l'oxalate de zinc, le métal est en coordination octaédrique. Il est lié à deux oxalates chélatants coplanaires et à deux molécules d'eau situées de part et d'autre de ce plan (Fig. II-7a). La distance moyenne de la première couche de coordination est de 2.11 Å (Tableau II-4). La deuxième couche de coordination est constituée par 4 carbones (C1),  $\langle d(\text{Zn-C}) \rangle = 2.83$  Å. La troisième contient 4 oxygènes (O2) appartenant aux deux oxalates, et 6 autres oxygènes appartenant aux oxalates voisins (non représentés sur la figure II-7a),  $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle = 3.90$  Å. La structure de l'oxalate de zinc dihydrate est particulièrement symétrique, chaque couche de coordination est bien individualisée et la distribution des distances au sein d'une même couche est très faible. Cela se traduit de deux manières sur le spectre EXAFS: (1) Par une forte amplitude, comme le montre la comparaison avec le spectre du citrate de zinc (Fig. II-8), et (2) par la présence de battements à  $k = 6.5$  et  $10 \text{ Å}^{-1}$  qui résultent d'interférences destructives entre deux couches distantes de  $\Delta R$  suivant la relation:

$$\Delta R = \pi / 2k \quad (\text{modulo } 2\pi)$$

Le battement à  $6.5 \text{ Å}^{-1}$  correspond à l'addition de deux interférences destructives: celle entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> couche de coordination ( $\Delta R = 0.70$  Å, cf. tableau II-4) d'une part, et celle entre la 1<sup>ère</sup> et la 3<sup>ème</sup> ( $\Delta R = 1.73$  Å) d'autre part. Le battement vers  $10 \text{ Å}^{-1}$  provient aussi de l'interférence entre la 1<sup>ère</sup> et la 3<sup>ème</sup> couche de coordination. Si la distribution des distances était plus importante, comme c'est le cas pour le citrate de zinc, on observerait une baisse générale de l'amplitude du spectre, et les battements seraient beaucoup moins marqués (Fig. II-8).

Tableau II-4: Paramètres structuraux des composés d'oxalate et de lactate de zinc

	Oxalate de zinc dihydrate (DVLS)				Oxalate de zinc en solution aqueuse (EXAFS)				Lactate de zinc en solution aqueuse (EXAFS)			
	R (Å)	N	$\langle R \rangle$ (Å)	$\Delta\sigma$ (Å)	R (Å)	N	$\langle R \rangle$ (Å)	$\Delta\sigma$ (Å)	R (Å)	N	$\langle R \rangle$ (Å)	$\Delta\sigma$ (Å)
1 <sup>ère</sup> couche: Zn-(O1, H <sub>2</sub> O)	2.13	6	2.11	0.00	2.06	3	2.12	0.005	2.06	3	2.13	0.004
	2.81-2.85	4	2.83	0.02	2.18	3	2.82	0.05	2.21	3	2.84	0.00
2 <sup>ème</sup> couche: Zn-C1					2.82	4	2.82	0.05	2.84	4	2.84	0.04
					3.80-3.94	10	3.90	0.007	3.82	5	3.85	0.007
3 <sup>ème</sup> couche: Zn-O2 <sup>1</sup>					3.91	3	3.91	0.00	3.90	3	3.90	0.00

La simulation numérique a été effectuée en utilisant les fonctions d'amplitude et de déphasage calculées par FEFF à partir de la structure de l'oxalate de zinc dihydrate affinée par DVLS, et de celle du lactate de zinc trihydrate [45].  $\Delta\sigma$  est calculé par rapport à la référence ZnO,  $\langle R \rangle = \sum (k^2 \chi_{\text{exp}})^2 / \sum (k^2 \chi_{\text{th}})^2$ . <sup>1</sup>Pour le lactate de zinc en solution, la troisième couche contient aussi des atomes de carbone, mais elle a été simulée seulement par une couche d'oxygène du fait du désordre structural important à cette distance.

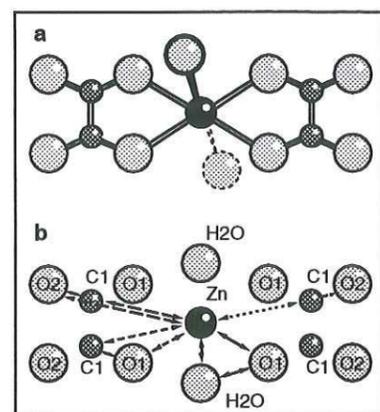


Figure II-7: Structure de l'oxalate de zinc dihydrate (a) et chemins de diffusion multiple (b)

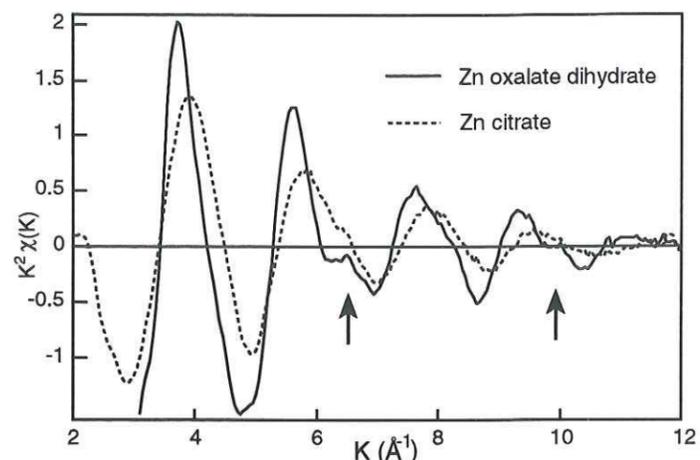


Figure II-8: Comparaison des spectres EXAFS de l'oxalate de zinc dihydrate et du citrate de zinc

Le tableau II-4 compare les paramètres structuraux déterminés par DVLS et par EXAFS. L'accord est satisfaisant, on note cependant une différence de 0.05  $\text{\AA}$  pour la troisième couche (3.85 vs 3.90  $\text{\AA}$ ). Pour comprendre ce désaccord, nous avons étudié les phénomènes de diffusion multiple dans cette structure à l'aide du programme FEFF7. Les chemins de diffusion multiple  $\text{Zn} \rightarrow \text{C} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{Zn}$  créent des contributions à 3.06-3.07  $\text{\AA}$ , qui sont susceptibles d'interférer avec le signal de diffusion simple de la deuxième couche de coordination. Cependant, ils sont de faible intensité. De même, la diffusion multiple à l'intérieur de l'octaèdre ( $\text{Zn} \rightarrow \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{Zn}$  par exemple), produit des contributions à 3.49-3.82  $\text{\AA}$  (*i.e.*, au niveau de la troisième couche), mais qui sont négligeables car tous ces chemins contiennent au moins un angle proche de 90°. Par contre, les chemins impliquant des atomes colinéaires, comme  $\text{Zn} \rightarrow \text{C} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{Zn}$  ( $n_{\text{leg}}=3^1$ ) ou  $\text{Zn} \rightarrow \text{C} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{C} \rightarrow \text{Zn}$  ( $n_{\text{leg}}=4$ ) ont une amplitude importante. C'est l'effet de focus [46]. Ces chemins de diffusions multiples créent des contributions aux mêmes distances que celles de diffusions simples (les atomes sont alignés). Ceci explique que les distances obtenues par simulation en diffusion simple pour la troisième couche soient différentes des distances cristallographiques. Ainsi, pour l'oxalate de zinc dihydrate, les effets de diffusion multiple sont négligeables en dessous de 3.8  $\text{\AA}$ , et modifient le signal de diffusion simple à  $\approx 3.95 \text{\AA}$ .

En conclusion, l'oxalate de zinc dihydrate possède une des structures les plus simples et les plus symétriques parmi les composés organiques du zinc. En conséquence, son spectre EXAFS possède une amplitude inhabituellement forte pour un composé organique, comparable à celle

<sup>1</sup>  $n_{\text{leg}}$  est un paramètre du programme FEFF7. Il représente le nombre de trajets entre deux atomes pour le photoélectron.  $n_{\text{leg}}=2$  correspond à la diffusion simple (aller-retour du photoélectron entre deux atomes).

d'un composé minéral. L'existence de chaînes comportant des atomes colinéaires engendre des phénomènes de diffusion multiple qui se superposent aux contributions de diffusion simple dans le troisième pic de la FDR.

#### II.2.2.2. Oxalate de zinc en solution

Dans le milieu naturel, l'oxalate de zinc peut être présent sous forme cristallisée, mais aussi en solution, par exemple dans le cytoplasme des cellules vivantes ou dans les eaux naturelles. Il est donc important d'étudier ce complexe en solution. La structure à grande distance de l'oxalate de zinc à l'état solide et en solution est différente, nous allons voir s'il en est de même à l'échelle locale.

La solution étudiée contient  $3.3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ , 0.13 M d'oxalate de sodium, le rapport de concentration entre le ligand et le métal (L/M) est donc de 3.9, le pH a été fixé à 5 avec NaOH et  $\text{HNO}_3$  0.1 M. La concentration en ligand a été choisie largement en excès par rapport à celle du zinc pour s'assurer qu'un maximum de zinc soit complexé, tout en évitant la précipitation d'oxalate de zinc. La comparaison des FDR de la solution et de l'oxalate de zinc dihydrate à l'état solide montre que la position des trois pics est identique (Fig. II-9). La simulation numérique donne les mêmes distances Zn-O et Zn-C et le même nombre de voisins pour les deux composés, et des facteurs de Debye-Waller très légèrement inférieurs pour la solution (tableau II-4). On en déduit que la solution contient une espèce largement majoritaire, dont la structure est comparable à celle du solide: le zinc est ligandé par deux oxalates chélatants et deux molécules d'eau (complexe  $\text{ZnL}_2$ ). L'abaissement des facteurs de Debye-Waller indique que l'arrangement des atomes est plus ordonné dans le complexe en solution que dans le solide. Cela peut être interprété par une diminution de la distorsion de la structure, le complexe en solution n'étant pas soumis aux effets d'encombrement stérique qui affectent la structure cristalline. La structure du complexe en solution est donc «relaxée» par rapport à celle dans le solide. Ces deux formes du complexe Zn-oxalate (état solide et en solution) possèdent une structure identique à l'échelle locale, ils ont donc la même signature spectrale.

#### II.2.2.3. Lactate de zinc

La structure du lactate de zinc trihydrate [45] est très proche de celle de l'oxalate de zinc dihydrate. Dans ces deux composés, le zinc est ligandé par deux chélates et deux molécules d'eau (Fig. II-7 et II-10). La molécule de lactate peut être décrite comme celle d'un oxalate dont un atome d'oxygène a été substitué par un atome de carbone. Ce remplacement induit (1) une distorsion de la molécule de lactate, qui n'est pas plane contrairement à l'oxalate, et (2) une moins grande cohérence des distances interatomiques. Nous allons donc comparer le spectre EXAFS de ces deux composés afin d'évaluer l'influence de la dispersion des distances interatomiques, à nombre de voisins constant.

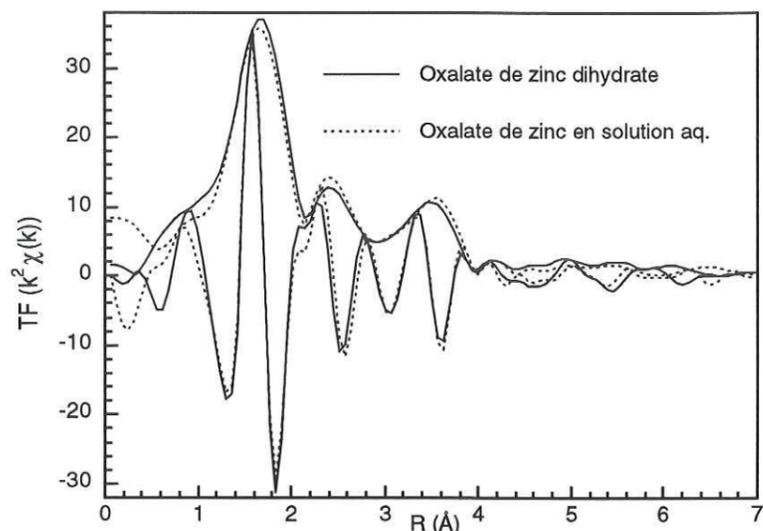


Figure II-9: Fonctions de distribution radiale (module et partie imaginaire) de l'oxalate de zinc dihydrate solide et en solution aqueuse (bornes en  $k$ :  $3.4 - 11 \text{ \AA}^{-1}$ )

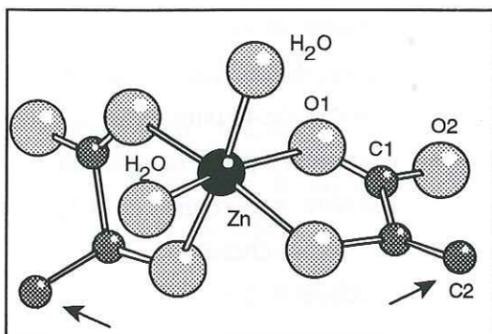


Figure II-10: Structure du lactate de zinc trihydrate (Singh, 1974)

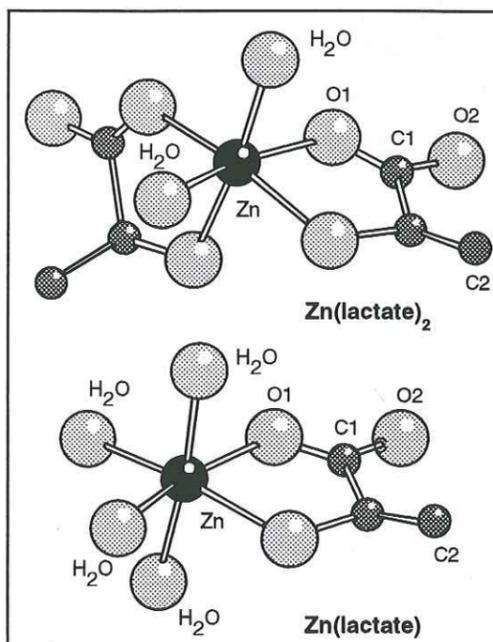


Figure II-12: Modèle structural des complexes zinc-lactate en solution aqueuse

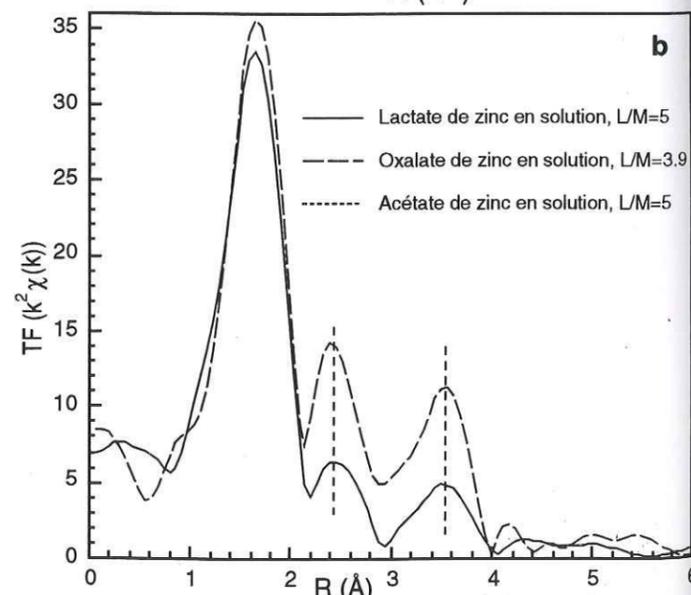
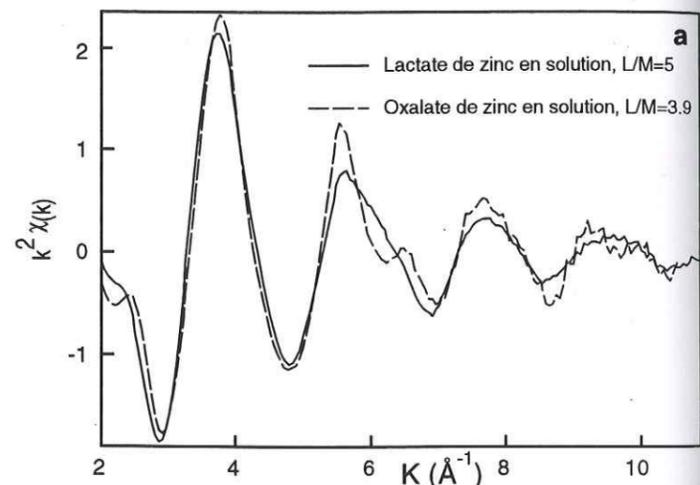


Figure II-11: Spectres EXAFS (a) et FDR (b) du lactate et de l'oxalate de zinc en solution aqueuse à pH 5 (bornes de la TF:  $3.4-10.5 \text{ \AA}^{-1}$ )

A défaut du lactate de zinc trihydrate qui n'a pas pu être synthétisé, nous avons étudié le lactate de zinc en solution. La solution contient  $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $0.25 \text{ M}$  de lactate de sodium, le rapport L/M est donc de 5, le pH a été fixé à 5 avec NaOH et  $\text{HNO}_3$   $0.1 \text{ M}$ . Le lactate est un hydroxyacide moins fortement complexant que le diacide oxalate, le rapport ligand/métal (L/M) a donc été choisi plus élevé que pour l'oxalate. Les spectres EXAFS du lactate de zinc en solution et de l'oxalate de zinc dihydrate sont comparés figure II-11a. Ils ont une fréquence proche, cependant l'amplitude du lactate est plus faible que celle de l'oxalate. Il ne possède pas de battement marqué à  $6.5 \text{ \AA}^{-1}$ , cependant l'oscillation vers  $6 \text{ \AA}^{-1}$  est nettement dissymétrique, ce qui suggère l'existence d'une interférence entre deux couches atomiques (Fig. II-11a). La fonction de distribution radiale du lactate de zinc en solution présente trois pics aux mêmes distances que ceux de l'oxalate de zinc, mais d'amplitude plus faible (Fig. II-11b). Cette ressemblance suggère qu'à ce rapport L/M, le zinc forme un complexe bidentate avec les groupements acide ( $-\text{COOH}$ ) et alcool ( $-\text{CHOH}$ ) du lactate, comme dans le lactate de zinc trihydrate. Les résultats de la simulation numérique (tableau II-4) sont en accord avec ce modèle: l'environnement du zinc se compose d'un octaèdre d'oxygène (O1) à une distance moyenne de  $2.12 \text{ \AA}$ , d'une couche de carbone (C1) à  $2.88 \text{ \AA}$ , et d'une couche d'oxygène + carbone (O2 et C2) à  $3.89 \text{ \AA}$ . L'amplitude plus faible des pics de la FDR du lactate par rapport à l'oxalate se traduit par des valeurs de  $N$  inférieures et des facteurs de Debye-Waller ( $\Delta\sigma$ ) supérieurs. La diminution d'amplitude peut être due (1) au désordre structural à l'intérieur du complexe provenant de la substitution de O2 par C2, qui abaisse la symétrie du complexe, et par conséquent augmente la distribution des distances; (2) à un mélange d'espèces chimiques  $\text{ZnL}_2$  et  $\text{ZnL}$  (Fig. II-12). Cela est suggéré par le fait que le lactate est un moins fort complexant du zinc que l'oxalate. L'espèce  $\text{ZnL}$  contient deux fois moins d'atomes que l'espèce  $\text{ZnL}_2$  dans la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> couche atomique, ce qui expliquerait la diminution d'amplitude des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> pics de la FDR. Ces deux phénomènes agissent probablement simultanément et concourent à la diminution d'amplitude du spectre EXAFS. Les atomes Zn, C1, O2 d'une part, et Zn, C1, C2 d'autre part ne sont pas alignés à cause de la distorsion de la molécule, les contributions de diffusion multiple sont donc probablement beaucoup moins importantes que dans le cas de l'oxalate de zinc.

Pour un rapport L/M de 5 et un pH de 5, on observe un ou deux types de complexes en solution:  $\text{ZnL}_2$  et probablement  $\text{ZnL}$ . Dans les deux cas, la structure est majoritairement bidentate, le zinc étant lié aux groupements carboxyle et hydroxyle du lactate. Ce résultat est en accord avec celui de Thomas et al. [47] obtenus par RMN de  $^{27}\text{Al}$  pour le complexe Al-lactate. Pour un rapport L/M de 3 et un pH de 3.5, ces auteurs ont montré que les espèces majoritaires sont des complexes bidentates  $\text{AlL}$  et  $\text{AlL}_2$ .

En conclusion, cette étude comparative montre que la substitution d'un atome d'oxygène par un atome de carbone induit des modifications importantes sur le spectre EXAFS, comme la diminution de l'amplitude, l'effacement des battements et probablement une contribution moindre des phénomènes de diffusion multiple.

#### II.2.2.2.4. Salicylate de zinc dihydrate

Dans ce composé, le zinc est lié à deux carboxyles bidentates et à deux molécules d'eau [48] (Fig. II-13). Le groupement alcool du salicylate n'est pas déprotoné, il n'engage pas de liaison avec le zinc. Cette structure constitue donc un modèle de complexe à ligands carboxyles bidentates appartenant à un cycle aromatique.

Le polyèdre de coordination du zinc est particulièrement déformé, avec 4 distances Zn-O courtes (O1 et O4 à 1.99 et 2.00 Å) et 2 longues (O2 à 2.52 Å). Une autre particularité de cette structure est que les atomes de carbone (C7) des groupements carboxyles sont à une distance très courte (2.60 Å). Pour la simulation numérique, nous avons regroupé les 4 oxygènes O1 et O4 dans une première couche, et les 2 oxygènes O2 + les 2 carbones C7 dans une deuxième couche (Tableau II-5, Fig. II-13). On peut supposer que la distance Zn-C7 courte est imposée par la configuration bidentate du groupement carboxyle. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons examiné la distribution radiale de nombreux composés où le zinc est lié à des acides carboxyliques. La configuration bidentate est assez rare, nous l'avons trouvée dans seulement trois autres composés: l'acétate de zinc dihydrate [49] (Fig. II-13), le phénoxyacétate de zinc dihydrate [50] et le 2-formyl,6-méthoxyphénoxyacétate de zinc dihydrate [51]. Yang [52] suggère que la configuration bidentate est peu stable dans le cas du zinc, car le cycle formé par les atomes O, C, O du groupement carboxyle et par le métal est instable, du fait du faible rayon ionique du zinc (0.88 Å). Par contre, cette configuration est plus stable dans le cas du cadmium par exemple, dont le rayon ionique est de 1.09 Å. Dans les trois structures mentionnées précédemment, le zinc est lié à 2 COO<sup>-</sup> et 2 molécules d'eau, comme dans le salicylate de zinc dihydrate. La distance Zn-C est comprise entre 2.50 et 2.65 Å, alors qu'elle est supérieure à 2.70 Å dans le cas d'une liaison monodentate (Fig. II-1). On conclut que la présence d'atomes de carbone à une distance inférieure à 2.70 Å est caractéristique de groupements carboxyles bidentates.

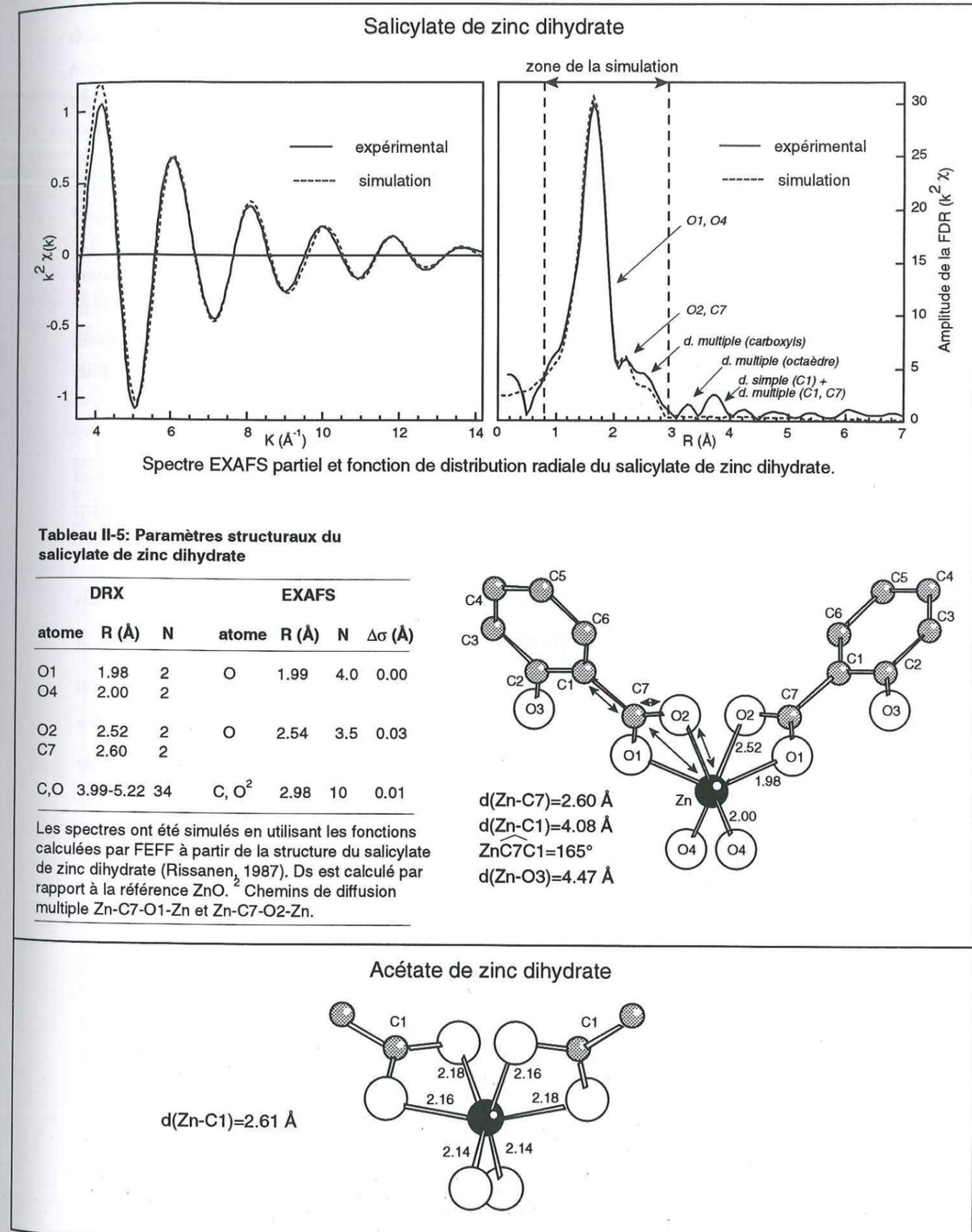


Figure II-13: Etude de la structure du salicylate de zinc dihydrate

La fonction de distribution radiale montre un épaulement sur le deuxième pic, qui correspond à une contribution à  $R = 2.98 \text{ \AA}$ . Or, il n'y a pas de voisins à cette distance, cet épaulement doit donc provenir de la diffusion multiple (DM). Cette hypothèse a été confirmée par simulation numérique, la contribution à  $2.98 \text{ \AA}$  provenant des chemins de diffusion multiple au sein du groupement carboxyle ( $\text{Zn} \rightarrow \text{C7} \rightarrow \text{O2} \rightarrow \text{Zn}$ ,  $\text{Zn} \rightarrow \text{C7} \rightarrow \text{O1} \rightarrow \text{Zn}$  et leurs équivalents). On a vu que dans l'oxalate de zinc dihydrate, la diffusion multiple entre des atomes colinéaires créait des contributions à la même distance que les contributions de diffusion simple (DS). Ici, les angles  $\text{ZnO2C7}$  et  $\text{ZnO1C7}$  sont proches de  $90^\circ$  ( $80$  et  $103^\circ$  respectivement). En conséquence, (1) l'amplitude de la DM est donc plus faible que dans le cas d'atomes alignés, et (2) le rayon effectif des chemins de DM est supérieur à ceux de DS. Les contributions de DM apparaissent donc à une distance nettement décalée ( $2.98 \text{ \AA}$ ) par rapport aux contributions de diffusion simple ( $2.54 \text{ \AA}$ ). Elles forment un épaulement sur le pic de DS sur la FDR, et sont donc plus facilement repérables que lorsque les deux types de contribution sont confondus.

Les pics à  $R + \Delta R = 3.3$  et  $3.7 \text{ \AA}$  résultent de nombreuses contributions, la simulation numérique présente donc moins d'intérêt et n'a pas été effectuée. Cependant, le calcul par FEFF permet de dire que le pic à  $R + \Delta R = 3.3 \text{ \AA}$  provient pour partie de la diffusion multiple au sein de l'octaèdre, en particulier les chemins  $\text{Zn} \rightarrow \text{O2} \rightarrow \text{O4} \rightarrow \text{Zn}$  et  $\text{Zn} \rightarrow \text{O1} \rightarrow \text{O1} \rightarrow \text{Zn}$  dans lesquels les atomes sont assez bien alignés ( $147$  et  $131^\circ$ ). Le pic à  $R + \Delta R = 3.7 \text{ \AA}$  correspond aux atomes de carbone C1 à  $R = 4.08 \text{ \AA}$ , dont la contribution est renforcée par la diffusion multiple entre les carbones C1 et C7 ( $\text{Zn} \rightarrow \text{C7} \rightarrow \text{C1} \rightarrow \text{Zn}$ ,  $n_{\text{leg}}=3$ , et  $\text{Zn} \rightarrow \text{C7} \rightarrow \text{C1} \rightarrow \text{C7} \rightarrow \text{Zn}$ ,  $n_{\text{leg}}=4$ ). Les trois atomes Zn, C7 et C1 étant quasiment colinéaires (l'angle  $\text{ZnC7C1}$  est de  $165^\circ$ ), le pic de DM est quasiment confondu au pic de DS sur la FDR. Dans les trois autres composés à ligands carboxyles bidentates, ces trois atomes (Zn, C1, C7) sont aussi quasiment colinéaires. Notons que le carbone C4 est aligné avec les atomes Zn, C1 et C7, mais sa contribution (DS+DM) est trop éloignée pour être détectée ( $R > 6.8 \text{ \AA}$ ).

L'étude de la structure du salicylate de zinc dihydrate montre que la présence d'une couche de carbone à courte distance ( $R < 2.70 \text{ \AA}$ ) est caractéristique de ligands carboxyles bidentates. On a observé des phénomènes de diffusion multiple non négligeables au sein du cycle Zn-O-C-O formé par la liaison carboxylique bidentate, et entre le carbone du groupe carboxyle (C7) et son proche voisin C1. La diffusion multiple au sein du cycle benzénique crée une contribution à très grande distance ( $R > 6.8 \text{ \AA}$ ). Ceci est à opposer aux complexes à ligands imidazoles comme l'histidine, où le métal est lié directement à un atome d'azote appartenant au cycle imidazole. Dans ce cas, les phénomènes de diffusion multiple au sein du cycle créent des contributions à plus faible distance ( $R < 4 \text{ \AA}$ ) [53], et influencent notablement le spectre. La DM au sein du

cycle benzénique ne peut donc pas être utilisée comme critère d'identification de ligands aromatiques.

### II.2.2.5. Acétate et benzoate de zinc anhydres

Les spectres EXAFS de l'acétate et du benzoate de zinc anhydres présentent d'importantes similitudes (Fig. II-14). Les premiers pics de leur FDR sont superposés du fait que dans les deux composés le zinc est ligandé par 4 groupements carboxyles monodentates. Les légères différences de fréquence et de forme des spectres EXAFS sont dues à des différences de structure des couches atomiques situées au-delà de la première sphère de coordination, comme le montrent les FDR entre  $R + \Delta R = 3$  et  $4 \text{ \AA}$ . Le Tableau II-5 montre que les distances au-delà de la première couche sont fortement distribuées, du fait de la faible symétrie des deux structures. Les distances Zn-O et Zn-C sont différentes pour chacun des quatre ligands du zinc. En conséquence, on ne peut pas délimiter une deuxième et une troisième couche de voisins, ce qui explique que les pics de la FDR soient larges et mal séparés. Dans ces composés, la simulation numérique est inadaptée au-delà de la première couche de coordination, car elle nécessiterait l'introduction d'un grand nombre de sous-couches atomiques, le nombre de paramètres structuraux à ajuster serait alors supérieur au nombre de paramètres indépendants.

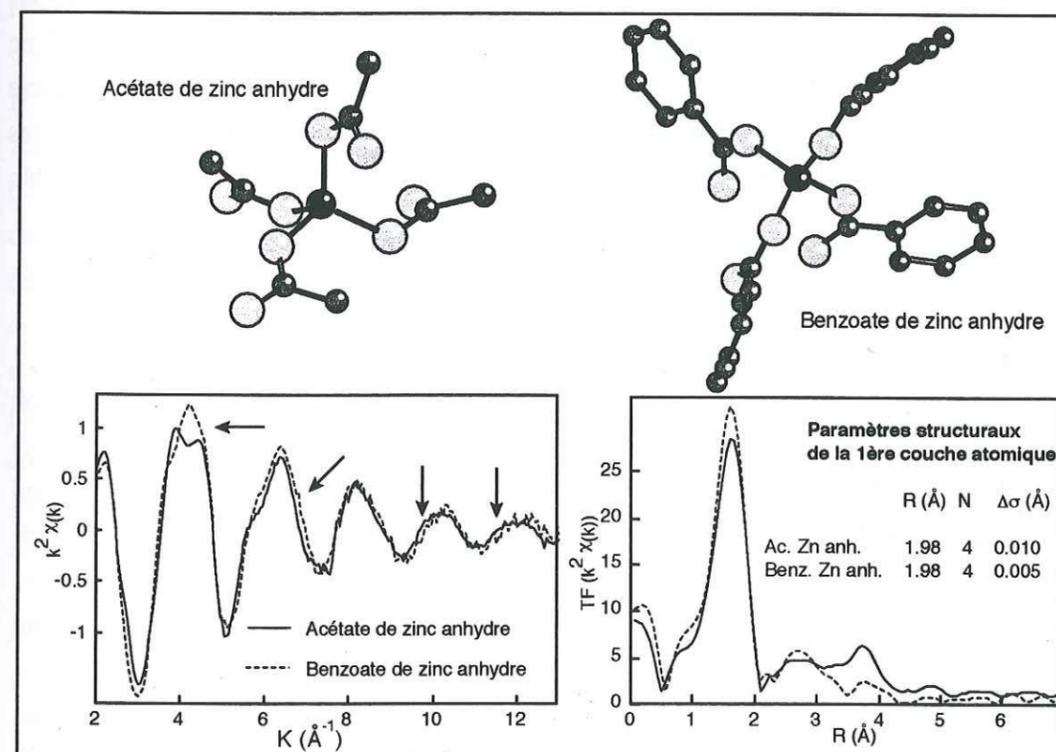


Figure II-14: Comparaison de l'acétate et du benzoate de zinc anhydres. Paramètres structuraux déterminés par simulation numérique des spectres EXAFS en utilisant les fonctions d'amplitude et de déphasage extraites de ZnO.

Tableau II-5: Distribution atomique radiale de l'acétate et du benzoate de zinc anhydres entre 2.00 et 4.20 Å.

Acétate de zinc anhydre <sup>1</sup>		Benzoate de zinc anhydre <sup>2</sup>	
atome	R (Å)	atome	R (Å)
C	2.71	C	2.79
C	2.78	C	2.91
O	2.79	O	2.92
C	2.92	C	2.96
O	2.95	C	3.01
C	2.96	O	3.26
C	3.27	Zn	3.28
C	3.41	O	3.33
O	4.07	O	3.48
O	4.09	C	4.18
C	4.11		
C	4.15		

<sup>1</sup> [54], <sup>2</sup> [55].

Dans ces deux structures, du fait que les ligands carboxyles sont monodentates, le carbone du groupe carboxyle et le second voisin carbone ne sont pas alignés avec le zinc, comme c'était le cas pour le salicylate de zinc dihydrate. La diffusion multiple entre ces deux atomes de carbone et le zinc est donc probablement nettement moins intense. L'important désordre structural ne permet pas d'extraire les informations structurales qui permettraient de différencier le cycle aromatique du benzoate de la chaîne aliphatique de l'acétate. Cette comparaison montre que les complexes organiques du zinc peuvent être désordonnés, et dans ce cas il n'est pas possible d'obtenir des informations précises au delà de la première couche de coordination.

### II.2.3. Conclusion

La stéréochimie des complexes du zinc est relativement simple. La coordinence est soit tétraédrique, soit octaédrique. Les complexes tétraédriques sont généralement anhydres, alors que les complexes octaédriques sont le plus souvent hydratés. Chaque type de ligand (sulfhydryle, phosphate, carboxyle) possède un environnement caractéristique, qui permet de l'identifier. Dans le cas des complexes carboxyliques, l'EXAFS est sensible à des différences structurales au-delà de la première sphère de coordination, et il est possible de différencier un certain nombre de configurations, à condition que la structure ne soit pas trop désordonnée. Ainsi, les ligands carboxyles bidentates, comme le salicylate, possèdent une couche de carbone à courte distance qui permet de les identifier. Les ligands possédant deux groupements carboxyles monodentates, comme l'oxalate, forment des complexes très symétriques. Les trois premières couches atomiques sont alors bien individualisées, et l'existence de groupes d'atomes alignés génère des contributions de diffusion multiple à des distances comparables aux

contributions de diffusion simple. Par contre, il n'est pas possible par cette technique de distinguer les groupements carboxyles qui appartiennent à un cycle aromatique de ceux qui appartiennent à une chaîne aliphatique, car les différences structurales se situent à grande distance ( $R > 6 \text{ \AA}$ ).

## II.3. LE PLOMB

### II.3.1. Généralités sur la chimie de coordination du plomb

Le plomb peut être tétravalent ou divalent. Le plomb(IV) est présent majoritairement dans les composés organométalliques. Le plomb(II) est présent dans les composés inorganiques et les composés de coordination [56]. Le degré d'oxydation (II) est le plus stable, c'est principalement sous cette forme que se trouve le plomb dans l'environnement. La configuration électronique du plomb divalent est  $6s^2 6p^2$ . La présence d'une paire d'électrons non appariés (électrons de la couche 6s), qui occupent un volume équivalent à celui d'un oxygène [57], influence fortement sa stéréochimie. On parle d'effet de paire inerte [30]. Par exemple dans le cas du monoxyde de plomb  $\alpha\text{PbO}$  (litharge), le polyèdre est une pyramide à base carrée, les quatre liaisons Pb-O sont toutes localisées dans la demi-sphère opposée à celle contenant le doublet libre [58] (Fig. II-15). La direction des liaisons est fortement anisotrope, contrairement au cas du monoxyde de zinc (cf. II-2.2.1), ce qui induit une distorsion du polyèdre de coordination. Une autre source de complexité est l'extrême variabilité de la coordinence du plomb: quasiment toutes les coordinences entre 3 et 12 ont été décrites dans la littérature. Il est même parfois délicat de définir ce nombre de coordination car pour de nombreux composés, en particulier les organiques, les distances interatomiques sont distribuées de façon quasi continue, et les couches ne sont pas clairement individualisées. Cette dispersion des distances interatomiques autour du plomb est bien visible sur la figure II-16. Dans cette figure, CN a été défini arbitrairement comme le nombre d'atomes à une distance inférieure à  $3.20 \text{ \AA}$ . On voit que contrairement au zinc (Fig. II-1), il n'existe pas de relation directe entre distance et nature des ligands ou coordinence. On peut malgré tout définir une limite inférieure pour les distances Pb-S et Pb-P.  $\langle d(\text{Pb-S}) \rangle$  est supérieure à  $\langle d(\text{Pb-O}) \rangle$ , par contre cela n'est pas vrai pour  $\langle d(\text{Pb-P}) \rangle$  et  $\langle d(\text{Pb-C}) \rangle$ . Ainsi, le seul critère « distance interatomique » n'est pas suffisant pour identifier les ligands du plomb, sauf dans le cas des groupements sulfhydryle.

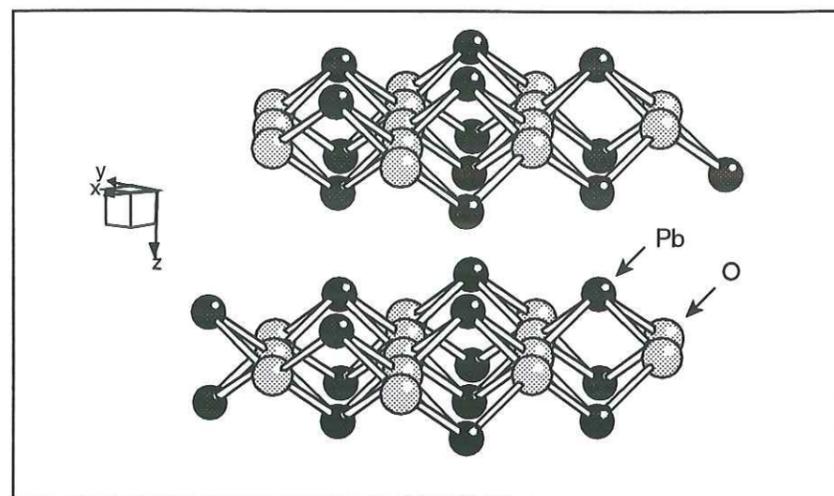
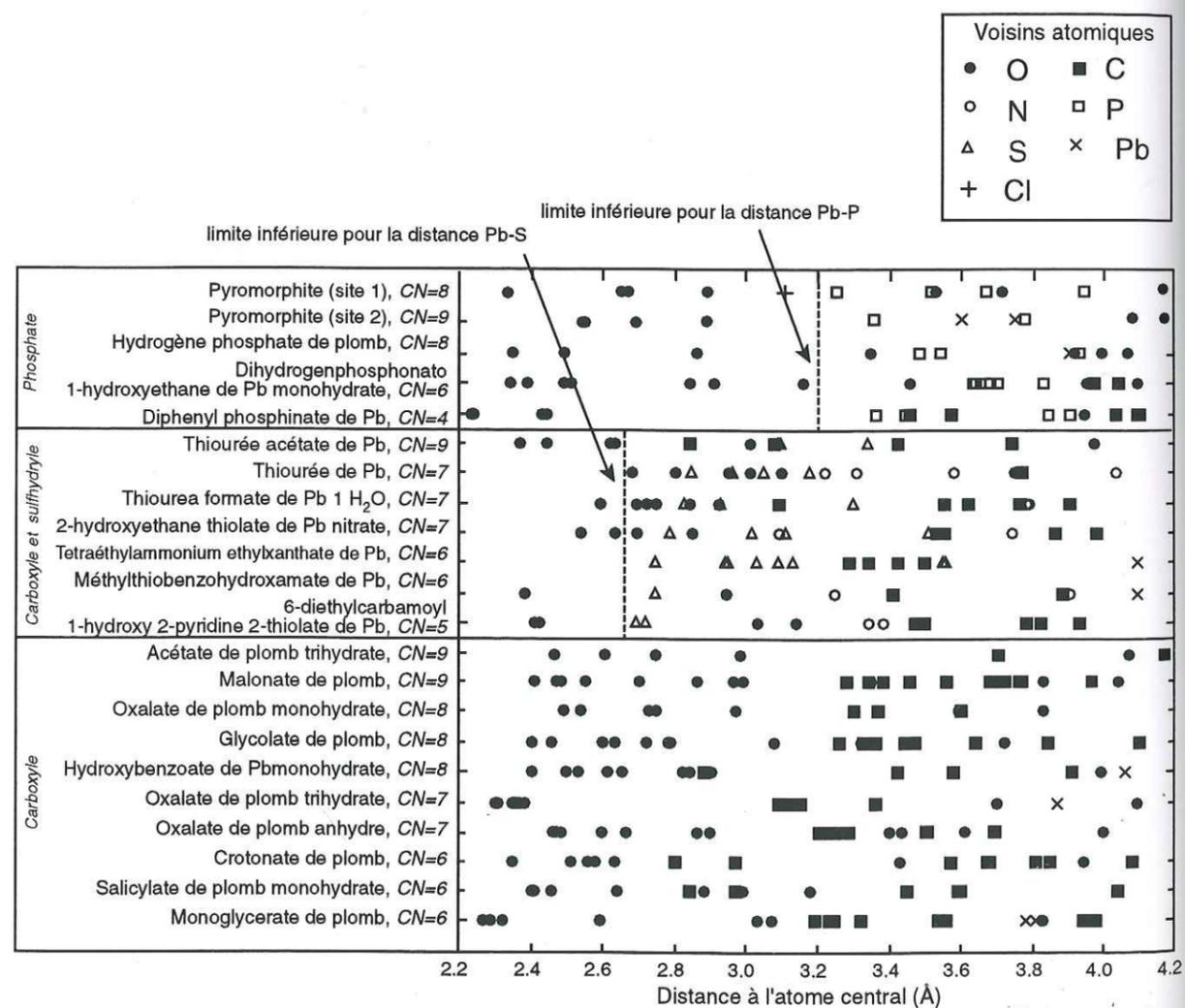
Figure II-15: Structure du Litharge ( $\alpha$ PbO)

Figure II-16: Distribution radiale des voisins atomiques du plomb de quelques composés.

L'incohérence des distances interatomiques des composés du plomb a plusieurs conséquences pour leur étude par spectroscopie EXAFS:

- Les interférences entre les différentes contributions réduisent de façon considérable l'amplitude des oscillations EXAFS. La comparaison entre l'acétate de plomb (IV) et (II) illustre bien ce phénomène (Fig. II-17). Dans l'acétate de plomb(IV), le plomb est lié à 4 acétates bidentates, la direction des liaisons est symétrique et les distances Pb(IV)-O sont faiblement distribuées (2.24 à 2.31 Å, *i.e.*,  $\Delta R = 0.07$  Å) [59]. En revanche, le polyèdre de l'acétate de plomb(II) est très distordu à cause de la présence du doublet d'électrons libres, et les distances Pb-O s'échelonnent de 2.45 à 3.11 Å, *i.e.*,  $\Delta R = 0.66$  Å [60]. En conséquence, l'amplitude du pic Pb(II)-O de la FDR est réduit d'un facteur 2.5 par rapport au pic Pb(IV)-O (Fig. II-17). L'atténuation du signal est encore aggravée lorsque le plomb occupe plusieurs sites cristallographiques de géométrie différente, comme c'est le cas pour de nombreux composés du plomb comme l'alamosite PbSiO<sub>3</sub> (trois sites) [61] ou la pyromorphite Pb<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>Cl (deux sites) [62].

- Les couches atomiques sont souvent mal individualisées, il est alors impossible d'extraire des fonctions d'amplitude et de déphasage à partir de composés modèles car les contributions élémentaires se superposent.

- Lors des simulations numériques, le nombre de paramètres ajustés ne peut pas être supérieur au degré de liberté du système (cf. I.4.2). Par exemple, pour la première couche de coordination, si les fenêtres dans l'espace réel et réciproque sont respectivement de 1.5 Å et 9 Å<sup>-1</sup>, le degré de liberté est de 8.6, on ne peut pas introduire plus de deux sous-couches (trois paramètres ajustés par sous-couche). Par conséquent, si la distribution des distances est importante, l'analyse par simulation numérique est mal adaptée, les distances  $R$  et nombre de voisins  $N$  obtenus n'étant pas fiables. D'une façon générale, on préférera limiter la simulation numérique à la première couche de coordination, les couches suivantes seront analysées de façon semi-quantitative.

- La distribution des distances ne peut plus être considérée comme gaussienne. L'approximation d'harmonicité contenue dans la formule classique de l'EXAFS n'est plus valable, et les distances calculées sont inférieures aux distances cristallographiques dans le cas où l'anharmonicité est grande. Par exemple, dans le cas du plomb métal, Yu [63] a observé une différence de 0.02 Å entre la valeur déterminée par EXAFS à 77K et la valeur cristallographique.

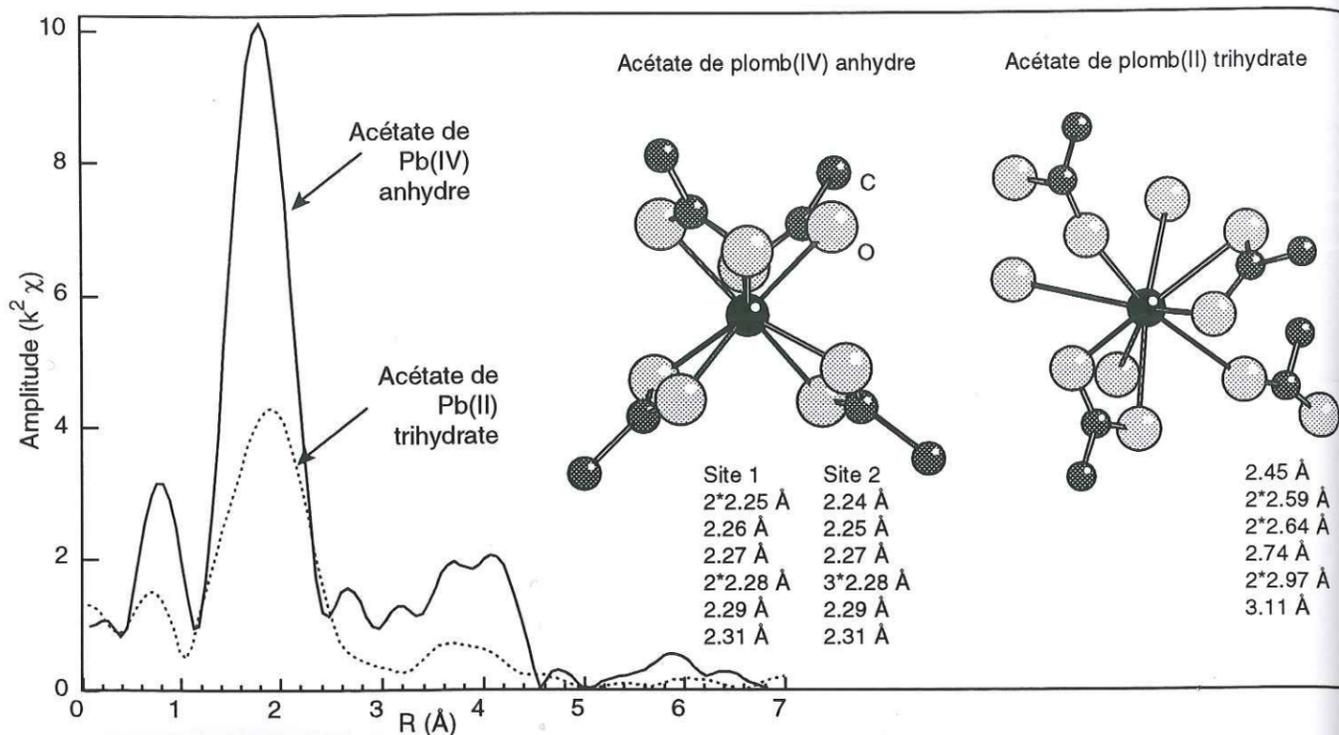


Figure II-17: Comparaison des FDR et des structures de l'acétate de plomb(II) et (IV)

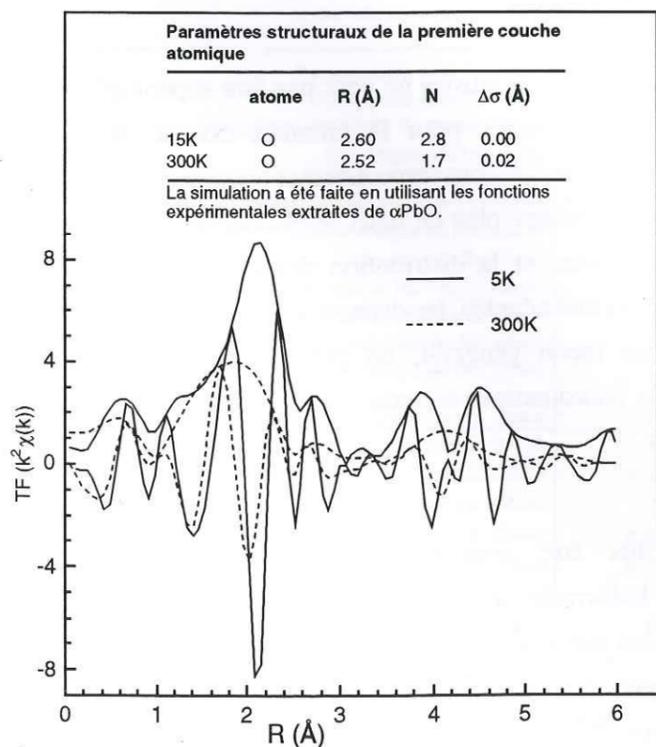


Figure II-18: Comparaison des TF (module et partie imaginaire) de l'acétate de plomb anhydre à 15K et 300K (bornes de la transformée de Fourier: 3-11 Å<sup>-1</sup>)

Un autre phénomène s'ajoute au désordre statique, c'est l'agitation thermique qui peut être élevée. La température de Debye du plomb métal est basse (105 K), ce qui explique sa ductilité à température ambiante. La distance Pb-Pb déterminée par EXAFS diminue 0.01 Å entre 77K et 300K alors qu'en réalité elle augmente de 0.007 Å par expansion thermique [63]. L'agitation thermique crée donc une anharmonicité, qui s'ajoute à celle due au désordre statique. Il est cependant important de noter que le degré d'anharmonicité dépend du composé étudié: Le monoxyde de plomb αPbO possède une structure plus rigide que le plomb métal, et les distances calculées à 77K sont en accord avec les distances cristallographiques. D'autre part, les distances Pb-O et Pb-Pb augmentent avec la température du fait de la dilatation thermique. L'agitation thermique est donc limitée dans ce composé, et n'induit pas de phénomènes d'anharmonicité. L'effet d'anharmonicité est illustré sur la figure II-18 avec l'acétate de plomb anhydre. On observe un net déplacement des pics de la FDR vers les courtes distances quand la température passe de 15K à 300K (Fig. II-18). Pour la première couche, l'écart de distance entre les deux températures est de 0.08 Å. De plus, N<sub>300K</sub> est très inférieur à N<sub>15K</sub>. L'anharmonicité induit donc des erreurs sur la distance, mais aussi sur le nombre de voisins. La figure II-19 compare les spectres EXAFS d'un complexe Pb-acide humique enregistré à 20 et 300K. Pour ce composé, on n'observe aucune augmentation de l'amplitude ou modification de la fréquence entre les deux températures. Ces deux exemples montrent que l'enregistrement des spectres à basse température s'avère indispensable pour certains composés, mais n'améliore pas la précision pour d'autres composés comme les complexes avec les acides humiques.

### II.3.2. Etude EXAFS de quelques composés de référence

#### II.3.2.1. Composés minéraux

Les minéraux de référence ont été choisis d'après la nature des ligands du plomb, et leur arrangement atomique. Le monoxyde de plomb (αPbO) a une structure très ordonnée, le plomb est tétracoordonné par l'oxygène, les quatre distances Pb-O sont égales (2.31 Å). A l'opposé, le sulfure de plomb (PbS) et la pyromorphite (Pb<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>Cl) ont des structures désordonnées, avec pour chacune deux sites différents pour le plomb, et une distribution des distances interatomiques (les paramètres structuraux du tableau II-6 sont la moyenne des deux sites). Ce désordre entraîne une forte réduction de l'amplitude des pics des FDR par rapport à PbO, en particulier pour la pyromorphite (Fig. II-20). Dans ce cas, il n'est pas possible d'extraire des fonctions d'amplitude et de déphasage expérimentales pour les paires Pb-S et Pb-P.

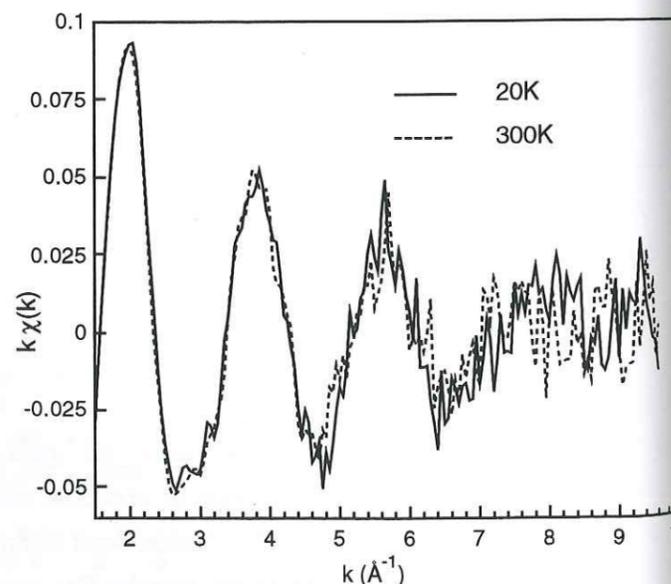


Figure II-19: Comparaison du spectre EXAFS d'un complexe Pb-Acide humique enregistré à 20K et 300K

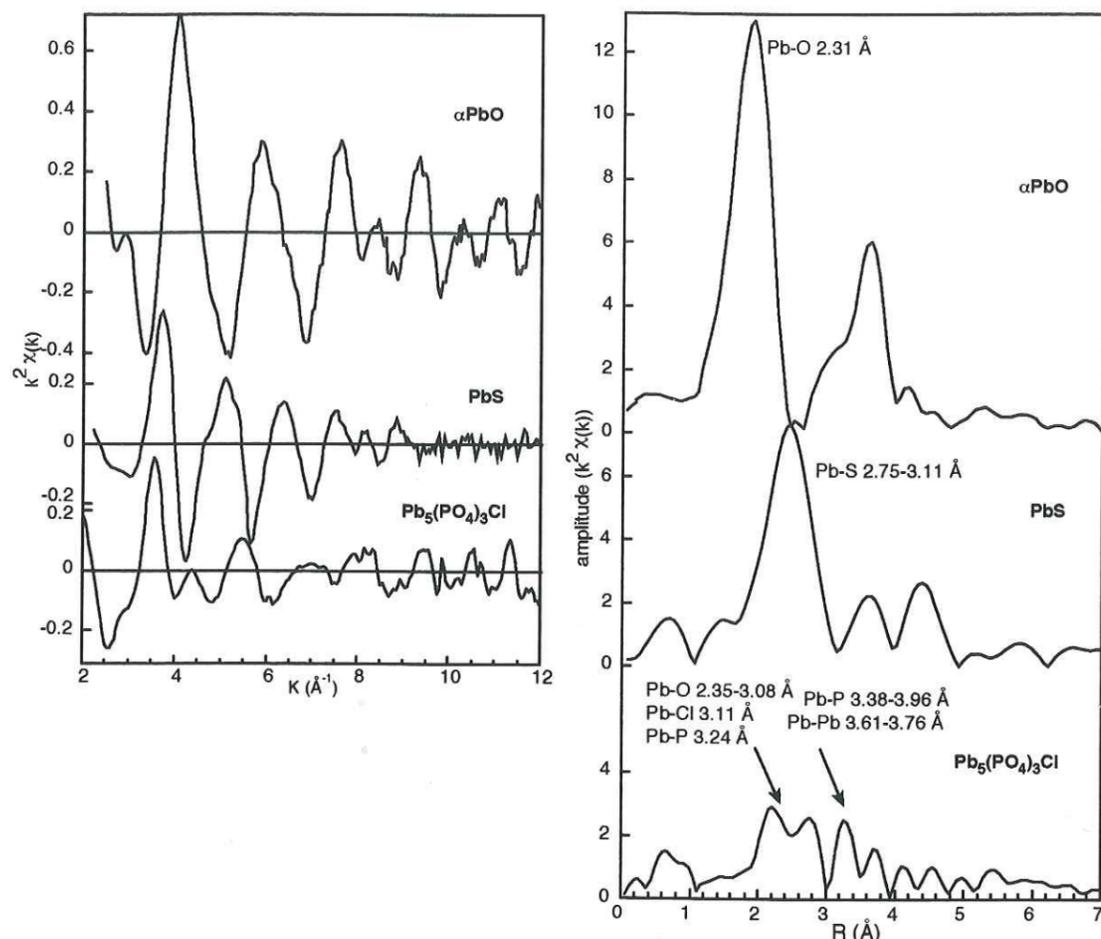


Figure II-20: Spectres EXAFS et fonctions de distribution radiale de quelques références minérales du plomb

Tableau II-6: Paramètres structuraux de quelques références minérales déterminés par DRX

Composé	1 <sup>ère</sup> couche			2 <sup>ème</sup> couche		
	atome	R	N	atome	R	N
$\alpha\text{PbO}^1$	O	2.31	4			
$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}^2$	O	2.35	0.5	Cl	3.11	1.0
	O	2.56	1.5	P	3.34	2.0
	O	2.67	3.5	P	3.71	2.5
	O	2.94	2.0	Pb	3.76	1.0
$\text{PbS}^3$				P	3.96	1.0
	S	2.79	1			
		2.83	1			
		2.96	2			
	3.07	1				

<sup>1</sup> [58], <sup>2</sup> moyenne de deux sites [62], <sup>3</sup> moyenne de deux sites [64].

## II.3.2.2. Composés organiques

Le nombre de composés de coordination du plomb dont la structure est connue est assez limité par rapport au zinc, peut-être parce que le plomb ne joue aucun rôle en biologie moléculaire contrairement au zinc, qui est un cofacteur de nombreuses enzymes. Ainsi, la structure de l'acétate de plomb anhydre, ainsi que celle des complexes du plomb avec le citrate, le benzoate, le phtalate, le catéchol, la cystéine, l'histidine, le lactate, le tartrate, l'acétylacétonate ne sont pas connues. Ce constat, ajouté au fait que les structures sont généralement désordonnées, compromettent d'autant plus l'analyse par simulation numérique.

Cependant, le désordre structural est aussi source d'une extrême diversité dans les arrangements atomiques, chaque composé présentant une distribution radiale originale (Fig. II-16). Prenons l'exemple des trois formes d'oxalate de plomb: anhydre [65], di- [66] et trihydrate [67]. Dans l'espèce trihydratée, le plomb est lié à deux oxalates bidentates, un oxalate monodentate et deux molécules d'eau, la coordination est de 7. La structure est très compacte, les 7 distances Pb-O sont courtes et l'écart maximal des distances est de 0.09 Å (Fig. II-21). Dans le dihydrate, les ligands sont identiques, mais il existe un oxalate monodentate supplémentaire. La coordination est donc de 8. Les distances sont beaucoup moins cohérentes, avec 4 distances Pb-O courtes et 4 longues. L'écart entre la première et la dernière distance Pb-O est de 0.48 Å. Pour l'espèce anhydre, la coordination du plomb est de 7, et la distribution des distances est encore plus grande: l'écart maximal est de = 0.47 Å. On voit bien au travers de cet exemple qu'il n'existe pas de relation entre  $N$  et  $R$ , ces trois structures, bien que constituées du même ligand, ont une distribution de distances qui leur est propre. Cette richesse d'environnements se traduit par une variété spectrale très importante en fréquence et en amplitude comme le montre la figure II-22. Ainsi, chaque composé possède une *signature spectrale unique* qui permet de l'identifier (Fig. II-22 et 23). Ceci justifie l'approche par comparaison des spectres d'échantillons inconnus avec ceux de composés de référence ou «standards» plutôt que par simulation numérique, méthode qui est mal adaptée au-delà de la première couche, sauf si la structure est bien ordonnée.

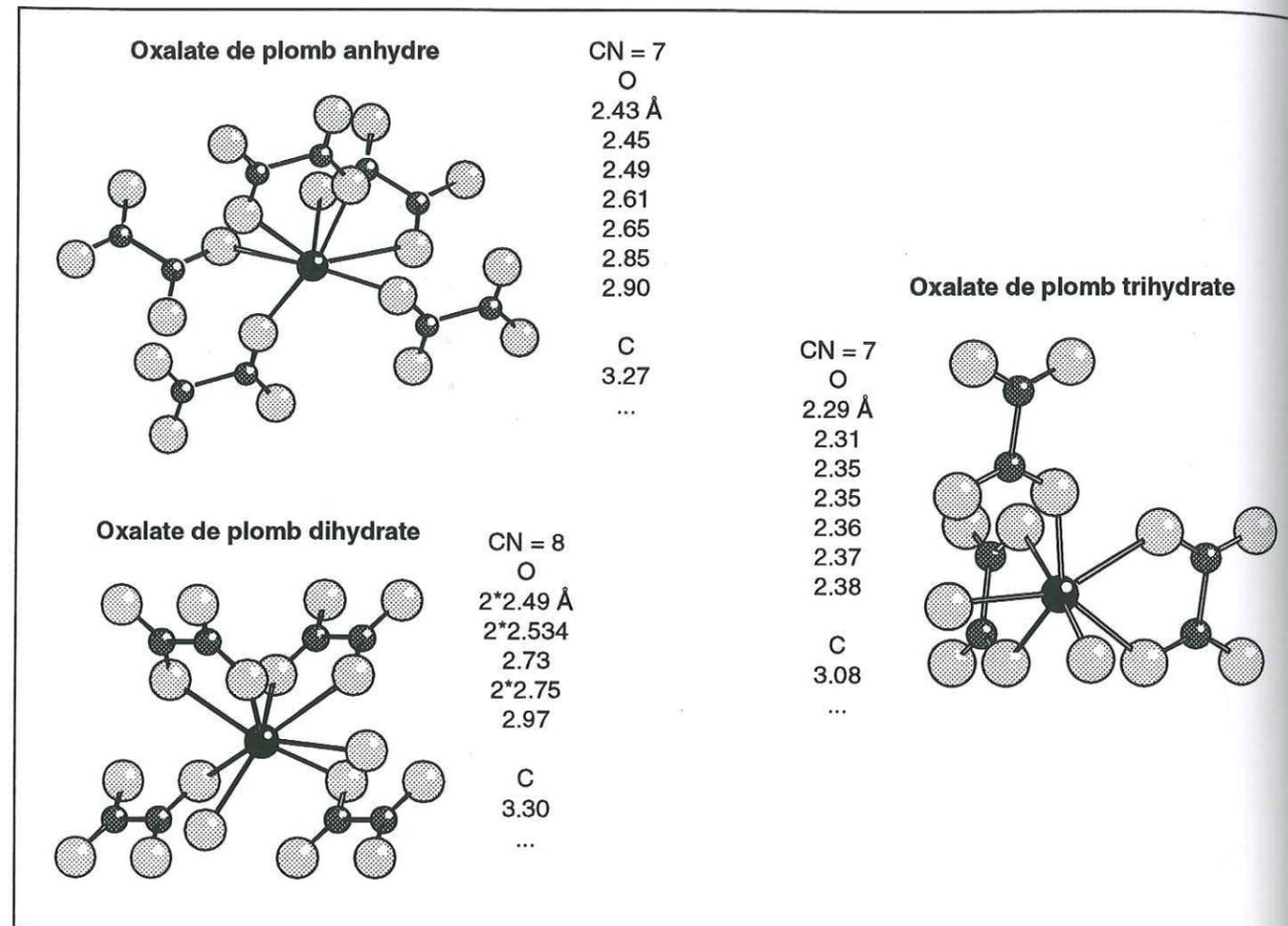


Figure II-21: Comparaison des structures d'oxalates de plomb(II)

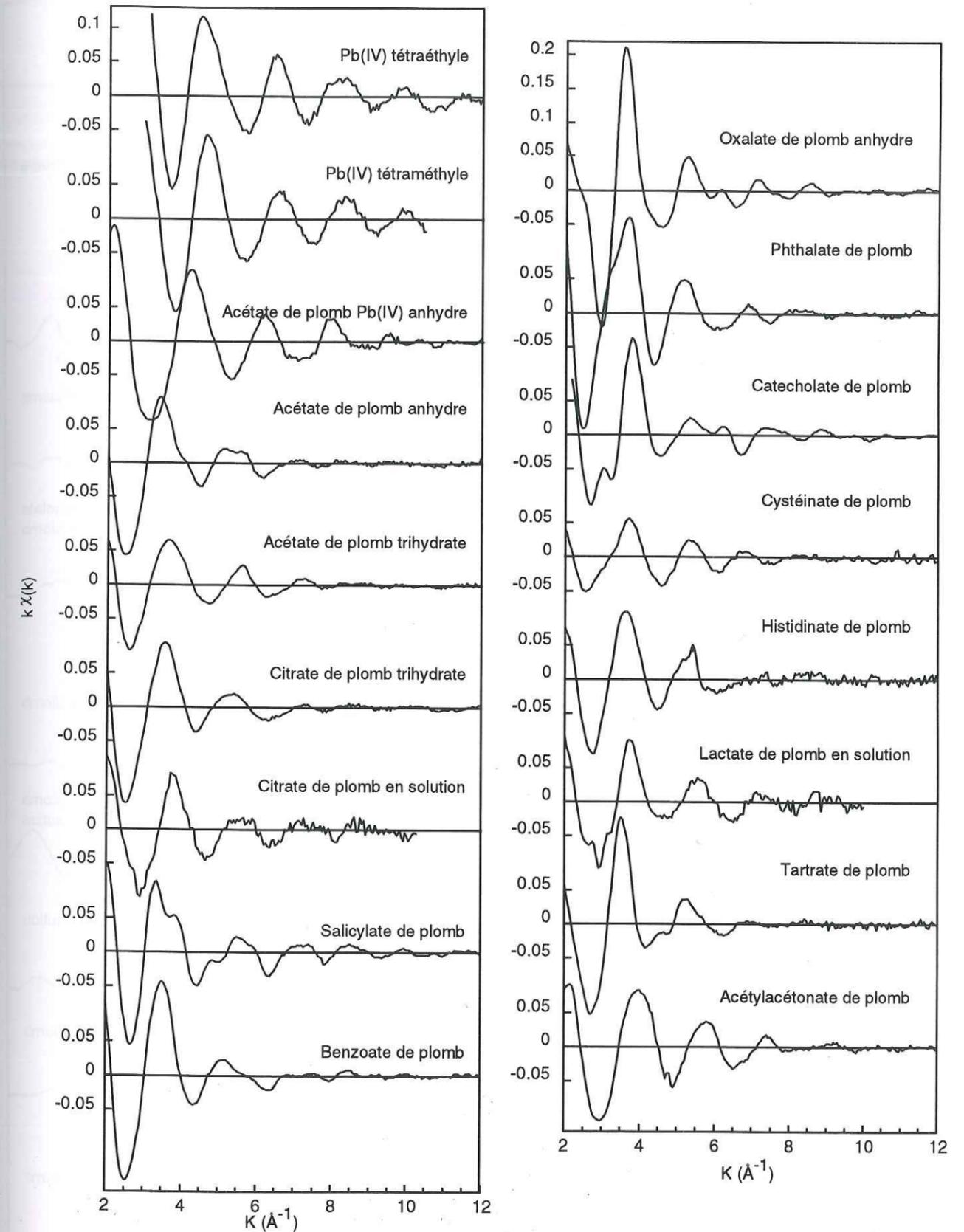
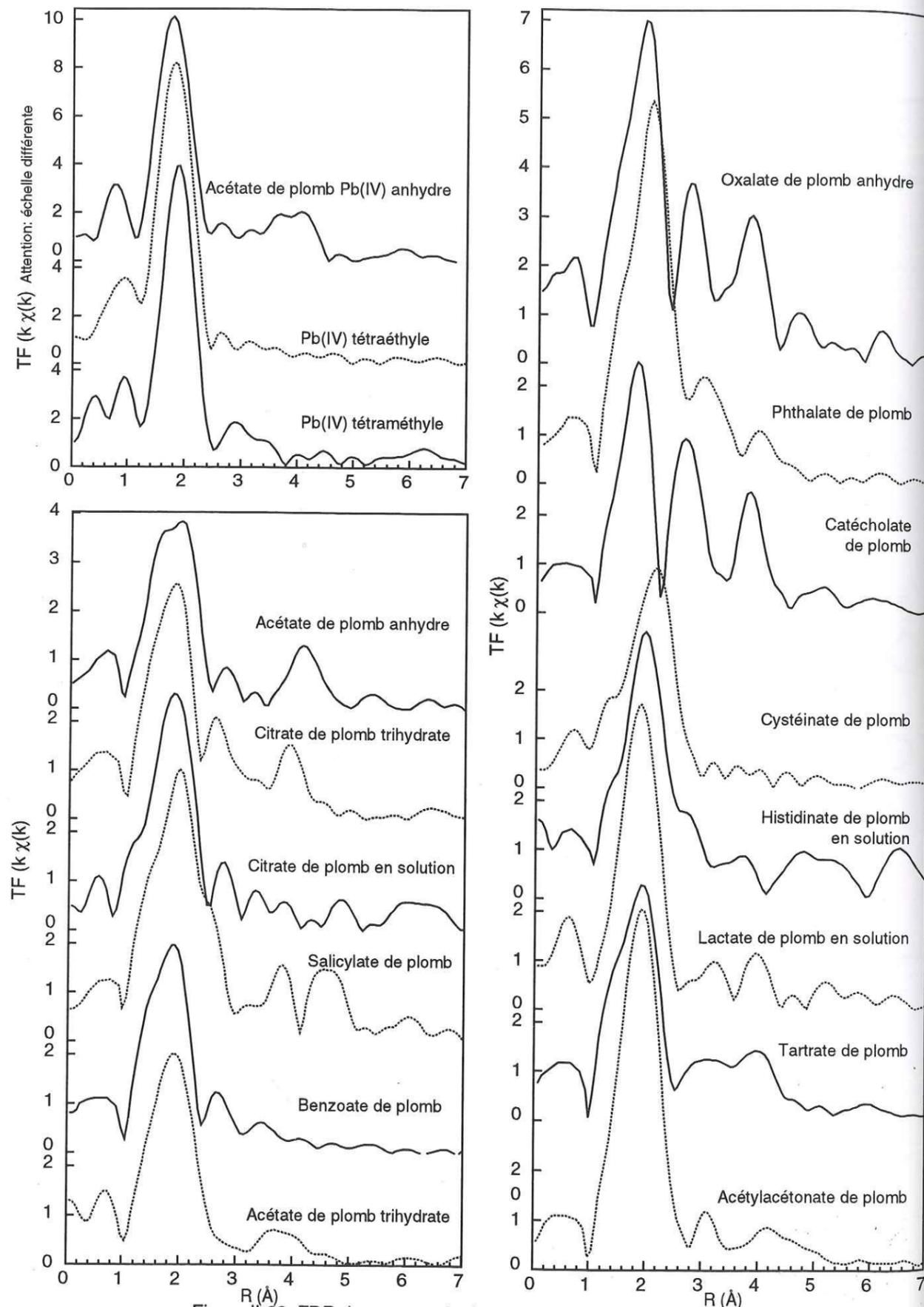


Figure II-22: Spectres EXAFS de quelques composés de référence au seuil  $L_{III}$  du plomb

Figure II-23: FDR des composés de référence au seuil  $L_{III}$  du plomb

## II.4. CONCLUSION

Le plomb et le zinc se distinguent par des chimies de coordination très contrastées. Les composés de zinc possèdent généralement des arrangements réguliers, cette géométrie se prête bien à l'analyse classique des spectres EXAFS par transformée de Fourier et simulation numérique. Cette méthode permet d'obtenir des informations structurales précises dans un rayon de 4 Å environ autour du zinc si la structure est ordonnée. A l'inverse, le plomb possède généralement un environnement très désordonné. Dans ce cas, l'étude structurale de composés inconnus peut se faire de façon semi-quantitative par comparaison avec des standards. Le plomb et le zinc sont souvent associés dans l'environnement. Au vu des différences structurales importantes entre ces deux éléments métalliques, il sera intéressant de comparer leur comportement et leur forme chimique dans le milieu naturel, et en particulier leurs mécanismes de fixation sur des complexants naturels comme les acides humiques.

## **CHAPITRE III.**

### **MECANISMES DE COMPLEXATION DU ZINC ET DU PLOMB PAR LES SUBSTANCES HUMIQUES**

## CHAPITRE III. MECANISMES DE COMPLEXATION DU ZINC ET DU PLOMB PAR LES SUBSTANCES HUMIQUES

### III.1. INTRODUCTION

Les sols et les eaux naturelles constituent les principaux puits de décharge des métaux relâchés dans l'environnement [1, 2]. La biodisponibilité de ces éléments dépend principalement de leur état physico-chimique ou spéciation. Cet état est déterminé par les paramètres thermodynamiques (pH,  $E_h$ ) et la composition chimique du milieu : les éléments traces peuvent être présents en solution ou associés (adsorbés, complexés, ou précipités) à la fraction minérale et/ou organique. L'effet des diverses phases minérales sur la mobilité des éléments traces a été abondamment étudié [68-71]. Pourtant, les composés organiques des sols peuvent aussi jouer un rôle essentiel. La composante majoritaire, et la plus stable, de la matière organique dans les sols est constituée par les substances humiques (SH). Dans un sol riche en humus, les SH peuvent être le principal agent de piégeage des métaux [72]. De même, dans une eau naturelle la matière organique peut former des complexes colloïdaux avec les métaux et assurer ainsi leur transport. Les SH interviennent donc comme acteurs essentiels à plusieurs étapes du cycle biogéochimique des éléments traces. De très nombreuses études macroscopiques ont permis de caractériser leur capacité de complexation et la stabilité des complexes métal-SH. cependant, pour une compréhension globale de ces systèmes, il est important de compléter ces connaissances par une approche microscopique visant à déterminer les mécanismes de complexation des éléments traces par les substances humiques.

Dans ce travail, nous avons donc étudié la complexation du zinc et du plomb par des acides humiques de différentes origines, à des concentrations millimolaires à micromolaires par g de matériel humique, soit une gamme s'étendant sur 3 ordres de grandeur. Le but était de caractériser la structure des complexes en fonction de la nature de l'acide humique, du métal et de sa concentration. Dans le milieu naturel les concentrations en métaux sont généralement faibles, les sites qui interagissent avec les métaux sont donc les sites de haute affinité. L'étude des échantillons faiblement concentrés, aujourd'hui possible par spectroscopie EXAFS sur les sources de 3<sup>ème</sup> génération comme l'ESRF, permet de sonder spécifiquement ces sites minoritaires de haute affinité. Dans les échantillons à plus forte concentration en métal, ces sites sont masqués.

## III.2. ETAT DES CONNAISSANCES

### III.2.1. Définitions

Les substances humiques sont des polymères naturels constitués principalement de carbone et d'oxygène. Ils résultent de l'humification, synthèse chimique et biologique de composés provenant (1) de la dégradation des plantes et de résidus animaux et (2) de l'activité des micro-organismes [73]. Les SH incluent les acides humiques (AH) et les acides fulviques (AF) qui sont définis expérimentalement en fonction de leur solubilité. Les AF sont solubles pour toute condition de pH, alors que les AH ne sont solubles que pour un pH supérieur à 2. L'humine est la fraction des SH insoluble pour toute condition de pH, donc difficilement extractible et très mal connue. La masse molaire augmente dans l'ordre  $AF < AH < \text{humine}$ . Les acides humiques possèdent une masse molaire de 10 000 à 100 000 environ, alors que celle des acides fulviques varie de 500 à 5000. Les SH peuvent être extraites à partir de sols, de sédiments, de tourbe, d'eau de rivière, de mer, de lac, ou même de boue de station d'épuration. Les méthodes d'extraction sont innombrables, mais l'IHSS (International Humic Substances Society) a défini un protocole standard [74, 75], maintenant largement adopté, qui rend les différentes SH étudiées, et donc les résultats obtenus, comparables entre eux.

### III.2.2. Genèse des substances humiques

La formation des substances humiques est toujours un sujet de débat et de recherches. On définit classiquement quatre voies possibles pour ce processus [76] (Fig. III-1). La voie 4 constitue la théorie classique des lignines : les SH sont formées par simple modification de la lignine par des micro-organismes, sans dégradation poussée de ces macromolécules jusqu'à des monomères simples. L'ordre d'apparition des composés est : humine, AH, AF. Cette théorie est maintenant considérée comme obsolète, la voie 4 serait dans la plupart des cas marginale, sauf dans le cas de sols peu drainés ou de sédiments humides. Les voies 2 et 3 illustrent la théorie plus récente des polyphénols : la lignine et les autres résidus de plantes sont d'abord attaqués par les champignons et les micro-organismes. Les produits de la décomposition sont ensuite convertis en quinones par des enzymes. Les quinones constituent les précurseurs des SH qui polymérisent finalement, seules ou avec des composés aminés. Les produits de la polymérisation sont les AF, puis les AH, puis l'humine. La voie 1 ne fait pas intervenir de composés aromatiques, mais des sucres réducteurs et des acides aminés produits par les micro-organismes, qui polymérisent sans réaction enzymatique pour former des substances humiques aliphatiques. Les voies 2 et 3 sont généralement considérées comme prépondérantes. Cependant, l'importance relative de chacune des voies dépend de la nature du sol et des conditions du milieu.

La multiplicité des réactions chimiques et des précurseurs conduisant à la formation des SH engendre la diversité très importante des polymères naturels que sont les SH (Fig. III-1).

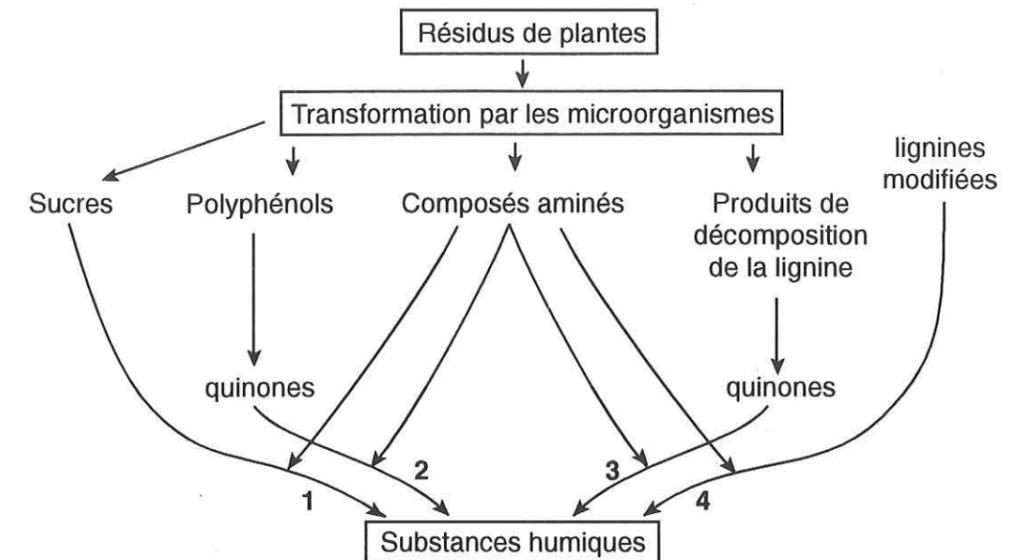


Figure III-1: Les 4 voies de formation des substances humiques (d'après Stevenson, 1994)

### III.2.3. Structure et composition des substances humiques

Les SH sont des polycondensats contenant de 50 à 70% de composés phénoliques ou benzène carboxyliques, et de 30 à 50% de chaînes peptidiques et polysaccharidiques. Il est difficile de définir une formule chimique générique à cause de leur hétérogénéité. On préfère généralement donner leur composition élémentaire (Tableau III-1).

Tableau III-1 : Gamme de concentration élémentaire (%) pour des SH extraites de sol

Elément	A. humiques	A. fulviques
C	53.8-58.7	40.7-50.6
O	32.8-38.2	39.7-49.8
H	3.2-6.2	3.8-7.0
N	0.8-4.3	0.9-3.3
S	0.1-1.5	0.1-3.6

D'après Steelink [77]

Les SH sont caractérisées par une forte densité de groupes fonctionnels, majoritairement des groupes oxygénés : carboxyles, phénols, alcools, carbonyles (Tableau III-2), mais aussi des groupes azotés (amine) et soufrés (sulfhydryle, sulfate, acide sulfonique). La nature et la

distribution de ces groupes varie selon l'origine des SH. Les AF sont globalement plus riches en groupes fonctionnels que les AH.

Tableau III-2 : Teneur des groupes fonctionnels principaux (mmol/g) pour des SH extraites de sol

Groupement	A. humiques	A. fulviques
Acidité totale	5.6-7.7	6.4-14.2
COOH	1.5-5.7	6.1-11.2
OH phénolique	2.1-5.7	0.3-5.7
OH alcool	0.2-4.9	2.6-9.5
C=O quinonique	1.4-2.6	0.3-2.0
C=O cétonique	0.3-1.7	1.6-2.7
OCH <sub>3</sub>	0.3-0.8	0.3-1.2

D'après Steelink [77]

Plusieurs auteurs ont proposé des modèles structuraux hypothétiques de SH, basés sur les données chimiques (composition élémentaire, composition en groupes fonctionnels, produits de dégradation) et les propriétés physiques des SH (taille et masse des particules) [73, 76]. L'un de ces modèles est présenté sur la figure III-2. Ces modèles aident à la représentation conceptuelle des SH, mais ne doivent pas être considérés comme des structures réelles, car ils constituent une représentation hypothétique bidimensionnelle simplifiée de macromolécules possédant une structure tridimensionnelle.

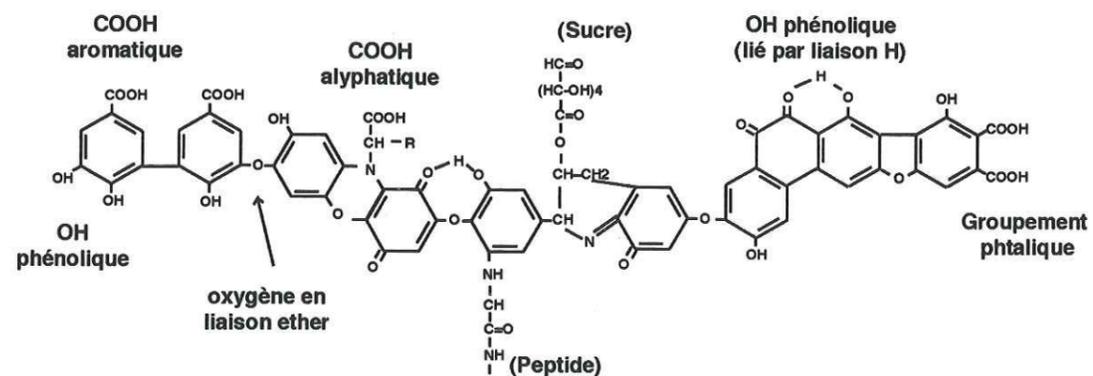


Figure III-2: Modèle structural d'acide humique (d'après Stevenson, 1994)

Les SH sont présentes en solution sous forme de colloïdes. La taille et la forme de la molécule dépendent fortement du pH et de la présence de cations : à haut pH, la forte répulsion entre les groupements chargés négativement induit l'expansion du polymère, alors qu'à bas pH, sa configuration est repliée et présente un aspect sphérique. De plus, si la molécule est hydratée, des liaisons hydrogène créent des ponts intra- et intermoléculaires qui rigidifient la molécule et donnent à la suspension des propriétés physiques proches de celles d'un gel [78]. L'approche fractale peut être utilisée pour décrire ces phénomènes et pour caractériser la structure des SH [79, 80].

La présence des groupes fonctionnels est à l'origine des propriétés acides et complexantes des SH. La figure III-3 [81] montre que la courbe de titration d'un acide humique présente des similitudes avec celle d'un mélange équimolaire d'acide acétique ( $pK_a = 4.8$ ) et de phénol ( $pK_a = 10$ ). Cependant, celle de l'acide humique est beaucoup plus plate. En effet, la constante d'acidité de chaque groupement de l'AH dépend de son environnement : la présence d'un groupement acide proche modifie l'acidité du premier. De plus, un effet dû à la nature polyélectrolytique (plusieurs groupements acides par molécule) de l'acide humique aplanit encore la courbe : la molécule se charge négativement au cours de la titration, la dissociation des protons restants devient de plus en plus difficile. Ainsi, selon Ephraïm [82], les substances humiques possèdent une distribution continue de constantes d'acidité ( $pK_a$ ). Les études les plus récentes [83-85] montrent que les AH possèdent un continuum de constantes d'acidité, avec cependant deux types prédominants ( $pK_a = 3-4$  et  $8-9$ ) correspondant probablement aux groupements carboxylique et phénolique.

La distribution des  $pK_a$  s'étendant jusqu'à des valeurs de 2 [82], les SH contiennent des groupes de type acide fort. Leenheer et al. [86, 87] ont étudié par titration,  $^{13}C$  RMN et spectroscopie IR et UV les groupes fonctionnels acides forts de l'AF de la rivière Suwannee (AF standard de l'IHSS). Ils ont montré que ces groupes fortement acides sont des groupes soufrés décrits par ailleurs par Morra [88], mais aussi des groupes carboxyles dans des configurations particulières : par exemple un acide polycarboxylique ou hydroxycarboxylique sur un cycle aromatique (type acide phtalique ou salicylique) ou sur une chaîne aliphatique (type acide oxalique ou malique), ou encore un groupement carboxyle avec des groupes électronégatifs adjacents de type éther-oxyde, ester ou cétone (Fig. III-4).

Les groupes fonctionnels des SH sont à l'origine de la réactivité de ces macromolécules et de leurs interactions multiples (sorption, coagulation, complexation, oxydoréduction) avec les éléments traces, les particules minérales, et les molécules organiques [89]. Dans ce travail, nous avons étudié la complexation du zinc et du plomb avec des AH.

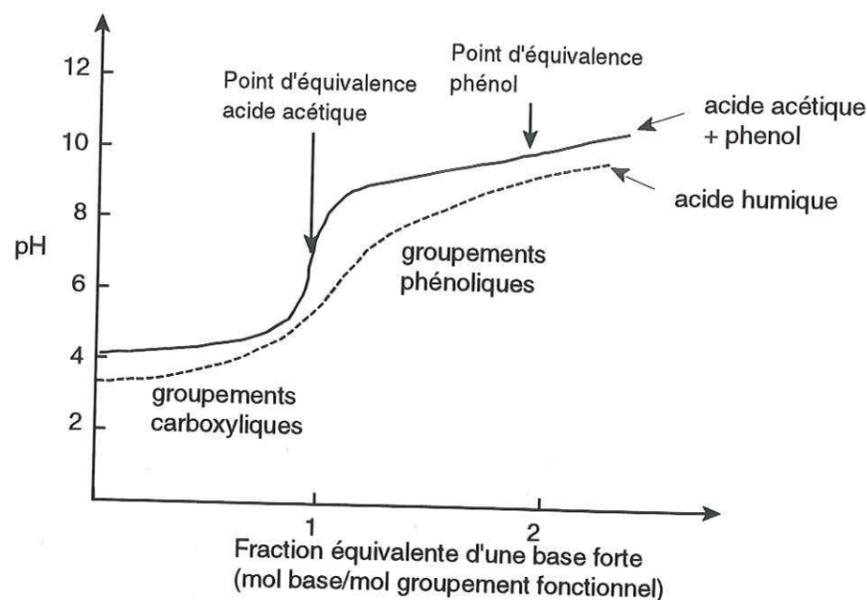
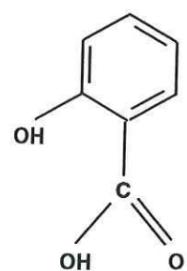
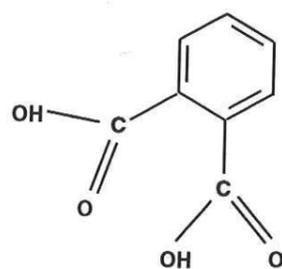


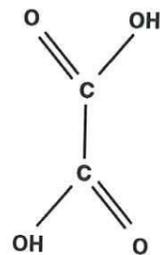
Figure III-3: Comparaison entre la courbe de titration d'une solution équimolaire ( $10^{-4}$  M) d'acide acétique ( $pK_a=4.8$ ) et de phénol ( $pK_a=10$ ) et celle d'un acide humique contenant environ  $10^{-4}$  M de groupes carboxyliques (d'après Sigg et al., 1992)



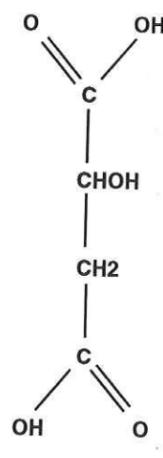
acide salicylique



acide phtalique



acide oxalique



acide malique

Figure III-4: Structure développée de quelques acides carboxyliques

### III.2.4 Interactions avec les éléments traces

Les principales caractéristiques moléculaires qui influencent la capacité de complexation des SH sont «(1) leur polyfonctionnalité, (2) leur caractère polyélectrolytique, (3) leur hydrophilicité et (4) leur faculté de former des associations intermoléculaires et de changer leur conformation» [90].

(1) La polyfonctionnalité des SH permet la formation d'un grand nombre de complexes, de stabilités différentes. Les groupes de type acide fort étant susceptibles de former des complexes très stables avec les métaux, l'affinité des métaux est donc maximale pour ces groupes. (2) A cause de la nature polyélectrolytique des AH, les constantes de complexation sont d'autant plus fortes que le rapport métal / ligand (M/L) est faible (cf. III.2.3). (3, 4) L'hydratation de la molécule induit des interactions de type liaisons hydrogènes et répulsions/attractions électrostatiques qui influencent la conformation du polymère. Par exemple, à bas pH la configuration repliée de la molécule diminue l'accessibilité aux sites. La capacité de complexation des SH est donc fortement dépendante du pH. Les métaux complexés peuvent également former des ponts inter- ou intramoléculaires qui rigidifient l'ensemble. A fort rapport M/L, cela peut conduire à la précipitation du complexe.

#### III.2.4.1. Approche macroscopique

Il existe une littérature abondante sur la détermination des constantes de complexation des SH avec les métaux. Les méthodes analytiques utilisées sont soit séparatives (chromatographie, ultrafiltration, échange ionique sur résine, dialyse), soit non-séparatives (électrodes sélectives, voltamétrie, fluorescence). Toutes ces méthodes ne sont pas équivalentes et on observe des écarts importants entre les résultats obtenus par les différentes méthodes [91, 92]. Actuellement, la méthode la plus courante utilise une électrode de pH et une électrode sélective qui mesure la concentration de métal libre en solution. Jusqu'à très récemment, les constantes de complexation déterminées étaient conditionnelles, c'est-à-dire valables pour un pH et une gamme de concentration en métal donnés, et leur distribution était discrète. Récemment, Benedetti [93] a adapté le modèle de distribution continue d'affinité protonique de De Wit [83, 94] au cas des métaux, en incluant la compétition proton-métal. Ce modèle s'applique de pH 2 à pH 12, et pour une concentration en métal de  $10^{-14}$  à  $10^{-2}$  M. Il montre que la distribution des affinités pour un métal est continue, avec deux classes d'affinités prédominantes correspondant probablement aux sites carboxyliques et phénoliques. Bryan [95] a développé un code qui permet de construire, à partir des données potentiométriques (pH et [Me]) et d'une base de données de monomères prédéfinis, le modèle de la structure d'un acide humique. Il conclut que la molécule opère probablement des réarrangements conformationnels lors de la fixation des cations, qui rendent les complexes métal-AH plus stables que ne le prévoit le modèle.

### III.2.4.2. Approche microscopique

Les données structurales et mécanistiques sur les complexes métal-SH sont encore limitées. Senesi en a récemment fait une synthèse exhaustive [73] à partir des données spectroscopiques obtenues en spectroscopie UV-visible, infrarouge (IR), Mössbauer, résonance paramagnétique électronique (RPE), résonance magnétique nucléaire (RMN), et EXAFS. Nous allons résumer les principales informations structurales obtenues à ce jour.

La spectroscopie IR a permis de mettre en évidence la déprotonation des groupes COOH en présence de nombreux métaux divalents et trivalents comme  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  [96, 97], ce qui suggère une liaison de ces métaux avec les groupements carboxyliques. Boyd [98] a étudié des complexes  $\text{Cu}^{2+}$ -AH et  $\text{Fe}^{3+}$ -AH contenant 6.85% de métal. D'après lui, la séparation des raies correspondant aux vibrations symétriques et antisymétriques des groupes  $\text{COO}^-$  suggère que la liaison avec ces groupes est de type monodentate. Cette séparation de raies a aussi été observée par d'autres auteurs pour  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . Piccolo [99] a également observé la déprotonation des groupements alcool et/ou phénol et cétone en présence de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  indiquant une liaison avec ces éléments. Par contre, la présence, dans la sphère de coordination du métal, de radicaux OH dus à l'hydrolyse du métal ou de molécules d'eau est controversée. L'étude de SH extraites à partir de boue de station d'épuration a permis d'observer un décalage des raies attribuées aux groupements sulfoniques [100] et amide [101] en présence de métaux ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ). Cela suggère l'existence de liaisons entre ces métaux et les ligands soufrés et azotés.

L'IR a donc permis d'identifier quasiment tous les ligands supposés intervenir dans la complexation des métaux. Cependant, la part importante d'interprétation lors de l'attribution des bandes constitue une source d'erreur potentielle. Pour plus de confiance, elle peut être couplée avec le blocage chimique de certains groupements [102]. Cette méthode n'est pas métallospécifique, il faut donc un rapport M/L important pour pouvoir détecter le décalage des bandes dû à la liaison entre un groupement et le métal. Enfin, elle n'est pas quantitative, c'est-à-dire qu'elle ne permet donc pas de conclure sur la spéciation globale du métal dans l'échantillon.

A ce jour, la RPE est la méthode qui a fourni les informations structurales les plus précises sur les complexes métal-SH. Senesi [103] a ainsi montré que  $\text{Fe}^{3+}$  forme deux types de complexes avec un AH : (1) des complexes de forte stabilité, où le métal occupe un site tétraédrique ou octaédrique de faible symétrie et où il est lié à des groupements carboxyliques et probablement phénoliques, (2) des complexes de faible stabilité, en configuration octaédrique de haute symétrie [103]. Les ions  $\text{Cu}^{2+}$ , quant à eux, forment des complexes de sphère interne, avec soit 4 O, soit 2 O + 2 N en coordination carrée plane. La plupart des auteurs s'accordent sur le fait

que  $\text{Mn}^{2+}$  forme des complexes de sphère externe avec les SH. La RPE apporte donc des informations structurales très précises. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle n'est applicable qu'aux cations paramagnétiques.

La spectroscopie EXAFS n'a été appliquée que très récemment à l'étude des complexes métal-SH, les articles sur le sujet sont encore très peu nombreux. Denecke [34] a étudié des complexes  $\text{UO}_2^{2+}$ -AH à des taux de complexation de 8, 10, 35 et 87%. Elle observe la même structure quel que soit le taux de complexation, l'uranium étant lié à des ligands carboxyles monodentates et à des ligands non chargés, probablement de l'eau d'hydratation. Xia [28, 104] a étudié des complexes métal-acide humique à un taux de complexation de 90%. Dans le cas du plomb, le métal est lié à 4 atomes d'oxygène, avec des distances Pb-O comprises entre 2.30 et 2.44 Å. Dans le cas du zinc, le métal est en coordination octaédrique, avec 6 oxygènes à 2.08-2.11 Å, ou 4 oxygènes et 2 soufres à 2.13 et 2.33 Å selon l'AH étudié. Ce dernier résultat, obtenu pour des taux de complexation de 90%, paraît surprenant car la teneur en soufre des SH est généralement inférieure à 1%. Un examen attentif des résultats EXAFS montre qu'il est probablement dû à une erreur dans le traitement des données. Pour Pb et Zn, Xia trouve une deuxième couche de coordination constituée par des atomes de carbone. Le nombre de voisins carbonés est faible (2 pour Pb, 2.8-3.3 pour Zn), ce qui suggère que les métaux sont partiellement hydratés, et pourrait s'expliquer par la forte concentration en métal des échantillons (taux de complexation de 90%). Cette concentration très élevée en métaux implique une très faible sensibilité aux sites de haute affinité. Ceux-ci restent donc à déterminer.

La spectroscopie EXAFS a été jusqu'à présent peu utilisée pour l'étude des complexes métal-SH malgré les atouts que sont la possibilité d'étudier tous les métaux, y compris à des teneurs très faibles et son caractère structural: la nature des sites de complexation n'est pas déterminée de façon indirecte par comparaison de spectres comme c'est le cas pour l'IR, la RMN, la RPE, mais de façon directe, grâce aux paramètres structuraux (distances interatomiques, nature et nombre de voisins) déterminés par simulation numérique. Les résultats obtenus sont donc plus fiables et plus précis.

### III.3. MATERIAUX ET METHODES

#### III.3.1. Extraction et caractérisation

Les acides humiques ont été extraits à partir d'un éventail le plus large possible de substrats (Tableau III-3).

Tableau III-3 : Description des AH étudiés

substrat	nom de l'acide humique
Sol humifère issu d'alluvions anciennes ou véracrisol	T
Charbon brun (Fluka)	F
Sol sableux podzolisé des Landes ou podzosol	M
Boue de station d'épuration	A
Tourbe [105]	P

Les acides humiques ont été extraits suivant la méthode IHSS [75]. 400g de substrat séché sont mis en suspension dans 4 l de HCl 1M sous atmosphère d'azote pendant 24h, afin de décomposer les carbonates. La suspension est centrifugée et le surnageant éliminé. Le culot est ensuite neutralisé avec NaOH 2M, agité pendant 24 h sous atmosphère d'azote et centrifugé. Le surnageant obtenu, contenant les acides humiques et fulviques, est acidifié à pH 1 avec HCl 1M et centrifugé. Le culot obtenu contient les acides humiques, le surnageant les acides fulviques. Le culot est rincé trois fois à l'eau déionisée, et dialysé à l'aide d'une membrane Spectra/Por 6 (seuil de coupure PM 1000). L'acide humique purifié en solution pouvant être dégradé par les bactéries est alors lyophilisé. Chaque acide humique a été caractérisé par une analyse élémentaire (C, N, S) par combustion et par RMN du solide ( $^{13}\text{C}$ , CP-MAS) selon la méthode décrite par Almendros [106].

#### III.3.2. Complexation

1 g d'acide humique est mis en solution dans 50 ml d'eau déionisée, le pH est fixé à 5 avec HCl et NaOH 1M. 20 ml de solution de nitrate de zinc ou de plomb à la concentration désirée et à pH 5 sont ensuite ajoutés à la solution d'acide humique, le tout est agité pendant 24h et le pH est maintenu à 5. A forte concentration en métal ( $\geq 7.6$  mmol/g) le complexe formé précipite, alors que pour les autres il reste en solution. La solution ou suspension est alors dialysée pendant 24h avec de l'eau à pH 5 (membrane Spectra/Por 6, PM 1000). Après dialyse, la concentration en métal dans la solution externe est mesurée par ICP-AES. La différence entre la quantité initiale

de métal et la quantité dans la solution externe représente la quantité fixée par l'acide humique. Les concentrations dans la solution externe sont toujours très faibles, l'essentiel du métal étant fixé par l'acide humique. La solution ou suspension contenant le complexe est alors lyophilisée, la lyophilisation ne modifiant pas la structure du complexe métal-AH [34]. La poudre ainsi obtenue est alors pressée en pastilles de 12 mm de diamètre.

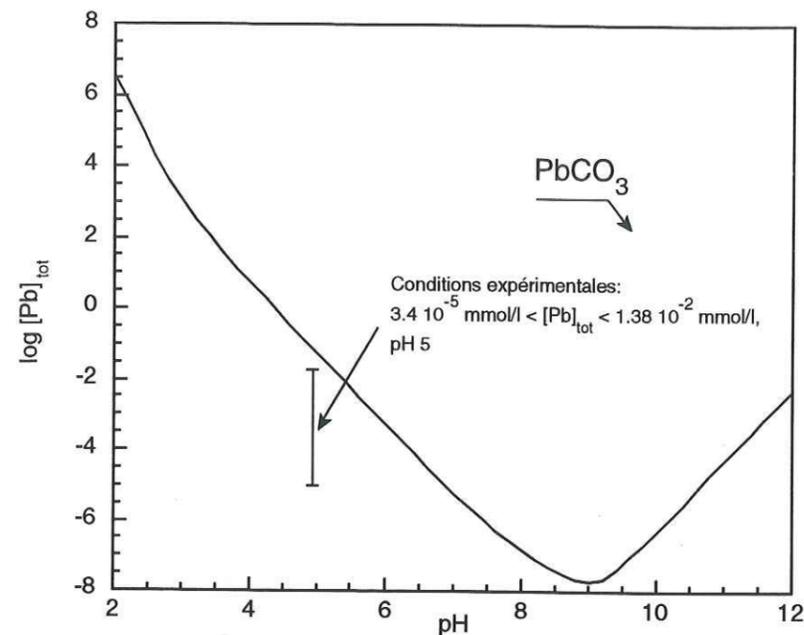
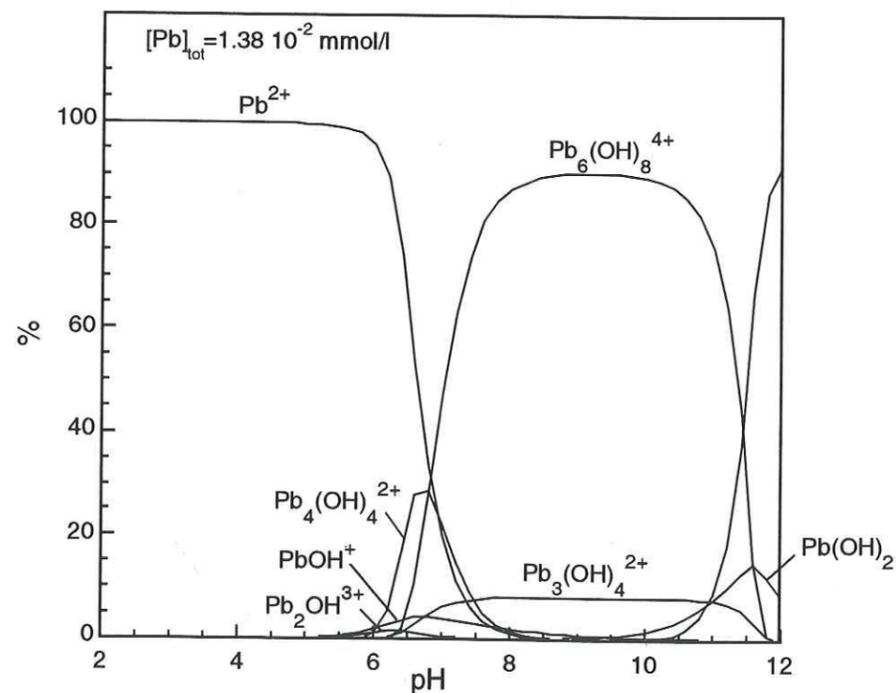
L'acidité totale des AH étudiés n'a pas été mesurée. D'après la littérature, elle est comprise entre 5.6 et 7.7 mmol/g [77]. Nous avons préparé des complexes dans la plus large gamme possible de concentration en zinc ( $3.1 \cdot 10^{-3}$  à  $7.6$  mmol/g), et une gamme un peu moins étendue pour Pb ( $2.4 \cdot 10^{-3}$  à  $9.7 \cdot 10^{-1}$  mmol/g) car à plus forte concentration se posent des problèmes d'hydrolyse de ce métal et surtout de précipitation du carbonate de plomb [107] (Tableau III-4). La figure III-5 présente la courbe de précipitation du carbonate de plomb pour une solution en équilibre avec l'atmosphère. A pH 5, la concentration maximale avant précipitation est  $[\text{Pb}]_{\text{tot}} = 5 \cdot 10^{-2}$  mmol/l. La concentration maximale utilisée pour les expériences de complexation est de  $1.38 \cdot 10^{-2}$  mmol/l. La figure III-6 montre qu'à cette concentration et à pH 5, le plomb sous forme  $\text{Pb}^{2+}$  n'est pas hydrolysé.

Tableau III-4 : Concentration en métaux des complexes Métal-AH (mmol/g)

Métal	Acide humique			
	T	F	M	A
Zn	$3.1 \cdot 10^{-3}$		$4.6 \cdot 10^{-3}$	$3.1 \cdot 10^{-3}$
	$7.6 \cdot 10^{-3}$		$7.6 \cdot 10^{-3}$	
	$7.6 \cdot 10^{-2}$	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$7.6 \cdot 10^{-2}$	$7.6 \cdot 10^{-2}$
	$4.9 \cdot 10^{-1}$	$7.6 \cdot 10^{-2}$	$4.9 \cdot 10^{-1}$	$4.9 \cdot 10^{-1}$
	7.6	7.6		7.6
Pb		P	M	A
			$4.8 \cdot 10^{-3}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$
			$4.8 \cdot 10^{-1}$	$4.8 \cdot 10^{-3}$
	$4.8 \cdot 10^{-1}$	$9.6 \cdot 10^{-1}$	$4.8 \cdot 10^{-1}$	$4.8 \cdot 10^{-1}$

#### III.3.3. Absorption X

Les spectres d'absorption X de chacun des échantillons ont été enregistrés à 15 et/ou 300K en mode de transmission ou de fluorescence selon la concentration en métal. Le détecteur de fluorescence utilisé est un détecteur Canberra à 13 éléments, le taux de comptage est de 200 000 photons/s. Pour chaque échantillon, 2 à 5 spectres de 2h ont été enregistrés selon la concentration en métal.

Figure III-5: Courbe de précipitation de  $\text{PbCO}_3$  en condition atmosphériqueFigure III-6: Diagramme d'hydrolyse de  $\text{Pb}^{2+}$ 

### III.4. RESULTATS ET DISCUSSION

#### III.4.1. Description des AH non complexés

##### III.4.1.1. Analyse élémentaire des acides humiques non complexés

Le tableau III-5 donne les concentrations élémentaires des acides humiques. Les valeurs sont en accord avec la littérature. Notons la forte teneur en N et S des acides humiques A et F.

Tableau III-5 : Composition élémentaire des acides humiques (%)

A. humique	C	N	S
T	54.0	3.2	0.2
F	57.4	5.2	2.15
M	54.6	2.5	0.1
A	53.1	7.9	0.6
P	57.1	1.3	0.6
Littérature	50-60	2-6	0-2

##### III.4.1.2. Comparaison des spectres RMN

La figure III-7 compare les spectres RMN des acides humiques étudiés non complexés (sauf P). Chaque raie correspond à une structure ou à un groupe fonctionnel particulier [106, 108]. Notons que ces spectres ne permettent pas de quantifier précisément les différents groupes fonctionnels car il n'existe pas de relation directe entre l'intensité des raies et le nombre d'entités dans la molécule. On peut cependant comparer les spectres de façon semi-quantitative. Les AH T et M ont des spectres assez proches. La raie à 110-160 ppm, attribuée aux structures aromatiques, est plus large et plus intense que pour A et F. Le degré d'aromaticité est donc plus important pour ces deux AH. Les spectres présentent aussi une raie intense à 46-110 ppm, attribuée aux groupements C-O aliphatiques. Le spectre de l'acide humique A est assez proche des deux précédents, cependant la raie attribuée aux structures aromatiques est moins large. Cette caractéristique s'explique par le fait que les acides humiques de boues de station d'épuration possèdent généralement un faible degré d'aromaticité. La raie à 160-200 ppm attribuée aux groupes carboxyles (172), cétones et aldéhydes (198) est intense elle aussi, ces groupes sont donc bien représentés dans cet AH. L'acide humique F possède un spectre à part, avec des raies très peu intenses exceptée celle correspondant aux chaînes aliphatiques. Il contient donc une moins grande quantité de groupes fonctionnels que les autres AH.

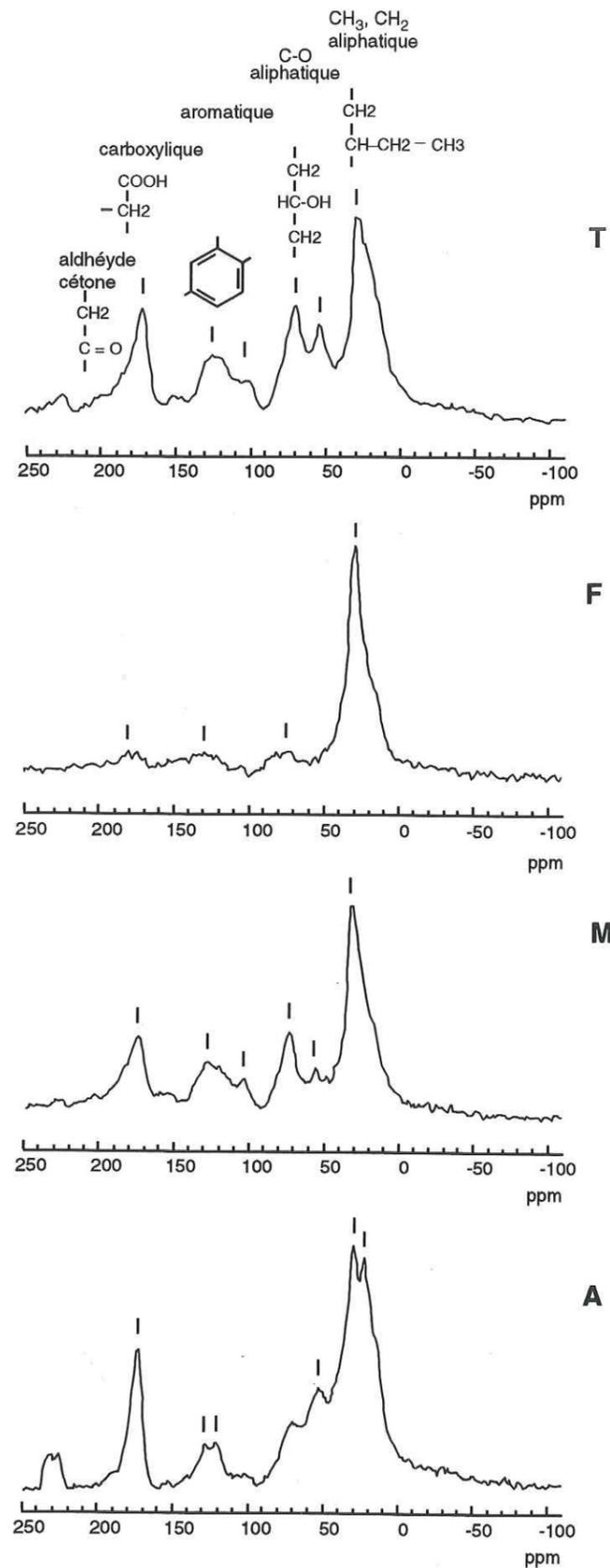


Figure III-7: Spectres RMN des acides humiques non complexés

## III.4.2. Etude des complexes Zn-AH

## III.4.2.1. Spectres EXAFS

## III.4.2.1.1. Evolution en fonction de la concentration en zinc

La figure III-8 compare les spectres EXAFS bruts des complexes Zn-AH. Pour chaque AH, on observe des différences importantes en fréquence et en amplitude en fonction de la concentration en zinc. Cette simple comparaison permet de prévoir que pour un même AH, les sites de complexation du zinc varient en fonction de la concentration en métal. Dans le cas contraire, les spectres d'un même AH seraient en effet identiques pour toutes les concentrations. A faible concentration, le zinc est fixé sur les sites de forte affinité, alors qu'à plus forte concentration, il occupe majoritairement des sites de moindre affinité.

L'amplitude des spectres pour les complexes à faible  $[Zn]$  ( $< 10^{-2}$  mmol/g) est comparable à celle de nombreux composés modèles, comme le citrate de zinc dihydrate (Fig. III-9-b). Par contre, quand la concentration en zinc augmente, on observe une diminution dramatique de l'amplitude des spectres, celle-ci étant divisée par  $\sim 3$  quand la concentration en zinc est multipliée par 100 (entre  $\sim 4 \cdot 10^{-3}$  et  $\sim 5 \cdot 10^{-1}$  mmol/g, Fig. III-8 a, c, d). Cette chute d'amplitude peut être interprétée de deux façons. (1) Le zinc occupe un seul site, dont le désordre structural augmente avec la concentration en métal. D'après nos connaissances sur la chimie de coordination du zinc, on peut affirmer qu'un tel désordre dans la structure locale du zinc est peu probable, car les polyèdres de coordination du zinc sont généralement réguliers. Il n'est probablement pas dû à une distribution des distances interatomiques au sein d'un même polyèdre. (2) La chute d'amplitude peut également être due à une distribution du zinc entre plusieurs sites de géométries différentes. Cette deuxième hypothèse est donc plus vraisemblable. A faible concentration, les sites du zinc dans un même AH ont tous une conformation semblable. La variété des environnements du métal augmente fortement avec la concentration en zinc jusqu'à  $4.9 \cdot 10^{-1}$  mmol/g.

Les spectres des échantillons à très forte concentration en métal (7.6 mmol/g, Fig. III-8a, b, d) ne suivent pas du tout l'évolution observée précédemment. Ces spectres présentent une amplitude comparable à celle des échantillons les plus dilués, mais une forme bien différente. On peut donc penser qu'à très forte concentration, le zinc occupe *majoritairement un seul type de site* (site de faible affinité), qui est différent du site de forte affinité identifié à basse concentration.

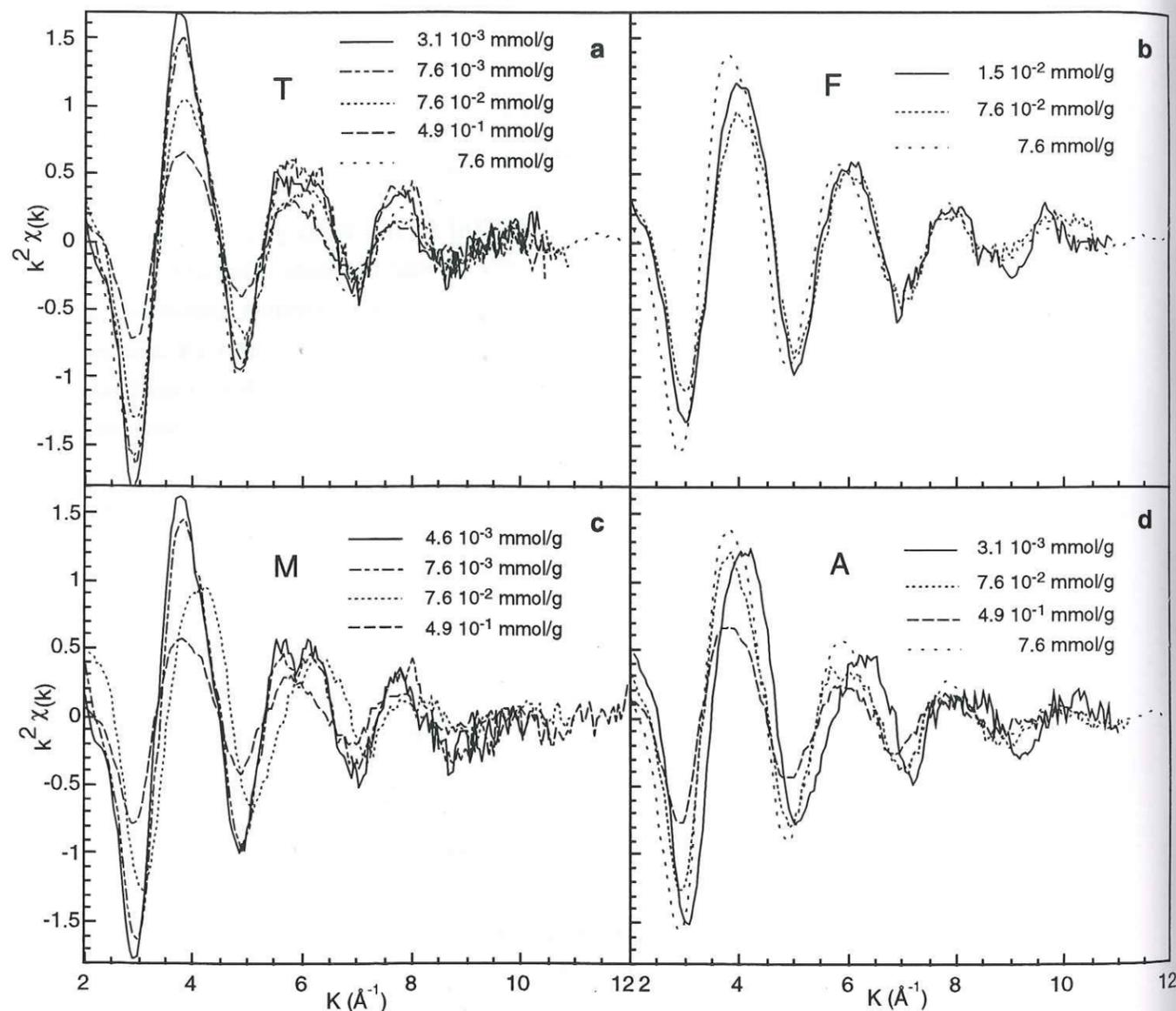


Figure III-8: Spectres EXAFS des complexes Zn-AH

### III.4.2.1.2. Comparaison des AH à concentrations en zinc équivalentes

Si on compare maintenant les spectres des différents AH pour une même concentration en zinc, on observe des différences seulement pour les faibles concentrations en zinc (jusqu'à  $7.6 \cdot 10^{-2}$  mmol/g) (Fig. III-9a, c). Aux plus faibles concentrations ( $3.1 \cdot 10^{-3}$  -  $1.5 \cdot 10^{-2}$  mmol/g), les spectres de T et M sont identiques, mais se distinguent de A et F (Fig. III-9a). Cela suggère que les sites de forte affinité sont les mêmes pour les AH M et T, mais se distinguent de ceux des échantillons A et F. Cela n'est plus valable pour  $[Zn] = 7.6 \cdot 10^{-2}$  mmol/g, concentration pour laquelle les spectres M et T sont distincts (Fig. III-9c). Pour  $[Zn] = 4.9 \cdot 10^{-1}$  mmol/g, les spectres sont tous semblables (Fig. III-9d, e). Les sites de moyenne affinité, majoritaires pour cette concentration, sont donc globalement les mêmes pour les quatre AH, et comportent une diversité structurale importante. Pour  $[Zn] = 7.6$  mmol/g, les spectres sont semblables, mais de forte amplitude. Les sites de faible affinité, majoritaires à cette concentration, sont donc les mêmes pour les trois AH, et ils ont tous la même géométrie contrairement aux sites de moyenne affinité. Nous allons tenter d'identifier ces différents complexes, en comparant dans un premier temps les spectres EXAFS à ceux de composés de référence.

### III.4.2.1.3. Comparaison avec les composés de référence

D'après la littérature, on sait que les ligands des AH peuvent être de type soufrés, aminés ou oxygénés [73, 109]. A pH 5, les groupements aminés ne sont pas déprotonés et n'interviennent donc pas dans la complexation du métal. Nous avons comparé les spectres des complexes Zn-AH avec ceux de nombreux composés modèles du zinc (cf. II.2.2.2). La comparaison avec le spectre du complexe Zn-cystéine, où le métal est lié à des groupes SH, montre un écart de fréquence important, qui permet de conclure que le zinc n'est pas lié à des groupements soufrés (Fig. III-9b). Par contre, les spectres des complexes Zn-AH sont en phase avec ceux de complexes Zn-acides carboxyliques comme le citrate de zinc. Cela suggère que le zinc est lié majoritairement à des groupements oxygénés de l'AH (COOH et/ou OH). Cependant, aucun accord spectral satisfaisant n'a été trouvé entre un composé de référence (salicylate, benzoate, citrate, acétate de zinc, etc...) et un complexe Zn-AH. Cela montre que les complexes formés ne possèdent pas un type unique de ligand comme c'est le cas pour les composés de référence. Cela peut être expliqué par la nature polyfonctionnelle des HA. A cause de cette grande diversité des groupes, la probabilité qu'un site soit constitué par des groupes d'un seul type (par exemple uniquement des groupes de type acétate) est faible. Chaque atome de zinc est donc probablement lié simultanément à plusieurs types de ligands comme par exemple un groupement COOH aromatique, un COOH aliphatique, etc... En conséquence, un spectre de référence, ou une combinaison linéaire de spectres de composés modèles ne peuvent reproduire cet environnement original. Une combinaison linéaire de spectres a un sens dans le cas d'un sol pollué par exemple, où le métal peut être inclus dans plusieurs phases minérales distinctes [110], mais pas dans le cas d'une macromolécule polyfonctionnelle comme un AH, pour laquelle il faut imaginer

une structure inédite pour l'environnement du zinc. Pour caractériser les différentes structures, il faut donc déterminer les paramètres structuraux par simulation numérique.

III.4.2.2. Paramètres structuraux

Il faut avant tout garder à l'esprit que l'information structurale obtenue est une information moyennée sur tous les atomes de zinc présents dans l'échantillon. Si le zinc occupe plusieurs types de sites, le désordre structural est important et l'hypothèse d'harmonicité de la distribution des distances peut ne plus être valable. Le nombre de voisins atomiques  $N$  déterminé serait alors être inférieur au nombre réel de voisins. La discussion sur la structure des complexes s'appuiera donc principalement sur les distances interatomiques moyennes  $\langle R \rangle$ , et pas sur  $N$  dont la valeur peut être sous-estimée.

III.4.2.2.1. Complexes à faible [Zn] ( $3.1 \cdot 10^{-3}$ - $1.5 \cdot 10^{-2}$  mmol/g)

Les résultats des simulations numériques confirment que pour les quatre acides humiques, et à toutes les teneurs en métal dans cette gamme de concentration, la première sphère de coordination du zinc est composée majoritairement d'atomes d'oxygène (Tableaux III-6 à III-9). Elle ne contient pas d'atomes de soufre, car dans ce cas, on aurait identifié une sous-couche vers 2.3 Å (cf. II.2). Ce point est à souligner car les groupes fonctionnels soufrés sont souvent décrits comme des groupes fortement complexants des AH. Pour un échantillon contenant  $3.1 \cdot 10^{-3}$  mmol/g de Zn, si on suppose que l'AH contient 1% de S ( $\sim 3 \cdot 10^{-1}$  mmol/g), le rapport molaire S/Zn est de 100. Or, bien que S soit très largement en excès par rapport à Zn, il n'est pas lié au métal. Pour expliquer ce comportement, on peut supposer que certains atomes de soufre ne sont pas en position terminale (comme par exemple des atomes S formant des ponts disulfure), et ne constituent donc pas tous un ligand potentiel pour Zn. Mais ce résultat montre surtout la plus forte affinité du zinc pour les groupements oxygénés que pour les groupements soufrés, ou à la rigueur des affinités comparables pour les deux types de groupements. Cela est en accord avec les travaux de Leenheer [86, 87], qui a montré que des groupements carboxyles dans des configurations particulières pouvaient créer des sites de type acide fort ( $pK_a < 2$ ), qui possèdent donc une forte affinité pour les métaux.

D'après l'étude des composés modèles du zinc (cf. II.2.2.2), on sait que ce métal peut être en coordination tétraédrique, avec  $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle_{\text{tet.}} = 1.95 \text{ \AA}$ , ou octaédrique, avec  $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle_{\text{oct.}} = 2.10 \text{ \AA}$ . La comparaison entre la FDR de ZnO (coordinance 4) et de  $\text{Zn}^{2+}$  en solution aqueuse (coordinance 6) montre que l'écart entre ces deux distances est visible sur la position du premier pic de la FDR (module de la transformée de Fourier), mais encore davantage sur la partie imaginaire de la transformée de Fourier (Fig. III-10). La comparaison des FDR des différents complexes Zn-AH entre eux montre des décalages notables de la partie imaginaire, ce qui suggère des différences de coordiance, confirmées par les simulations numériques. Pour A,  $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle = 2.02 \text{ \AA}$ . On conclut que les complexes sont à  $50\% \pm 10\%$  tétraédriques et à  $50\% \pm$

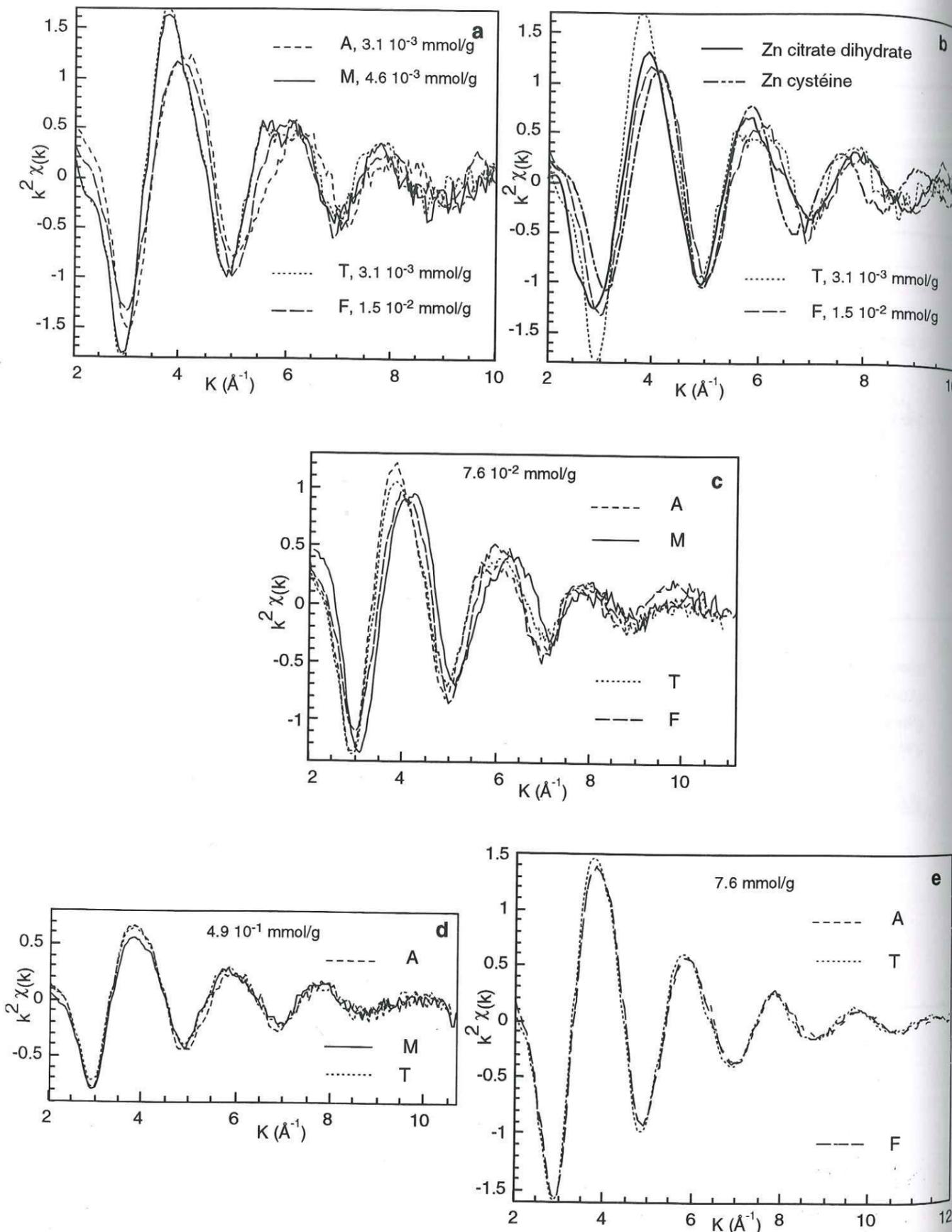


Figure III-9: Comparaison des spectres Zn-AH pour des concentrations en zinc comparables

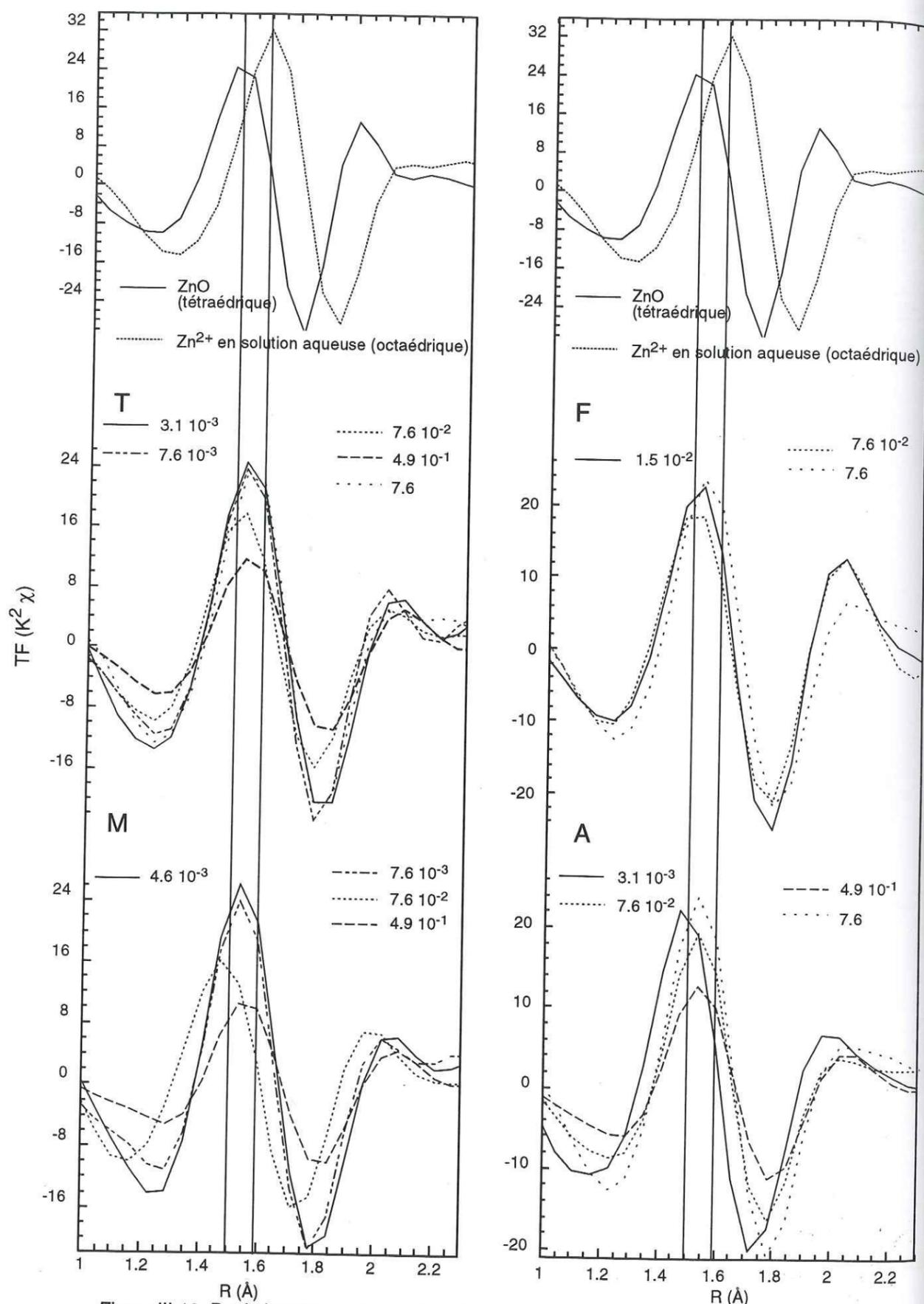


Figure III-10: Partie imaginaire du premier pic de la FDR des complexes Zn-AH ([Zn] en mmol/g)

10% octaédriques. Pour M et T,  $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle = 2.07\text{-}2.08 \text{ \AA}$  et ces complexes sont majoritairement ( $80\% \pm 10\%$ ) octaédriques. Pour F,  $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle = 2.04 \text{ \AA}$ , cet échantillon est intermédiaire entre les deux précédents.

Les FDR des complexes présentent toutes un deuxième pic, voire un troisième, important à  $R+\Delta R = 2.2\text{-}4.0 \text{ \AA}$  (Fig. III-11). Les simulations numériques ont montré qu'il s'agissait d'atomes de carbone. La structure est identique pour les échantillons T et M  $3.1 \cdot 10^{-3}$  -  $7.6 \cdot 10^{-3}$  mmol/g, avec deux couches de carbones à  $2.90 \text{ \AA}$  et  $3.95 \text{ \AA}$  environ. L'échantillon A  $3.1 \cdot 10^{-3}$  mmol/g présente deux couches de carbone plus proches l'une de l'autre ( $2.95$  et  $3.37 \text{ \AA}$ ), qui ne sont pas séparées sur la FDR présentant un seul pic asymétrique (Fig. III-11). L'échantillon F à  $1.5 \cdot 10^{-2}$  mmol/g possède une seule couche de carbone à  $3.38 \text{ \AA}$ . Le léger épaulement à droite du premier pic n'a pas de signification structurale, sa contribution ne se détachant pas du bruit du spectre total.

Pour chaque complexe,  $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle$  et  $d(\text{Zn-C})$  ont été reportées sur la figure III-12. La comparaison avec la figure II-1 indique que les distances interatomiques des complexes Zn-AH sont typiques des ligands carboxyliques. Aucun complexe ne présentant une distance Zn-C courte ( $2.5\text{-}2.6 \text{ \AA}$ ), caractéristique de ligands carboxyles bidentates (cf. II.2.2.2), les ligands de haute affinité pour le zinc sont donc *majoritairement des groupements carboxyles monodentates* et ce pour tous les AH.

Notons que les complexes peuvent être partiellement hydratés : les ligands du zinc sont alors des groupements  $\text{COO}^-$  et des molécules d'eau. Le nombre d'atomes de carbone dans la deuxième couche atomique est plus faible pour un complexe hydraté que pour un complexe anhydre, mais, compte tenu de l'incertitude sur  $N$ , la présence de molécules d'eau peut difficilement être détectée sur cette base. Par contre, l'étude des composés de référence du zinc a montré que les complexes hydratés possèdent généralement des coordinences octaédriques, alors que les complexes tétraédriques sont anhydres (voir Fig. II-1). On peut donc supposer que les échantillons Zn-A et Zn-F contiennent des sites anhydres et hydratés, alors que Zn-M et Zn-T contiennent majoritairement des sites hydratés.

#### III.4.2.2.2. Complexes à [Zn] intermédiaire ( $7.6 \cdot 10^{-2}$ mmol/g)

Pour cette concentration en zinc, l'amplitude des spectres est plus faible (Fig. III-9c). Cependant, on observe des différences notables entre les structures des différents complexes. Les complexes Zn-A et Zn-T sont majoritairement octaédriques ( $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle = 2.07$  et  $2.06 \text{ \AA}$  respectivement), par contre le complexe Zn-M est fortement tétraédrique ( $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle = 2.01 \text{ \AA}$ ), et Zn-F est intermédiaire ( $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle = 2.03 \text{ \AA}$ ) (Tableaux III-6 à III-9). La couche de carbone se répartit en deux sous-couches bien individualisées pour T et A (Fig. III-11a et d), et beaucoup moins bien pour M et F (Fig. III-11b et c), c'est pourquoi la simulation a été réalisée à

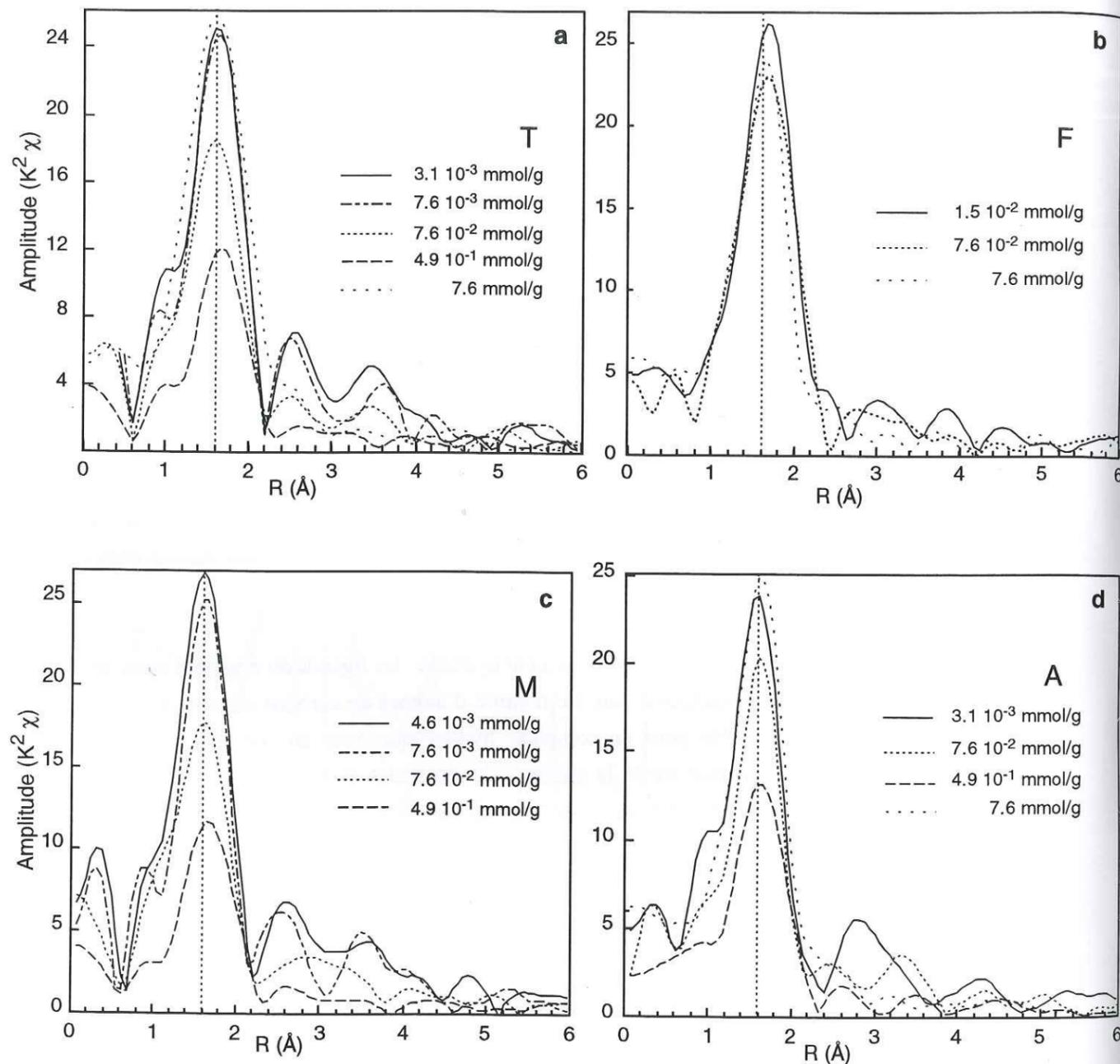


Figure III-11: Fonctions de distribution radiée des complexes Zn-AH

une seule couche pour les deux derniers. Là aussi, toutes les distances Zn-C sont nettement supérieures à 2.6 Å. On conclut que les ligands carboxyles sont toujours monodentates à cette concentration. Cependant, il est manifeste que dans les échantillons M et T, les sites de complexation du zinc ont évolué depuis les très faibles jusqu'aux moyennes concentrations, et qu'ils ne sont plus identiques entre eux. Notons que pour M, la proportion de sites tétraédriques augmente avec la concentration, ce qui n'est pas le cas pour les autres AH.

#### III.4.2.2.3. Complexes à forte [Zn] ( $4.9 \cdot 10^{-1}$ mmol/g)

Pour cette concentration, tous les spectres sont semblables et présentent une amplitude très faible (Fig. III-9d), ce qui témoigne de l'existence d'un grand nombre de sites de complexation présentant des géométries différentes. La simulation numérique montre que  $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle$  est comprise entre 2.06 et 2.08 Å. La coordinence est donc majoritairement octaédrique. Comme le signal obtenu est la moyenne de tous les sites du zinc, il est difficile d'obtenir des informations structurales plus précises, notamment en ce qui concerne la deuxième couche de coordination. On peut cependant conclure que les sites d'affinité moyenne, majoritaires à cette concentration, sont *essentiellement octaédriques*.

#### III.4.2.2.4. Complexes à très forte [Zn] (7.6 mmol/g)

Nous avons vu que l'amplitude des spectres EXAFS à cette concentration était comparable à celle mesurée aux concentrations les plus basses, ce qui suggère que le zinc est présent sous une forme majoritaire à très haute comme à basse concentration (Fig. III-9a et e). Si on compare la FDR des complexes Zn-T aux concentrations extrêmes ( $3.1 \cdot 10^{-3}$  mmol/g et 7.6 mmol/g), on constate que le premier pic est identique (Fig. III-13). La simulation numérique de la première sphère de coordination montre que dans les deux échantillons, le zinc est majoritairement en coordinence octaédrique ( $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle = 2.07\text{-}2.08$  Å, Tableau III-6). Par contre, les deux FDR se distinguent au niveau de la deuxième couche, l'échantillon concentré ne possédant quasiment pas de deuxième pic. Par contre, un très bon accord existe entre les transformées de Fourier (module et partie imaginaire) de  $\text{Zn}^{2+}$  en solution aqueuse (pH 3) et du complexe à forte concentration. On sait que  $\text{Zn}^{2+}$  en solution est solvaté par 6 molécules d'eau, et ne possède pas de deuxième couche de coordination (cf. II.2.2.1). On peut donc en conclure que dans l'échantillon à 7.6 mmol/g, la majorité du zinc ne possède pas d'atomes de carbone en seconds voisins, ce qui indique qu'il n'est pas lié de façon covalente avec des groupements de l'AH. La FDR de ce complexe ne présente pas non plus de pic à plus grande distance, qui indiquerait la présence d'atomes de zinc. Cela montre que le métal n'est pas polymérisé ou précipité. Toutes ces observations s'appliquent également aux échantillons A et F (M n'a pas été préparé à cette concentration).

On conclut qu'à forte concentration en zinc, le métal est solvaté par 6 molécules d'eau. La liaison entre le métal et l'AH est donc une liaison faible de type liaison hydrogène ou attraction

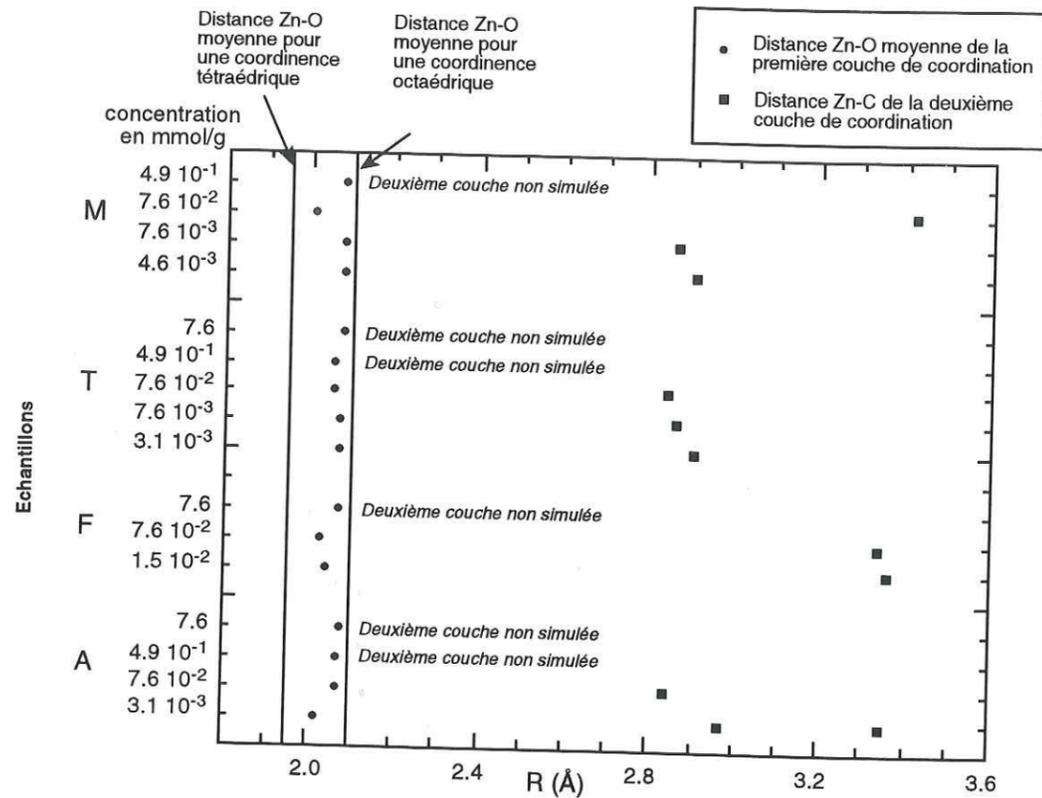


Figure III-12: Distribution radiale autour du zinc dans les complexes Zn-acides humiques

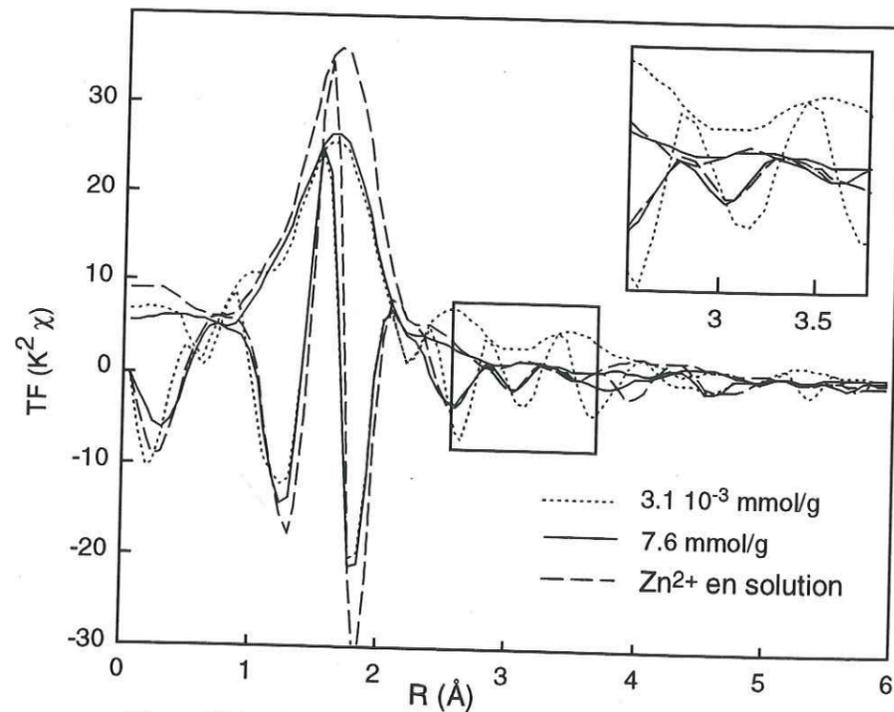


Figure III-13: Comparaison entre les FDR des complexes Zn-AH T et de Zn<sup>2+</sup> en solution aqueuse

électrostatique. On peut donc parler de *complexe de sphère externe*, bien que les complexes de sphère interne identifiés aux plus faibles concentrations soient toujours présents, mais désormais minoritaires. Leur contribution est décelable par l'amplitude plus faible du premier pic de la FDR des complexes Zn-AH par rapport à Zn<sup>2+</sup> en solution aqueuse.

Tableau III-6 : Paramètres structuraux déterminés pour les complexes Zn-T.

[Zn] (mmol/g)	1 <sup>re</sup> couche (O)					2 <sup>me</sup> couche (C)			
	R (Å)	N	Δσ (Å)	<d(Zn-O)> (Å)	Q	R (Å)	N	Δσ (Å)	Q
3.1 10 <sup>-3</sup>	2.03	3.0	0.00			2.90	1.9	0.00	
	2.17	1.4	0.00	2.07	0.004	3.95	6.0	0.02	0.01
7.6 10 <sup>-3</sup>	2.03	3.0	0.00			2.86	1.8	0.00	
	2.17	1.4	0.00	2.07	0.004	3.93	4.5	0.02	0.01
7.6 10 <sup>-2</sup>	2.02	2.4	0.00			2.84	1.1	0.02	
	2.17	1.0	0.00	2.06	0.006	3.85	2.0	0.02	0.02
4.9 10 <sup>-1</sup>	2.06	1.8	0.01	2.06	0.004	-	-	-	-
7.6	2.04	3.5	0.00			-	-	-	-
	2.16	1.6	0.00	2.08	0.005	-	-	-	-

Pour tous les complexes Zn-AH, la simulation a été faite en utilisant les fonctions d'amplitude et de déphasage expérimentales extraites de ZnO pour la première couche, et de l'oxalate de zinc dihydrate pour la deuxième.  $Q = \sum (k^2 \chi_{exp} - k^2 \chi_{th})^2 / \sum (k^2 \chi_{exp})^2$ .

Tableau III-7 : Paramètres structuraux déterminés pour les complexes Zn-F.

[Zn] (mmol/g)	1 <sup>re</sup> couche (O)					2 <sup>me</sup> couche (C)			
	R (Å)	N	Δσ (Å)	<d(Zn-O)> (Å)	Q	R (Å)	N	Δσ (Å)	Q
1.5 10 <sup>-2</sup>	1.99	2.4	0.00			3.38	1.6	0.01	0.02
	2.10	1.8	0.00	2.04	0.004	-	-	-	-
7.6 10 <sup>-2</sup>	1.98	2.3	0.00			3.34	1.4	0.00	0.04
	2.11	1.5	0.00	2.03	0.005	-	-	-	-
7.6	2.03	3.1	0.01			-	-	-	-
	2.16	1.6	0.01	2.07	0.006	-	-	-	-

Tableau III-8 : Paramètres structuraux déterminés pour les complexes Zn-M.

[Zn] (mmol/g)	1 <sup>re</sup> couche (O)					2 <sup>me</sup> couche (C)			
	R (Å)	N	Δσ (Å)	<d(Zn-O)> (Å)	Q	R (Å)	N	Δσ (Å)	Q
4.6 10 <sup>-3</sup>	2.03	3.2	0.00			2.90	1.9	0.00	
	2.18	1.7	0.00	2.08	0.004	3.97	5.4	0.02	0.02
7.6 10 <sup>-3</sup>	2.04	3.0	0.00			2.86	1.8	0.01	
	2.18	1.1	0.00	2.08	0.006	3.95	5.6	0.01	0.01
7.6 10 <sup>-2</sup>	1.94	1.6	0.00			3.40	2.2	0.01	0.03
	2.07	1.7	0.00	2.01	0.005	-	-	-	-
4.9 10 <sup>-1</sup>	2.08	1.5	0.00	2.08	0.006	-	-	-	-

Tableau III-9 : Paramètres structuraux déterminés pour les complexes Zn-A.

[Zn] (mmol/g)	1 <sup>ère</sup> couche (O)					2 <sup>ème</sup> couche (C)			
	R (Å)	N	$\Delta\sigma$ (Å)	$\langle d(\text{Zn-O}) \rangle$ (Å)	Q	R (Å)	N	$\Delta\sigma$ (Å)	Q
3.1 10 <sup>-3</sup>	1.98	2.6	0.00			2.95	1.5	0.02	
	2.11	1.0	0.00	2.02	0.004	3.36	3.0	0.02	0.03
7.6 10 <sup>-2</sup>	2.03	2.4	0.00			2.84	1.0	0.002	
	2.17	1.0	0.00	2.07	0.005	3.86	2.7	0.002	0.03
4.9 10 <sup>-1</sup>	2.03	1.0	0.00			-	-	-	-
	2.12	1.0	0.00	2.07	0.006				
7.6	2.03	3.2	0.00			-	-	-	-
	2.17	1.8	0.00	2.08	0.004				

## III.4.2.3. Synthèse des résultats

Les résultats EXAFS montrent que les complexes à forte stabilité (observables dans les échantillons où  $[\text{Zn}] < 1.5 \cdot 10^{-2}$  mmol/g) sont des complexes de sphère interne où le zinc est lié à des groupements *carboxyles monodentates*. A faible concentration en zinc, la coordinence est octaédrique pour les AH M et T, et mixte (tétraédrique et octaédrique) pour les AH A et F. A plus forte concentration ( $4.9 \cdot 10^{-1}$  mmol/g), la coordinence du zinc est majoritairement octaédrique, et la variété des sites est très grande. L'important désordre structural n'a pas permis d'obtenir des informations précises sur la structure de ces complexes intermédiaires, cependant on peut affirmer que la majorité du zinc forme des complexes de sphère interne, car dans le cas contraire, la présence de zinc solvaté, possédant un seul type d'environnement, aurait induit une forte augmentation de l'amplitude des spectres comme cela est observé pour les échantillons les plus concentrés.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Senesi [103] obtenus par RPE sur des complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -AH. Il a observé deux types de complexes : (1) des complexes de forte stabilité, où le métal occupe un site tétraédrique ou octaédrique de faible symétrie, et où il est lié à des groupements carboxyliques et probablement phénoliques, et (2) des complexes de faible stabilité, de configuration octaédrique et de haute symétrie. Dans le cas du fer, comme dans celui du zinc, les complexes hydratés sont généralement en coordinence octaédrique, alors que les coordinences tétraédriques concernent le plus souvent des complexes anhydres. Les résultats concordants de ces deux études permettent de proposer des modèles structuraux pour les complexes Zn-AH (Fig. III-14).

Dans les complexes de forte stabilité, le métal est lié exclusivement (coordinence tétraédrique) ou quasi exclusivement (coordinence octaédrique) à des groupements fonctionnels de l'AH. La symétrie du polyèdre dépend de la nature chimique des différents ligands, et des effets stériques au sein de la macromolécule. On peut penser que la coordinence tétraédrique correspond aux sites de plus haute affinité, minoritaires. A faible concentration, les sites tétraédriques sont

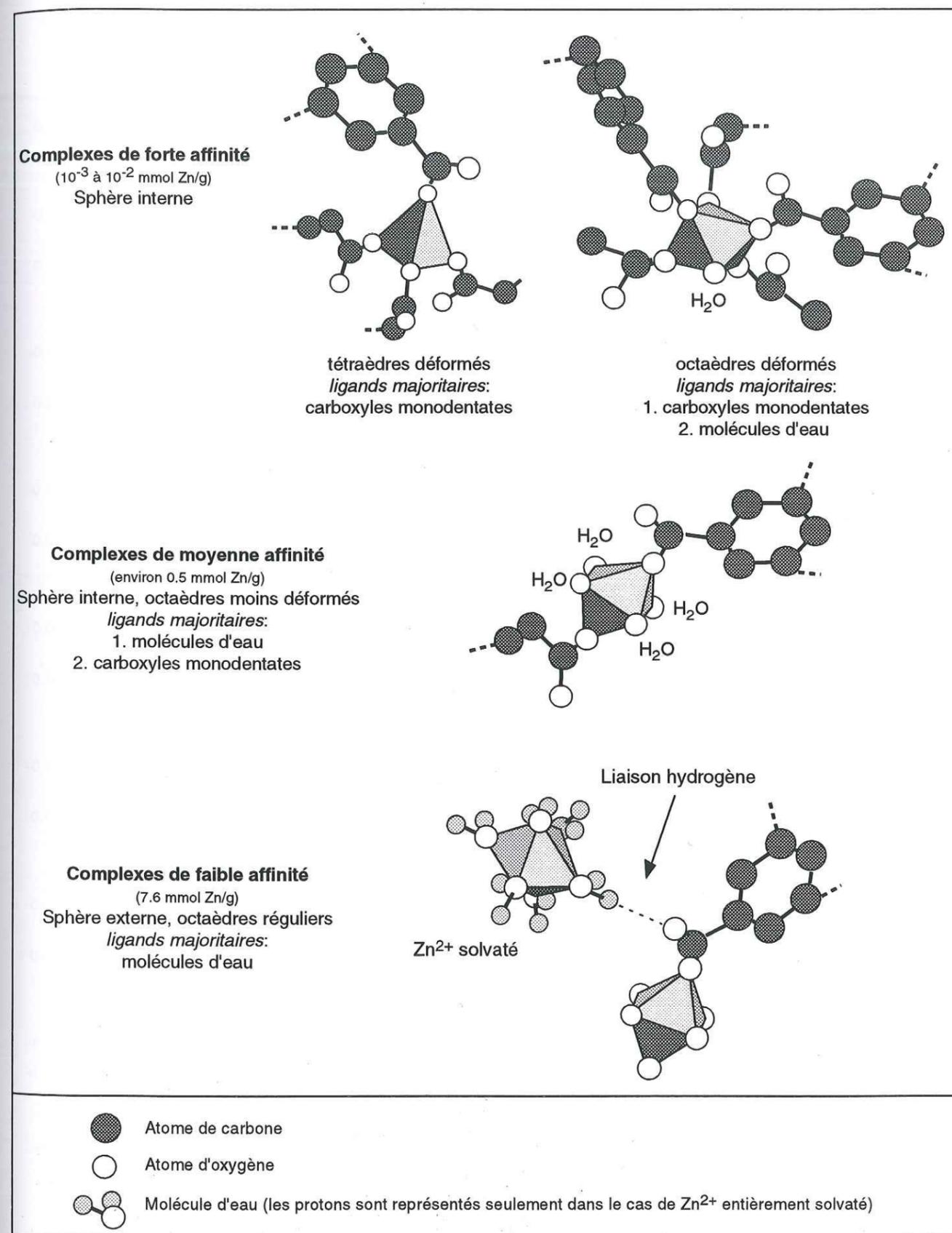


Figure III-14 : Modèles structuraux pour les complexes Zn-AH

majoritaires dans les HA A et F, mais sont déjà minoritaires dans les AH M et T. L'étude d'échantillons à concentration encore plus faible en métal pourrait permettre de confirmer cette hypothèse dans le cas où la majorité du zinc possède alors une coordinence tétraédrique. Seul le complexe Zn-M à  $7.6 \cdot 10^{-2}$  mmol/g n'est pas conforme à cette hypothèse, nous n'avons pas d'interprétation structurale pour cet échantillon. Dans les complexes de moins forte stabilité l'hydratation du complexe est plus importante, le polyèdre étant probablement un octaèdre moins déformé, les molécules d'eau pouvant se positionner librement autour du métal. La faible amplitude des spectres EXAFS pour les échantillons à  $4.9 \cdot 10^{-1}$  mmol/g de zinc est expliquée par la présence d'une importante variété de complexes, de forte à faible stabilité, donc de géométries différentes. La stabilité des complexes dépend donc de la nature des groupes fonctionnels de l'AH, ainsi que du degré d'hydratation du complexe. On peut penser que globalement, cette stabilité diminue quand le rapport ligands  $H_2O$  / ligands humiques augmente. Le cas limite est le complexe de sphère externe, observé à très forte concentration en zinc ( $7.6$  mmol/g), où l'essentiel du métal est solvate par 6 molécules d'eau.

Les modèles structuraux proposés sont bien évidemment des représentations types de la structure réelle des complexes Zn-AH, les combinaisons possibles entre les ligands (COOH aromatique, COOH aliphatique,  $H_2O$ ) étant très nombreuses. Cependant, ces modèles permettent de visualiser de manière synthétique les informations structurales obtenues par spectroscopie EXAFS et RMN.

### III.4.3. Etude des complexes acide humique - Pb

#### III.4.3.1. Spectres EXAFS

La figure III-15a compare les spectres EXAFS au seuil  $L_{III}$  du plomb des complexes Pb-AH. Les spectres ont une très faible amplitude, environ deux fois moindre que l'amplitude minimale observée pour les complexes Zn-AH. Cela témoigne d'un désordre structural important, dû (1) à la chimie de coordination particulière du plomb (cf. II.3.1), et (2) probablement à la présence de plusieurs sites de géométrie différente. Contrairement au cas du zinc, on n'observe peu de différences entre les spectres, leur fréquence et leur amplitude variant peu en fonction de la nature de l'AH ou de la concentration en plomb. Ces spectres ont été comparés à ceux des composés de référence du plomb. Le spectre du complexe Pb-cystéine présente une fréquence notablement plus élevée, on peut donc en déduire que le plomb n'est pas lié à des groupements soufrés des AH, mais plutôt à des ligands oxygénés (Fig. III-15b). Les spectres des complexes Pb-AH sont en phase avec les spectres de certains composés Pb-acides organiques comme le lactate de plomb. Cela suggère des liaisons du plomb avec des groupements carboxyliques des AH. Cependant, aucun accord satisfaisant n'a été obtenu avec un composé de référence.

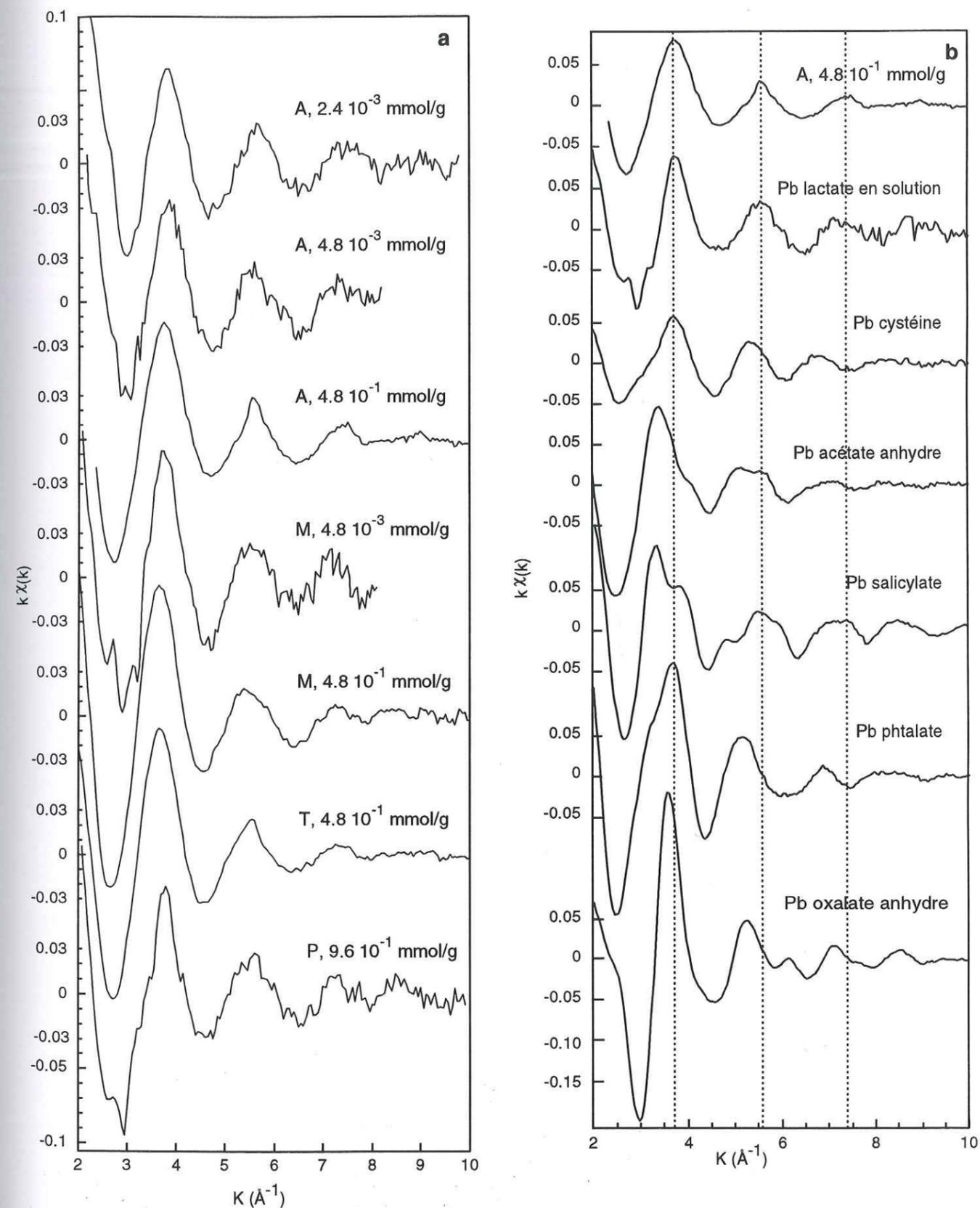


Figure III-15: Spectres EXAFS des complexes Pb-AH (a) et de composés de référence (b)

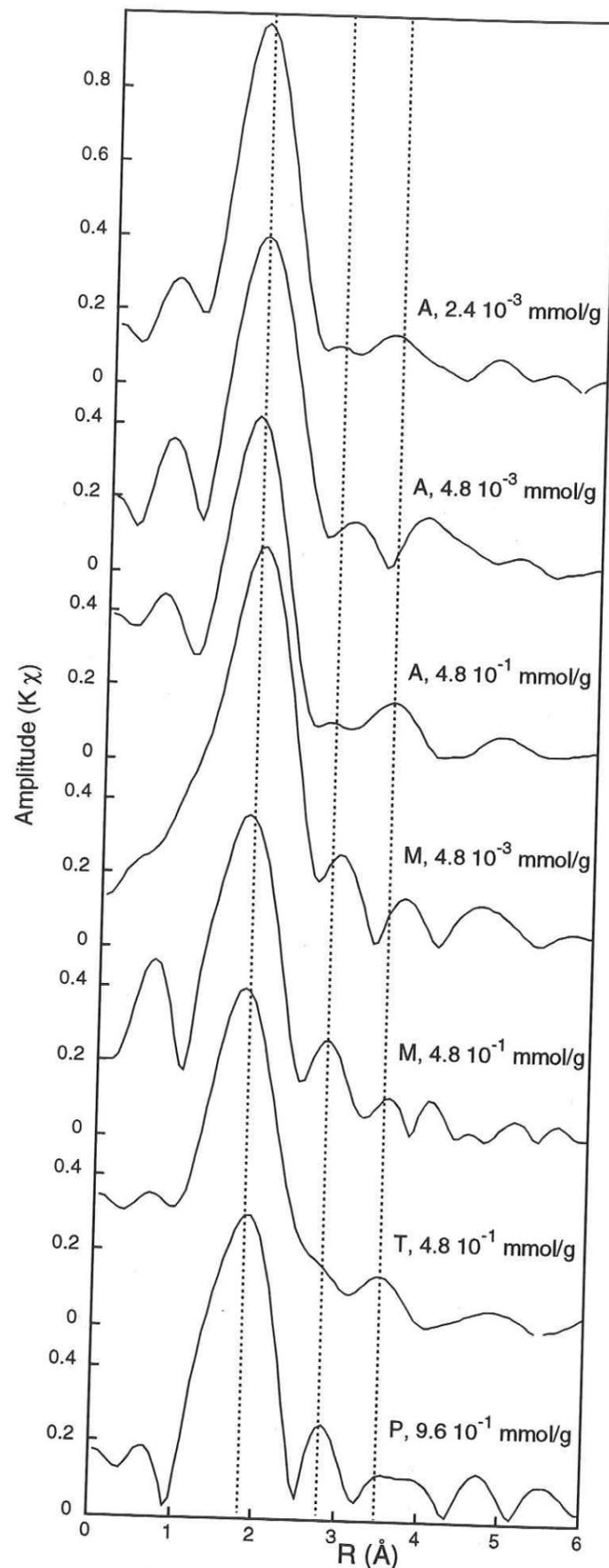


Figure III-16: FDR des complexes Pb-AH

Comme dans le cas du zinc, on peut penser que l'environnement des atomes de plomb est composite, c'est-à-dire contient plusieurs types de ligands, et ne correspond pas à l'environnement du plomb dans un composé de référence unique.

### III.4.3.2. Paramètres structuraux

La simulation numérique de la première couche de coordination confirme que le plomb est lié à des atomes d'oxygènes (cf. II.3). Pour tous les échantillons, on trouve deux sous-couches d'oxygène, la première à 2.34-2.44 Å, la deuxième à 2.50-2.64 Å (Tableau III-10). Les environnements sont tous assez semblables compte tenu de la chimie de coordination du plomb (cf. II.3), avec  $\langle d(\text{Pb-O}) \rangle$  comprise entre 2.43 et 2.47 Å. La comparaison avec la figure II-16 montre que ces valeurs sont en accord avec les distances Pb-O trouvées dans les composés Pb-acides organiques.

Tableau III-10 : Paramètres structuraux de la première couche de coordination déterminés pour les complexes Pb-AH.

Echantillon	R (Å)	N	$\langle d(\text{Pb-O}) \rangle$	$\Delta\sigma$ (Å)	Q
A 2.4 10 <sup>-3</sup>	2.34	1.6		0.00	
	2.52	1.6	2.43	0.02	0.004
A 4.8 10 <sup>-3</sup>	2.35	1.6		0.00	
	2.53	1.5	2.44	0.01	0.007
A 4.8 10 <sup>-1</sup>	2.34	1.1		0.00	
	2.50	1.5	2.43	0.02	0.003
M 4.8 10 <sup>-3</sup>	2.42	2.9		0.02	
	2.64	1.0	2.48	0.02	0.001
M 4.8 10 <sup>-1</sup>	2.38	1.3		0.00	
	2.55	1.3	2.47	0.00	0.01
P 9.6 10 <sup>-1</sup>	2.40	1.5		0.02	
	2.55	1.0	2.45	0.03	0.05
T 4.8 10 <sup>-1</sup>	2.37	1.6		0.00	
	2.57	1.7	2.47	0.01	0.005

La simulation numérique a été faite en utilisant les fonctions d'amplitude et de déphasage expérimentales extraites de PbO. Le nombre de paramètres indépendants  $P_i$  est compris entre 5 et 6.  $Q = \sum (k^2 \chi_{\text{exp}} - k^2 \chi_{\text{th}})^2 / \sum (k^2 \chi_{\text{exp}})^2$

La deuxième sphère de coordination n'a pas été simulée numériquement car, à cause de l'important désordre structural, les paramètres structuraux obtenus auraient eu peu de signification. Cependant, on observe que les FDR présentent toutes un second pic, à des distances variables, correspondant vraisemblablement à une couche d'atomes de carbone (Fig. III-16). Cela suggère que pour tous les échantillons, les complexes sont de sphère interne. Dans

le cas contraire, le polyèdre de coordination du plomb, composé exclusivement de molécules d'eau, serait non distordu, et en conséquence les spectres EXAFS auraient une amplitude plus importante (au moins équivalente à celle des spectres de composés modèles dont l'arrangement est ordonné, comme l'oxalate de plomb anhydre, Fig. III-15b). Notons que contrairement au premier pic, la position du deuxième pic n'est pas identique pour tous les échantillons (Fig. III-16).

Les résultats EXAFS montrent que pour toutes les concentrations, l'amplitude des spectres est faible et quasiment constante, et l'arrangement de la première sphère de coordination est comparable. Une interprétation possible de ces observations est que les sites du plomb sont tous d'affinité équivalente. Dans ce cas, on obtiendrait un signal moyen, identique pour toutes les concentrations. Cependant, la deuxième couche devrait également être identique pour tous les échantillons, et de très faible amplitude. Or, on observe des décalages importants de ce pic entre les échantillons. Cette hypothèse doit donc être écartée, il existe bien une distribution d'affinité des sites comme dans le cas du zinc. Les sites ne se distinguent pas au niveau de la première couche de coordination, dont le désordre est important, mais plutôt au niveau de la seconde,

dont la distance moyenne varie selon les sites. La figure III-15a montre que même à faible concentration en plomb ( $2.4 \cdot 10^{-3}$  mmol/g), les spectres EXAFS ont une amplitude faible. D'après l'étude des complexes Zn-AH, on peut penser que les sites de forte affinité sont chimiquement bien définis, et sont identiques pour tous les échantillons. La faible amplitude des spectres ne doit donc pas être attribuée à une distribution de sites, mais plutôt à un désordre structural des sites de haute affinité. Ce désordre, probablement dû à la stéréochimie particulière du plomb, ne nous a pas permis de déterminer précisément la structure de ces sites. Le fait que l'amplitude des spectres EXAFS ne diminue pas quand [Pb] augmente montre que le désordre au sein de chaque complexe masque celui dû à la présence de complexes ayant des structures différentes.

Nous n'avons pas identifié de complexes de sphère externe dans la gamme de concentration étudiée ( $2.4 \cdot 10^{-3}$  à  $9.6 \cdot 10^{-1}$  mmol/g). Dans le cas du zinc, les complexes de sphère externe ont été observés pour des concentrations de 7.6 mmol/g. Il est possible qu'à  $9.6 \cdot 10^{-1}$  mmol/g, les sites de sphère interne ne soient pas tous saturés, la concentration en plomb étant trop faible pour la formation des complexes de sphère externe.

### III.5. CONCLUSION

L'étude de la structure des complexes Zn-AH et Pb-AH montre une pluralité des sites en fonction de la concentration en métal, et donc des différences d'affinité entre ces sites. Pour les deux métaux, les ligands sont majoritairement oxygénés même à très faible concentration en métal ( $10^{-3}$  mmol/g), ce qui montre que Pb et Zn ont une affinité moindre pour les ligands soufrés que pour les ligands oxygénés des AH, ou bien équivalente pour les deux. Dans le deuxième cas, les ligands soufrés seraient présents dans tous les types de complexes, mais en proportion trop faible pour permettre leur détection. Pour le zinc, les ligands sont majoritairement des groupements carboxyles monodentates et des molécules d'eau. On a montré que le rapport du nombre de ligands  $\text{COO}^-$  / nombre de ligands  $\text{H}_2\text{O}$  diminue quand la concentration en zinc augmente. On peut en déduire que plus le complexe est hydraté, moins il est stable. Dans les complexes les moins stables, le métal est entièrement solvaté (complexes de sphère externe) et il est lié à l'AH par des liaisons faibles. Pour le plomb, les sites de fixation présentent un désordre structural important dès les très faibles concentrations. Aux concentrations étudiées ( $< 9.6 \cdot 10^{-1}$  mmol/g), nous avons observé uniquement des complexes de sphère interne.

Cette étude montre que les AH comportent une distribution de sites de complexation du zinc et du plomb ayant des affinités différentes pour le métal. Ce résultat apporte une explication structurale au continuum de constantes de complexation thermodynamiques déterminé en chimie de solution. Dans le milieu naturel, les complexes formés sont probablement d'un niveau de complexité encore supérieur à celui des systèmes étudiés en raison des interactions potentielles avec les autres espèces présentes. Il se forme alors des complexes ternaires entre, un acide humique, un cation et une surface minérale, ou également entre un acide humique, un cation et un acide organique simple comme l'oxalate [111, 112]. Ces complexes ternaires ont probablement une stabilité encore plus forte que les complexes binaires étudiés dans ce travail [113].

**CHAPITRE IV.**

**MECANISMES DE COMPLEXATION DU ZINC ET DU  
PLOMB SUR LA PAROI CELLULAIRE D'UN CHAMPIGNON  
FILAMENTEUX**

## CHAPITRE IV. MECANISMES DE COMPLEXATION DU ZINC ET DU PLOMB SUR LA PAROI CELLULAIRE D'UN CHAMPIGNON FILAMENTEUX

### INTRODUCTION

Les champignons filamenteux sont utilisés dans les secteurs pharmaceutiques et agro-alimentaires pour la synthèse de molécules comme la pénicilline, les antibiotiques, etc... Après extraction de ces substances, les champignons forment un déchet industriel généralement inutilisé. Pourtant, cette biomasse possède une très forte capacité de complexation grâce à la richesse des parois cellulaires fongiques en groupements fonctionnels variés (carboxyle, hydroxyle, phosphoryle, amine, amide, sulfhydryle, ...). Elle peut donc être valorisée comme biosorbant pour le traitement d'eaux chargées en métaux (effluents industriels, eaux de mine, etc...). De très nombreuses études ont permis de caractériser macroscopiquement les propriétés de la paroi cellulaire des champignons [10]. Le but de cette étude était de déterminer à l'échelle moléculaire les mécanismes de fixation des métaux sur la paroi cellulaire.

L'étude de la complexation des métaux sur les parois isolées de champignons filamenteux constitue également une étape préliminaire à l'étude des lichens, qui sont des organismes symbiotiques constitués par l'association d'un champignon filamenteux et d'une algue unicellulaire (cf. V).

### **Structural determination of Zn and Pb binding sites in *Penicillium chrysogenum* cell wall by EXAFS spectroscopy**

(Article soumis à Environmental Science & Technology, Octobre 1997)

**STRUCTURAL DETERMINATION OF ZN AND PB BINDING SITES IN  
PENICILLIUM CHRYSOGENUM CELL WALL BY EXAFS  
SPECTROSCOPY**

Géraldine Sarret<sup>1</sup>, Alain Manceau<sup>1</sup>, Lorenzo Spadini<sup>1</sup>, Jean-Claude Roux<sup>2</sup>, Jean-Louis Hazemann<sup>1,3</sup>, Yvonne Soldo<sup>3</sup>, Laurent Eybert-Bérard<sup>1</sup>, Jean-Jacques Menthonnex<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Environmental Geochemistry Group, LGIT, University of Grenoble, BP53, 38041 Grenoble cedex, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de Transfert dans les Systèmes Végétaux, DSV-DBMS, CEA/Grenoble, 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France.

<sup>3</sup> Laboratoire de Cristallographie, CNRS, 25 avenue des Martyrs, BP 166, 38042 Grenoble Cedex 9, France

\* Correspondence should be addressed to Alain Manceau, manceau@obs.ujf-grenoble.fr; Ph: 33 4 76 82 80 15; fax: 33 4 76 82 81 01.

**Keywords:** Biosorption, Fungus, *Penicillium chrysogenum*, Zn, Pb, sorption isotherm, EXAFS.

**Abstract**

Fungal cell walls possess strong complexing properties, which make them valuable biosorbents to remove heavy metals from wastewaters. The binding mechanisms of Zn and Pb to the cell wall of *Penicillium chrysogenum* have been studied by solution chemistry and Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS) spectroscopy as a function of the complexation rate. It is shown that Zn and Pb bind to the predominant phosphoryl ( $\approx 95\%$ ) and minor carboxyl groups ( $\approx 5\%$ ) with a reversed affinity. Zn is predominantly complexed to four  $\text{PO}_4$  groups in a tetrahedral configuration at low ( $7.6 \cdot 10^{-3}$  mmol/g) to high (0.15 mmol/g) Zn concentration, and additionally to COOH groups at total saturation of reactive sites (0.22 mmol/g). In contrast, carboxyl complexes of Pb ( $\equiv(\text{COO})_n\text{-Pb}$ ) are formed at low Pb concentration ( $5.6 \cdot 10^{-3}$  mmol/g), their formation is followed by  $\equiv(\text{PO}_4)_n\text{-Pb}$  complexes at higher complexation rate. The difference in complexation affinity by reactive  $\text{PO}_4$  and COOH groups observed by EXAFS provides a molecular-level explanation for the differences in Pb and Zn isotherms. The former exhibits two plateaus, which correspond to the successive saturation of COOH and  $\text{PO}_4$  sites, whereas the latter has a single-site Langmuir shape because low affinity minor  $\equiv(\text{COO})_n\text{-Zn}$  complexes formed at high metal concentration are masked by more abundant  $\equiv(\text{PO}_4)_4\text{-Zn}$  complexes, which readily form.

## Introduction

Elimination of heavy metals from industrial wastewater is important for preserving the quality of aquatic systems, streams and groundwaters. Contaminated waters are generally cleaned by precipitation of a metallic oxyhydroxide sludge or by ion exchange with synthetic resins. Various types of non-living biomass, bacteria (1), filamentous fungi (2-4), algae (5), and higher plants (6-8) can be profitably used in alternative metal removal processes, because of their low cost and the high ion exchange capacity of cell walls. In this study, cell walls of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*, a by-product of the pharmaceutical industry are examined for their Zn and Pb complexing capability. The elevated sorption rate of the cell wall, with respect to a mineral surface for example, arises from its composite structure. The skeleton of *P. c.* is mostly composed of chitin and  $\beta$ -glucan chains (9), which are cemented by proteins, lipids, pigments and other polysaccharides (10-12). Therefore, a large variety of functional groups exist, including carboxyl, hydroxyl, phosphoryl, amine and sulfhydryl groups, creating a negatively charged surface (13, 14). But these are all amphoteric, so the pH regulates the charge.

The sorption properties of fungal cell walls as a function of pH, ionic strength, nature of the metal, and presence of competing cations have been extensively studied (2, 3, 11), but the chemical nature of complexing groups is not known. In the present work, the nature of Zn and Pb binding sites on *P. c.* cell walls was investigated at the macroscopic level by performing sorption isotherms, and at the molecular level by Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS) spectroscopy.

The past 15 years has witnessed explosive application of various X-ray Absorption Spectroscopies (XAS) in environmental geochemistry to determine the crystal chemical form of metals associated, or in contact with, the major constituents of soils and sediments. Until very recently, focus has been placed on inorganic materials (clays, Fe and Mn oxides, phosphates, carbonates...), and the study of metal complexation to organic constituents and living organisms is a novel application of XAS<sup>2</sup> (15-21), which appears very promising in biogeochemistry, ecotoxicology, and phytoremediation.

The identity of Zn and Pb complexing sites of the cell wall of *Penicillium chrysogenum* was investigated by varying the metal concentration by three (Zn) and two (Pb) orders of magnitude, from the micromolar to millimolar range. Our detection limit is about 5 to 10 times lower than that experienced in previous structural studies, and this allowed us to identify the nature of strongest complexing functional groups, which are generally masked by the predominant contribution of lower affinity sites. This instrumental breakthrough has been feasible owing to the high photon flux delivered by the third generation synchrotron radiation source of the

European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), and the high counting rate of a 15-element array germanium detector.

## Background

In organic materials, metals can be bonded to carboxyl (-COOH), aldehyde (-COH), hydroxyl (-CHOH), sulfhydryl (-SH), phosphoryl (-PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub>), and amine (-NH<sub>2</sub>) groups. In this section we will examine how these groups can be differentiated by EXAFS spectroscopy. EXAFS allows us formally to determine the nature, number, and distance of atoms located near a selected atom (22, 23). The structural information is generally limited to the two or three nearest coordination shells surrounding the target metal, specifically for organic systems because of the low X-ray scattering amplitude of the constitutive elements (C, N, O...). Neighboring atoms are classically identified through their backscattering properties, which depend on their atomic number (Z). The higher Z differences allows the better discrimination between atoms. For example, P has more than twice as many electrons as C, and its backscattered electronic wave is out-of-phase, which allows it to be unambiguously distinguished. The same is true for the O - S pair. Phase analyses can be conducted on the imaginary part of the Fourier transform (24). In contrast, C, N, and O on the one hand, and P, and S on the other, can not be differentiated by this method. Atomic neighbors may alternatively be identified on the basis of interatomic distances, but the sensitivity of this procedure requires detailed examination as it has not been applied to organic compounds yet. For this purpose, radial atomic distributions of a large number of Zn and Pb model compounds have been calculated, and results are reported in Fig. 1.

Examination of Fig. 1a shows that the coordination chemistry of Zn is rather simple. Zn is most often 4 or 6-fold coordinated, and 5-fold coordination is rare. Because Zn has a d<sup>10</sup> electronic configuration, chemical bonds tend to be isotropic, and polyhedra are generally regular (25). Consequently, in a given structural environment, metal-ligand interatomic distances are homogeneous. Regarding the first shell, distances for Zn-O pairs in tetrahedral are clearly different than in octahedral coordination. The range d(Zn-O) and mean <d(Zn-O)> distances are 1.90-2.00 Å and 1.95 Å for the 4-fold coordination, and 2.00-2.20 Å and 2.10 Å for the 6-fold coordination. Also, d(Zn-S) is 0.2 to 0.3 Å larger than d(Zn-O) as a result of the difference of ionic radius between O (1.26 Å) and S (1.84 Å) (26, 27). Regarding the second shell, <d(Zn-P)> is 0.2 Å larger than <d(Zn-C)> as indicated by the vertical line in Fig. 1a. Thus, O and S, and P and C neighbors can be differentiated on the basis of interatomic distances, in addition to wave phase shift criteria. But, N and O ligands can not, due to their similar distances to Zn. These structural considerations allow us to differentiate carboxyl + hydroxyl + amine, from phosphoryl, and from sulfhydryl ligands in the case of Zn using EXAFS. It is not possible to discriminate carboxyl from hydroxyl, or from amine groups by this method, but in this case the nature of functional groups may generally be inferred from chemical considerations.

<sup>2</sup> XAS includes EXAFS and XANES (X-Ray Absorption Near Edge Structure Spectroscopy).

The comparison of radial atomic distributions for Pb references indicates that interatomic distances are of greater distribution (Fig. 1b). Distances are largely scattered, and no marked trend as a function of coordination numbers or functional groups exists. The main reason for the complex coordination chemistry of Pb is the presence of a lone pair of electrons (28), which makes Pb polyhedra strongly distorted. Consequently, coordination numbers are sometimes ill defined, and atomic shells indistinct (29). Coordination numbers have been arbitrarily defined as the number of atoms at a distance lower than 3.20 Å (Fig. 1b). However, lower limits for Pb-S and Pb-P can still be defined (vertical lines in Fig. 1b), and the <Pb-S> distance is noticeably greater than <Pb-O>. The same is not true for Pb-P vs Pb-C. These considerations allow, in the case of Pb complexes, the identification of sulfhydryl ligands by their Pb-S distance and the Z contrast between O,N and S atoms. However, carboxyl + hydroxyl + amine and phosphoryl groups can be confidently differentiated based on the Z contrast between O,N vs P, but not on the basis of interatomic distances.

#### Materials and Methods

**Materials.** Dead cells of *P. c.* whose metal complexing properties have been previously characterized (30) were supplied by Gist-Brocades (Seclin). Cell walls were isolated by drying, grinding, sieving at 80 µm, and washing dead fungi to remove plasmic and cytoplasmic material. The chemical composition as determined by combustion technique is 42.0 % C, 32.9 % O, 7.8 % N, 6.1 % H, 1.4 % P, 1.3 % S, 8.5% ash, indicating that a large variety of functional groups (carboxyl+hydroxyl, phosphoryl, sulfhydryl, amine...) are present. Samples were prepared by suspending 1.0 g cell wall powder in a stirred, argon-purged reactor containing 100 ml 0.1 M NaNO<sub>3</sub> background electrolyte. The solution was adjusted to pH 6 ± 0.1 by dropwise addition of NaOH. After two hours equilibration time, 200 ml containing the corresponding concentrations of Zn(II) and Pb(II) in 0.1 M NaNO<sub>3</sub> were carefully added while continuously adjusting pH for 24h equilibration. Total metal concentration was 0.01 ≤ [Pb] ≤ 9.53 mmol l<sup>-1</sup>, 0.03 ≤ [Zn] ≤ 9.71 mmol l<sup>-1</sup>. Equilibrated samples were then centrifuged, and the concentration of metal remaining in solution was measured by ICP-AES. The amount of complexed metal ([Me<sup>2+</sup>]<sub>ads</sub>) was calculated by difference between the initial and equilibrium solution concentration. Each sorption experiment was repeated three times. The metal complexed biomass was dried and stored for subsequent EXAFS measurements.

**EXAFS experiments.** Zn K-edge and Pb L<sub>III</sub>-edge EXAFS experiments were performed on the BM32 CRG/IF beamline at ESRF. Spectra were recorded in fluorescence or transmission mode depending on the metal concentration. Zn K<sub>α</sub> and Pb L<sub>α</sub> fluorescence were recorded using a Canberra 15-element array germanium detector with a total counting rate of 300 000 photons/s. X-ray absorption spectra were treated following a standard procedure (23). Briefly, EXAFS spectra ( $\chi(k)$ ) were derived from raw absorption spectra by subtracting the matrix

absorption and normalizing the amplitude to the absorption jump ( $\Delta\mu$ ). The kinetic energy ( $E_k$ ) of the photoelectron was converted to wavevector ( $k$ ) values by taking the origin ( $E_k=0$ ) at  $\Delta\mu/2$ . Radial structure functions (RSF) were obtained by Fourier transforming  $k^2\chi(k)$  spectra using a Kaiser window (31, 32). RSFs are uncorrected for phase shift, thus distances values on x axis are shifted by  $\Delta R$  relative to crystallographic  $R$  distances.  $R$ , number of atoms in the successive atomic shells ( $N$ ), and Debye-Waller factor ( $\sigma$ ) were evaluated by least-squares fitting of Fourier filtered EXAFS spectra. Amplitude and phase shift functions for Zn-O, Zn-P and Pb-O atomic pairs were calculated *ab initio* from the structure of hopeite ( $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4 H_2O$ ) (33) and  $\alpha$ PbO (34) using the FEFF7 code (35).

## Results and Discussion

### Sorption isotherms.

Zn and Pb isotherms at pH 6 are shown in Fig. 2. At high initial [Me<sup>2+</sup>], both isotherms converge to a constant [Me<sup>2+</sup>]<sub>ads</sub> value ( $C_{tot}$ ), indicating that the surface of the cell wall material conformed to the Langmuir adsorption equation, and that sorbed cations did not precipitate as a metal hydroxide. For both sorbates,  $C_{tot} = 0.20 \text{ mmol g}^{-1} \pm 10 \%$ , which strongly suggests that the identity of predominant reactive surface functional groups are similar for Zn and Pb. This  $C_{tot}$  value is in accord with values reported in the literature for other filamentous fungi: 0.30, 0.23, 0.27, 0.21, and 0.25 mmol Zn g<sup>-1</sup> for *Rhizopus arrhizus* (36), *R. nigricans*, *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, and *Trichoderma viride* (37), respectively. However, Zn and Pb isotherms differ in shape at low [Me<sup>2+</sup>]. The  $\Delta \log [Zn^{2+}]_{ads} / \Delta \log [Zn^{2+}]$  slope monotonically decreases from about 1 to 0 with increasing [Zn<sup>2+</sup>], characteristic of metal complexation to a unique functional group. The Zn isotherm was successfully fit with a Langmuir-based sorption model by assuming a single Zn site (Zn1 in Fig. 2a) with a dissociation constant  $K_{D-Zn1} = ([Zn^{2+}] C_{tot} / [Zn^{2+}]_{ads}) - [Zn^{2+}] = 0.055$ . A slightly better fit was obtained assuming the presence of low affinity sites of low concentration (site Zn2 in Fig. 2a), amounting to ~ 5% of total sites. Obviously, batch adsorption isotherms are inadequate for detecting a minor site such as this. It will be shown below that the existence of Zn2 site is supported by EXAFS spectroscopy.

Adsorption isotherm for Pb is clearly different from that for Zn, and can be divided in two regions separated by a plateau at low initial [Pb<sup>2+</sup>] (Fig. 2b). This line shape unequivocally indicates the presence of a strong binding site (Pb1), which is saturated at low metal concentration. Pb was subsequently complexed by a weaker site (Pb2), which is the predominant functional group of the cell wall. This isotherm could be fit reasonably well by two Langmuir equations with the following sorption constants  $K_{D-Pb1} = 0.003$ ,  $C_{(Pb1)tot} = 0.01 \text{ mM}$ , and  $K_{D-Pb2} = 0.35$ ,  $C_{(Pb2)tot} = 0.20 \text{ mM}$ . Thus, high affinity Pb1 sites represent about 5% of total sites. In the fits of the two isotherms,  $C_{(Zn2)tot}$  and  $C_{(Pb1)tot}$  were fixed to the same value

(0.01mM) because low affinity Zn sites (Zn2) and high affinity Pb sites (Pb1) are chemically identical (cf. EXAFS section). This limitation much constrained the fit of the Pb isotherm, and explains the relatively crude agreement between experimental and theoretical data in the first plateau region. Without this structural constrain, an excellent fit could be obtained by varying  $C_{Tot}$  and  $K_D$  values for Pb1 and Pb2, but the derived thermodynamic constants would be structurally meaningless.

Thus, adsorption isotherms indicate that the cell wall contains at least two sites differing by their concentration and affinity for Zn and Pb. One is overwhelmingly present, amounting ~ 95% of total reactive sites, and the other represents ~ 5% of reactive sites. The most abundant site has greater affinity for Zn (Zn1) and lower affinity for Pb (Pb2), whereas the less abundant site has a low affinity for Zn (Zn2), and a high affinity for Pb (Pb1). The chemical nature of these sites will be determined by EXAFS.

#### Zn K-edge EXAFS.

A decreased amplitude of EXAFS spectra is observed with Zn concentration (Fig. 3a). This evolution has been previously described in humic substances (18), and is interpreted by an increased distribution of interatomic distances at high complexation rate, due to the larger number of sites that differ in chemical properties and/or spatial arrangement. The three most diluted samples (A, B, C) are precisely in phase over the whole  $k$  span as indicated by the EXAFS spectra (Fig. 3a). This match in frequency indicates that interatomic distances are identical in the three samples. Thus, it is concluded that Zn is complexed predominantly by the same functional groups. The second and third oscillations of the most concentrated sample (D,  $2.2 \cdot 10^{-1} \text{ mmol g}^{-1}$ ) are slightly shifted to lower  $k$  values, indicating a modification of the Zn atomic environment. Complexing groups were identified by comparing EXAFS spectra and RSFs for fungal cell walls to a large database of organic and mineral reference spectra (Fig. 1). Sulfhydryl ligands (-SH) were dismissed because their spectra have a higher frequency owing to the larger Zn-S distance compared to Zn-O (data not shown). The hypothesis of amine ligands (-NH<sub>2</sub>) was also rejected because these groups are protonated at pH 6 (38), and therefore can not bind Zn. Reasonably good spectral resemblance to Zn-cell wall complexes was noted for anhydrous Zn benzoate (Fig. 3b), but the closest match occurred with Zn phosphate dihydrate (Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O) (Fig. 3c).

*First shell analysis.* In anhydrous Zn benzoate (39) and Zn phosphate dihydrate, Zn is 4-fold coordinated,  $\langle d(\text{Zn-O}) \rangle = 1.95$  and  $1.97 \text{ \AA}$  respectively (Table 1). The first shell of the references and samples occurs at the same  $R + \Delta R$  distance (Fig. 3d), suggesting similar Zn-O bond lengths, and consequently tetrahedral coordination of Zn in cell wall samples. Fourier filtered Zn-O EXAFS contributions for 4-fold and 6-fold coordination references and cell wall samples are presented in Fig. 4a,b. Sample A is perfectly in phase with the tetrahedral reference (ZnO), whereas a slight shift to low  $k$  values is perceptible at higher complexation rate. Sample D is in phase with a linear combination of  $90 \pm 5\% \text{ Zn}_{Tet.} + 10 \pm 5\% \text{ Zn}_{Oct.}$ . Numerical simulations yielded an increase of  $d(\text{Zn-O})$  from  $1.97 \text{ \AA}$  to  $1.99 \text{ \AA}$  ( $\pm 0.01 \text{ \AA}$ ) in going from sample A to D

(Table 1).  $d(\text{Zn-O})$  of  $1.97 \text{ \AA}$  is typical of tetrahedrally coordinated compounds (Fig. 1a). Thus, Zn is almost exclusively 4-fold coordinated in sample A, and approximately 10% 6-fold coordinated in sample D. Coordination numbers for oxygen ( $CN_O$ ) range between 3.2 and 2.3 (Table 1), thus, they are always lower than that expected for a tetrahedral coordination (4). This apparent loss of atomic neighbors has no structural reality, and arises from the multiplicity of binding sites with slightly different chemical composition, interatomic distances, and geometry. This disorder effect is logically more pronounced at higher Zn concentration.

*Second shell analysis.* RSFs in Fig. 3d display a second peak, which may correspond to either P or C atoms depending on the type of functional group. The second peak of Zn phosphate dihydrate is noticeably shifted to higher  $R + \Delta R$  values relative to anhydrous Zn benzoate. Also, the imaginary parts (Fig. 3d, inset) indicate that the Zn-P and Zn-C electronic waves are shifted by  $\pi / 2$ . The peak position and wave phase differences are because Zn is surrounded by 4 C atoms at the average distance of  $2.9 \text{ \AA}$  in the benzoate reference (39), and by 4 P atoms at the average distance of  $3.2 \text{ \AA}$  (Table 1) in the phosphate reference. The imaginary parts of the Zn-cell wall samples are in coincidence with that of phosphate (Fig. 3d), and point to the presence of P in the second coordination shell of Zn at all metal concentrations. The presence of phosphorus was also confirmed by spectral simulations, which yielded two P subshells at  $3.06\text{-}3.08 \text{ \AA}$  and  $3.54\text{-}3.55 \text{ \AA}$  (Table 1, Fig. 4c). Based on these results, and also by reference to the distribution of interatomic distances reported in Fig. 1a for Zn reference compounds, it is concluded that Zn is predominantly tetrahedrally coordinated, and complexed to phosphoryl groups.

The second RSF peak is slightly shifted to lower  $R + \Delta R$  values with increasing Zn content. This is expressed by a decrease of shortest Zn-P distance from  $3.08 \text{ \AA}$  (sample A) to  $3.06 \text{ \AA}$  (sample D) (Table 1). Besides, the coordination number for the P shell ( $CN_P$ ) ranges from 2.7 to 1.8 as compared to 4 in Zn phosphate dihydrate, and diminishes progressively from sample A to D similarly to  $CN_O$  (Table 1). The decrease of  $d(\text{Zn-P})$  and  $CN_P$  led us to infer complexation by carboxyl in addition to phosphoryl ligands at high Zn concentration. Note that carboxyl ligands likely represent less than ~10% of total ligands, otherwise a shift of the imaginary part would have been observed.

*Discussion.* We have demonstrated that Zn is overwhelmingly complexed by phosphoryl groups in tetrahedral coordination. This structural configuration is encountered in a number of Zn organic complexes (Fig. 1a). According to chemical analysis, the P/Zn molar ratio equals 62, 29, 2.9, and 1.8 in samples A, B, C, and D, respectively. Thus, P is in excess relative to Zn in the two most diluted samples (A, B), and consequently Zn atoms are likely ligated by 4 phosphoryl groups as in phosphate reference compound (type 1 complex in Fig. 5). The close resemblance of the EXAFS spectra for sample A and for Zn phosphate dihydrate supports this hypothesis. However, the number of P neighbors detected by EXAFS ( $CN_P = 2.7$  in A and  $2.1$

in B, Table 1) is substantially lower than 4. The reduction of  $CN_p$  in samples A and B can be explained by the existence of phosphoryl sites with slightly different geometry and/or by the presence of some minor Zn species with a different coordination geometry. Thus, the majority of Zn complexes in samples A and B are presumably of type 1.

Samples C and D have a P/Zn ratio of 2.9 and 1.8 and, consequently, type 1 complexes can account for a maximum of 70% (C) and 30% (D) of Zn species. Thus, other types of complexes should exist, and three structural models can be envisaged. (i) Based on EXAFS results, 6-fold Zn species ligated to carboxyls are suspected to exist at high sorption rate (type 4 complex), but their contribution is much too weak (~10%) to account alone for as much as 30% (C) and 70% (D) of Zn binding. (ii) Another hypothesis is the presence of Zn-(H<sub>2</sub>O) bonds (type 3 complex). In this complex, Zn has less than 4 phosphoryl ligands, which would be consistent with  $CN_p$ . However, Zn-H<sub>2</sub>O bonds seem to be stabilized in octahedral coordination (40), and it has been shown by EXAFS that  $Zn_{Oct}$  species represent less than 10% of total Zn. Thus, we believe that water molecules and carboxyl ligands have a limited role in Zn complexation. (iii) Finally, the existence of (PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>-Zn-(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>-Zn- chains, in which phosphoryl groups bind several Zn (type 2 complex), is proposed. In this type of complex, P/Zn ratio is lower than 4, which is in agreement with chemical analysis. Zn atoms are separated by 2 O and 1 P. Therefore, they are too distant for detection of Zn-Zn pairs by EXAFS. We conclude, therefore, that samples C and D contain predominantly complexes of type 2, and complexes of type 3 and 4 in a proportion dependent on the P/Zn ratio.

Structural models in Fig. 5 should be viewed as an idealized representation of the average structure of Zn complexes. A huge number of different structural situations are supposed to exist, and this level of heterogeneity cannot be discerned by existing spectroscopic methods. Despite this intrinsic limitation, the present data unambiguously show that Zn is predominantly complexed to phosphoryl groups from low to high concentration, and additionally to carboxyl groups near saturation of the reactive surface sites. The overwhelming presence of  $\equiv(PO_4)_4$ -Zn complexes is fully consistent with our quantitative interpretation of the sorption isotherm, and it is concluded that high affinity Zn1 sites correspond to phosphoryl groups. Zn2 sites are composed of  $\equiv(COO)_n$ -Zn complexes formed at high Zn concentration, and which have lower stability (Fig. 2a). Based on solution chemistry and EXAFS results, the relative concentration of Zn2 sites would be between 5 and 10%. This is, of course, a simplified view, and between these two extremes, a large number of mixed (PO<sub>4</sub>)<sub>n</sub>-Zn-(COO)<sub>m</sub> complexes of intermediate affinity could exist. This level of structural heterogeneity can be described thermodynamically by a continuous distribution of affinities (38).

#### Pb L<sub>3</sub>-edge EXAFS.

EXAFS spectra for Pb complexed by *P. c.* cell walls are presented in Fig. 6a. As for Zn EXAFS spectra, a loss of amplitude is observed with increasing Pb concentration, suggesting increased structural disorder. The phase of EXAFS spectra also varies with Pb concentration as

noted by the first and third oscillation (Fig. 6a), suggesting a modification of the type of Pb binding groups at increasing Pb concentration.

A comparison of  $\chi$  scales in Fig. 3a and 6a indicates that EXAFS oscillations are typically 5-times less intense at the Pb L<sub>3</sub>-edge than at the Zn K-edge. The low amplitude of Pb-EXAFS spectra is noteworthy, due to the particular coordination chemistry of lead, which is characterized by a large distribution of interatomic distances (29). Fig. 1b illustrates the extent of this distribution in lead compounds. Structural disorder, which is already tremendously high in crystalline compounds, is expected to be even greater in organic compounds because of their polyfunctionality. In lead compounds, the full distribution of interatomic distances is unobserved by EXAFS. Thus, for disordered compounds, it is unwise to give much weight to coordination numbers and, to some degree, to interatomic distances as well. Consequently, results from numerical simulations have a large uncertainty. For this reason, spectra were interpreted semi-quantitatively by examining the phase of the electronic wave.

The position of the first RSF peak ( $R + \Delta R \approx 1.8 \text{ \AA}$ ) allows us to conclude that Pb is coordinated to oxygen atoms in all samples (Fig. 6b and 1b). Numerical simulation has not been attempted as it would not bring much information on the identity of the complexing groups or on  $CN$ . A second RSF peak is detected for samples E and G at  $R + \Delta R = 3.7 \text{ \AA}$ , which may be attributed to either C or P. As discussed in the background section, these two atoms can be conclusively identified by analysis of the Pb-P and Pb-C electronic waves phase. As illustrated in the inset of Fig. 6b, the imaginary parts of the Fourier transforms for the two pairs are precisely out of phase. EXAFS spectroscopy allows a clear distinction to be made between phosphoryl and carboxyl groups, even at the Pb L<sub>3</sub> edge. The inset in Fig. 6b shows that the imaginary part of sample E is superimposed on the Pb-C simulation, whereas sample G resembles the Pb-P simulation. This analysis unambiguously allows us to conclude that Pb is predominantly bonded to carboxyls at very low concentration, and to phosphoryls at high concentration. The imaginary part of sample F is intermediate to the two extremes, which indicates that Pb contains both Pb-COOH and Pb-PO<sub>4</sub> complexes. Since Pb-C and Pb-P waves are out of phase, the mixing of the two complexes lowers the resulting wave amplitude. This effect accounts for the very low amplitude of the second RSF peak of sample F, which is nearly extinguished.

These wave phase analyses provide direct spectroscopic insight on the structure of Pb1 and Pb2 sites observed by adsorption isotherms (Fig. 2b). Sample E is located in the lower region of the isotherm, which allows us to conclude that high affinity Pb1 sites are carboxyls. Inversely, sample G is located in the upper part, and in this region Pb is predominantly bound to phosphoryl groups. Sample F, located on the first plateau of the isotherm, is intermediate: Pb is bound to COOH and PO<sub>4</sub> groups in a similar proportion.

#### From Microscopic to Macroscopic

Minor  $\equiv\text{COOH}$  (~5%) surface ligands of the *P. c.* cell walls have a high affinity for Pb compared to the predominant  $\equiv\text{PO}_4$  ligands (~95%). For this reason, the preferential formation of  $\equiv(\text{COO})_n\text{-Pb}$  complexes at low Pb concentration, followed by the formation of overwhelming  $\equiv(\text{PO}_4)_n\text{-Pb}$  complexes at higher concentration, is recognized on the adsorption isotherm by the presence of two distinct plateaus. Inversely, the same  $\equiv\text{COOH}$  ligands have a relatively low affinity for Zn compared to  $\equiv\text{PO}_4$ . The low Zn affinity and scarcity of carboxyl groups disallow their detection on the Langmuir isotherm, which exhibits a typical single-site shape (Fig. 2a). Pb1 and Zn2 sites identified by sorption isotherms analyses correspond to the minor  $\equiv\text{COOH}$  ligands, whereas Pb2 and Zn1 sites correspond to the dominant  $\equiv\text{PO}_4$  ligands. The application of EXAFS spectroscopy to identify the structure (*CN*, *R*, identity of the atomic neighbors) of different binding sites of the *P. c.* cell walls indicated by adsorption isotherms can be extended to many organic systems. Consequently, it opens up interesting perspectives in biotechnology, for instance, by improving the fixation of heavy metals to organic sorbents.

#### Acknowledgments

The authors wish to acknowledge Will Gates for scientific comments, and the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble for making access to the facility.

#### Literature cited

- (1) Wehrheim, B.; Wettern, M. *Applied Microbiol. Biotechnol.* **1994**, 41, 725-728.
- (2) Volesky, B. *Biosorption of heavy metals*. 1990, CRC Press: Boca raton.
- (3) Siegel, S. M.; Balun, M.; Siegel, B. Z. *Water, air and soil pollution* **1990**, 53, 335-344.
- (4) Galun, M.; Keller, P.; Malki, D.; Felstein, H.; Galun, E.; Siegel, S. M.; Siegel, B. Z. *Science* **1982**, 219, 285-286.
- (5) Xue, H. B. *Water Res.* **1990**, 22, 917-926.
- (6) Drake, L. R.; Lin, S.; Rayson, G. D.; Jackson, P. J. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, 30, 110-114.
- (7) Ke, H. Y.; Rayson, G. D. *Applied spectroscopy* **1992**, 47, 1168-1175.
- (8) Ke, H. Y.; Rayson, G. D. *Applied spectroscopy* **1992**, 47, 1168-1175.
- (9) Hamilton, P. B.; Knight, S. G. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, 99, 181.
- (10) Fogarty, R. V.; Tobin, J. M. *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, 19, 311-317.
- (11) Gadd, G. M. *New Phytologist* **1993**, 124, 25-60.
- (12) Crist, R. H.; Oberholser, K.; Shank, N.; Nguyen, N. *Environ. Sci. Technol.* **1981**, 15, 1212-1217.
- (13) Krantz-Rulcker, C.; Allard, B.; Ephraim, J. H. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 1502-1505.
- (14) Kihn, J. C.; Masy, C. L.; Mestdagh, M. M. *Can. J. Biochem.* **1988**, 34, 773.
- (15) Denecke, M. A.; Pompe, S.; Reich, T.; Moll, H.; Bubner, M.; Heise, K. H.; Nicolai, R.; Nitsche, *Radiochimica Acta* **accepted**, .
- (16) Kramer, U.; Cotter-Howells, J. D.; Charnock, J. M.; Baker, A. J. M.; Andrew, C.; Smith, J. *Nature* **1996**, 379, 635-638.
- (17) Salt, D. E.; Pickering, I. J.; Prince, R. C.; Gleba, D.; Dushenkov, S.; Smith, R. D.; Raskin, I. *Environ. Science Technol.* **1997**, 31, 1636-1644.
- (18) Sarret, G.; Manceau, A.; Hazemann, J. L.; Gomez, A.; Mench, M. *J. Phys. IV France* **1997**, 7, C2-799-C2-802.
- (19) Sarret, G.; Manceau, A.; Cuny, D.; Van Haluwyn, C.; Deruelle, S.; Hazeamnn, J. L.; Soldo, Y.; Eybert-Berard, L.; Menthonnex, J. J. *submitted to Environ. Sci. Technol.* **1997**, .
- (20) Schulze, D. G.; McCay-Buis, S. R.; Sutton, S. R.; Huber, D. M. *Phytopathology* **1995**, 85, 990-994.
- (21) Xia, K.; Bleam, W.; Helmke, P. A. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1997**, 61, 2223-2235.
- (22) Koningsberger, D.; Prins, R. *X-Ray Absorption: Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS, and XANES*; Wiley: New York, 1988.
- (23) Teo, B. K. *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*; Springer-Verlag: Berlin, 1986.
- (24) Manceau, A.; Gallup, D. L. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 968-976.

- (25) Ochiai, E. I. *Journal of Chemical Education* **1988**, 65, 943-946.
- (26) Shannon, R. D.; Prewitt, C. T. *Acta Cryst.* **1969**, B25, 925-945.
- (27) Shannon, R. D. *Acta Cryst.* **1976**, B25, 925-946.
- (28) Galy, J.; Meunier, G.; Andersson, S.; Astrom, A. *J. Solid State Chem.* **1975**, 13, 142.
- (29) Manceau, A.; Boisset, M. C.; Sarret, G.; Hazemann, J. L.; Mench, M.; Cambier, P.; Prost, R. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, 30, 1540-1552.
- (30) Fourest, E.; Canal, C.; Roux, J. C. *FEMS Microbiology Reviews* **1994**, 14, 325-332.
- (31) Manceau, A.; Combes, J.-M. *Physical and Chemistry of Minerals* **1988**, 15, 283-295.
- (32) Manceau, A.; Hargé, J. C.; Sarret, G.; Hazemann, J. L.; Boisset, M. C.; Mench, M.; Cambier, P.; Prost, R. *Direct determination of heavy metals speciation in soils by EXAFS spectroscopy*, In *Third International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, 15th-19th May 1995*, Prost, R. 1995, Paris.
- (33) Whitaker, A. *Acta Cryst.* **1975**, B31, 2026-2035.
- (34) Leciejewicz, J. *Acta Cryst.* **1961**, 14, 1304.
- (35) Rehr, J. J.; Mustre de Leon, J.; Zabinsky, S. I.; Albers, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5135-5145.
- (36) Tobin, J. M.; Copper, D. G.; Neufeld, R. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, 47, 821.
- (37) May, H. *Biosorption by industrial microbial biomass*. 1984, McGill University, Montreal.
- (38) Plette, A. C. C.; Benedetti, M. F.; Van Riemsdijk, W. H. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, 30, 1902-1910.
- (39) Guseinov, G. A.; al., e. *Koord. Khim* **1984**, 10, 117.
- (40) Burgess, J. *Ions in solution*; Ellis Horwood Series in Inorganic Chemistry: Chichester, England, 1988.

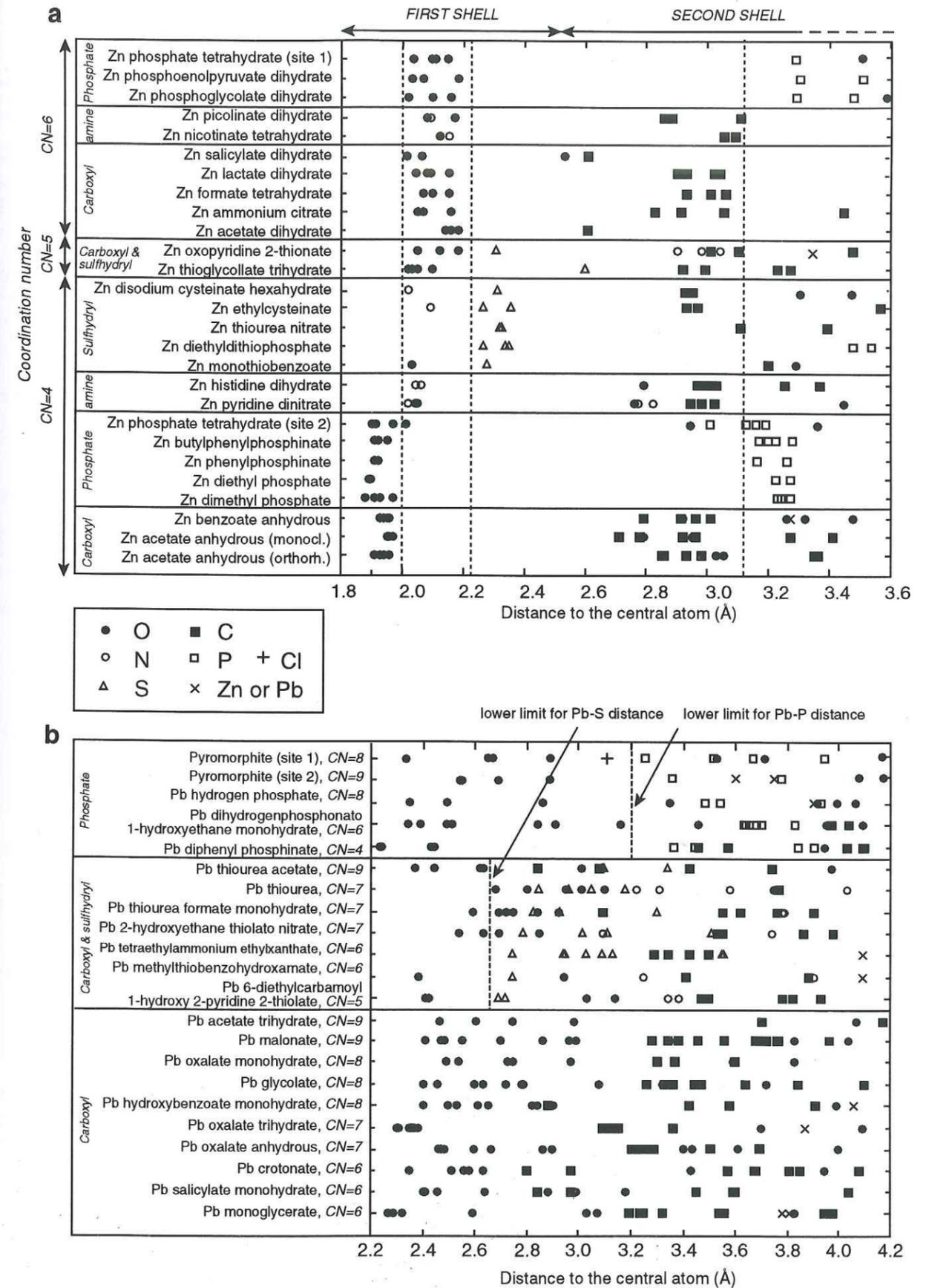
TABLE 1. Structural parameters determined by FEFF simulations of EXAFS spectra for Zn complexed to *Penicillium chrysogenum* cell wall

Compound	1st O-shell				2nd P-shell			
	R (Å)	CN <sub>O</sub>	Δσ (Å)	Q	R (Å)	CN <sub>P</sub>	Δσ (Å)	Q
Zn phosphate dihydrate	1.97	4.0	0.01	0.01	3.00	1.0	0.00	0.04
					3.15	2.0	0.00	
					3.50	1.0	0.00	
A, 7.6 10 <sup>-3</sup> mmol/g	1.97	3.2	0.00	0.002	3.08	1.0	0.00	0.03
					3.54	1.7	0.01	
B, 1.5 10 <sup>-2</sup> mmol/g	1.98	3.0	0.00	0.005	3.07	1.0	0.00	0.05
					3.54	1.1	0.01	
C, 1.5 10 <sup>-1</sup> mmol/g	1.98	2.8	0.00	0.007	3.06	0.8	0.00	0.05
					3.55	1.0	0.01	
D, 2.4 10 <sup>-1</sup> mmol/g	1.99	2.3	0.00	0.004	3.06	0.7	0.00	0.04
					3.55	1.4	0.01	

R: interatomic distances, CN: number of atomic neighbors, Δσ: differential Debye-Waller factor expressed as the difference of σ between the reference and the sample, Q: figure of merit for the spectral fit  $Q = \sum (k^2 \chi_{\text{exp}} - k^2 \chi_{\text{th}})^2 / \sum (k^2 \chi_{\text{exp}})^2$ . Amplitude and phase functions for Zn-O and Zn-P atomic pairs were calculated *ab initio* from the structure of Zn phosphate tetrahydrate (33) using FEFF7 (35). The precision on R<sub>O</sub> is 0.01 Å, and 0.03 Å for R<sub>P</sub>.

Figures caption

- Fig. 1: Radial atomic distributions of Zn (a) and Pb (b) coordination compounds used as functional groups reference materials.
- Fig. 2: Adsorption isotherms for Zn and Pb on *Penicillium chrysogenum* cell walls.  $[Me^{2+}]$  is the concentration in solution at equilibrium. In the conditions of the experiments,  $[Me^{2+}] \approx \Sigma(\text{dissolved Me species})$  and concentrations are proportional to activities because of the constant ionic strength. Letters A to G indicate samples studied by EXAFS. Pb is predominantly complexed by high affinity Pb1 sites (E); to Pb1 and Pb2 (G). In contrast, all Zn EXAFS spectra (A to D) are dominated by the contribution of Zn1. Zn2 could only be detected when all sites are saturated (D). The experimental error is within the size of the marker.
- Fig. 3: Zn K-edge EXAFS spectra (a, b, c) and RSFs (d) for *Penicillium chrysogenum* cell walls and Zn references. RSFs correspond to the modulus of the complex Fourier transform:  $(Re^2+Im^2)^{1/2}$ . Inset: Modulus (envelope curves) and imaginary part (oscillatory curves) of Fourier transforms for samples, Zn-P, and Zn-C pairs. Pb-P and Pb-C contributions were computed ab initio by using FEFF7 (35).
- Fig. 4: a) Fourier filtered  $Zn_{tet.}-O$  and  $Zn_{oct.}-O$  contributions for ZnO and Zn oxalate dihydrate. b) Zn-O contribution for samples. c) Zn-P contributions for *P. c.* cell wall samples. Solid line: experimental spectrum, dotted line: best fit.
- Fig. 5: Structural representation of possible  $\equiv(PO_4)_n-Zn$  and  $\equiv(COO)_n-Zn$  complexes existing in *P. c.* cell wall following equilibration of aqueous Zn.
- Fig. 6: Pb  $L_3$ -edge EXAFS spectra (a) and RSFs (b) for *P. c.* cell walls. Inset: Modulus and imaginary parts of Fourier transforms.



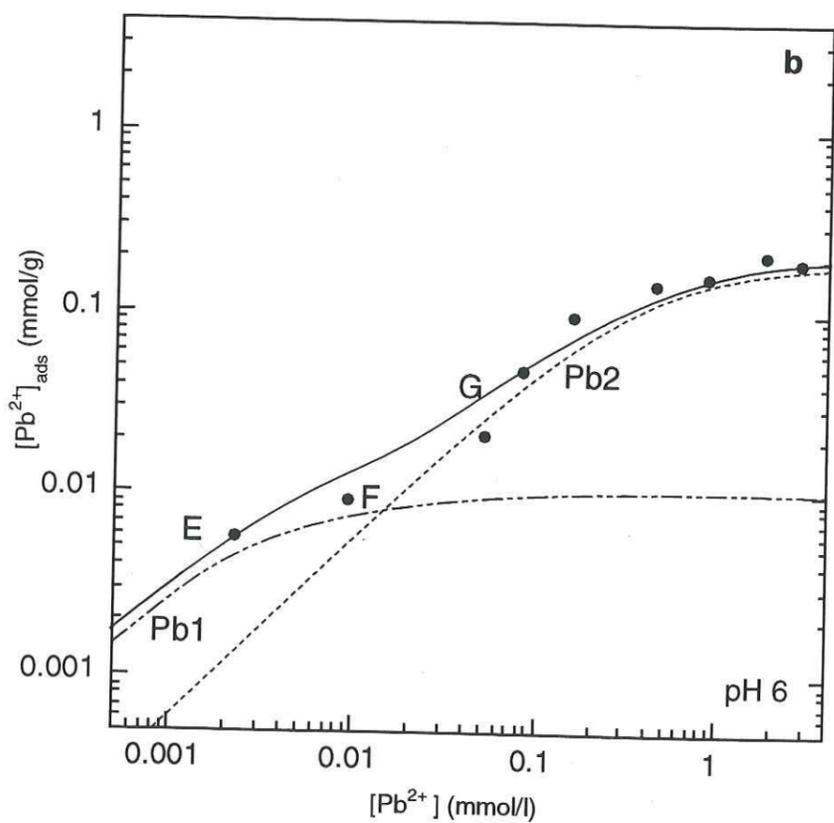
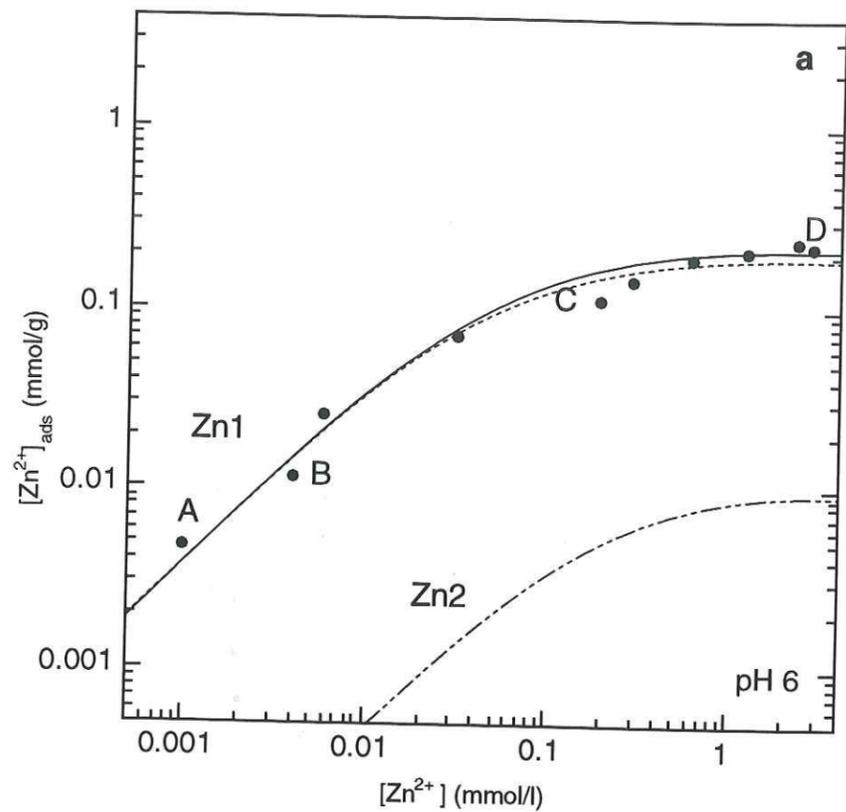


Figure 2

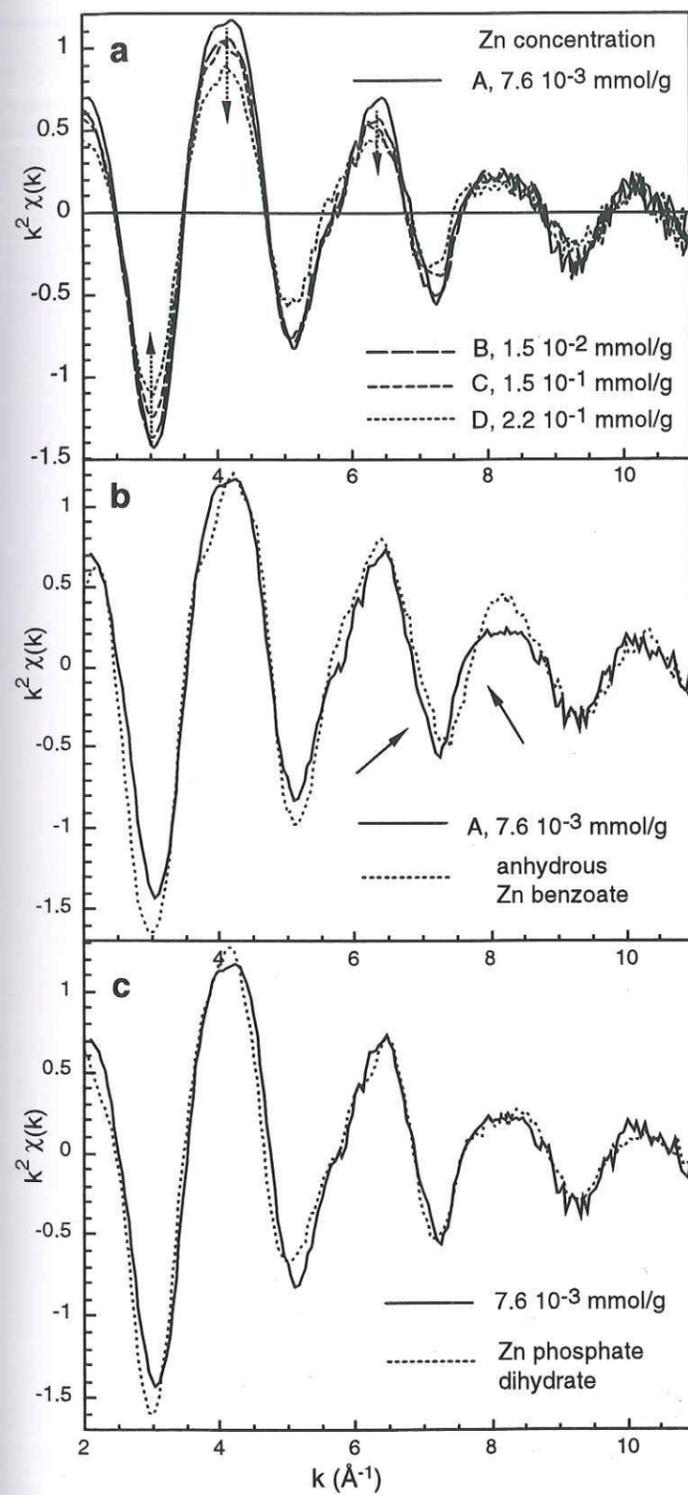
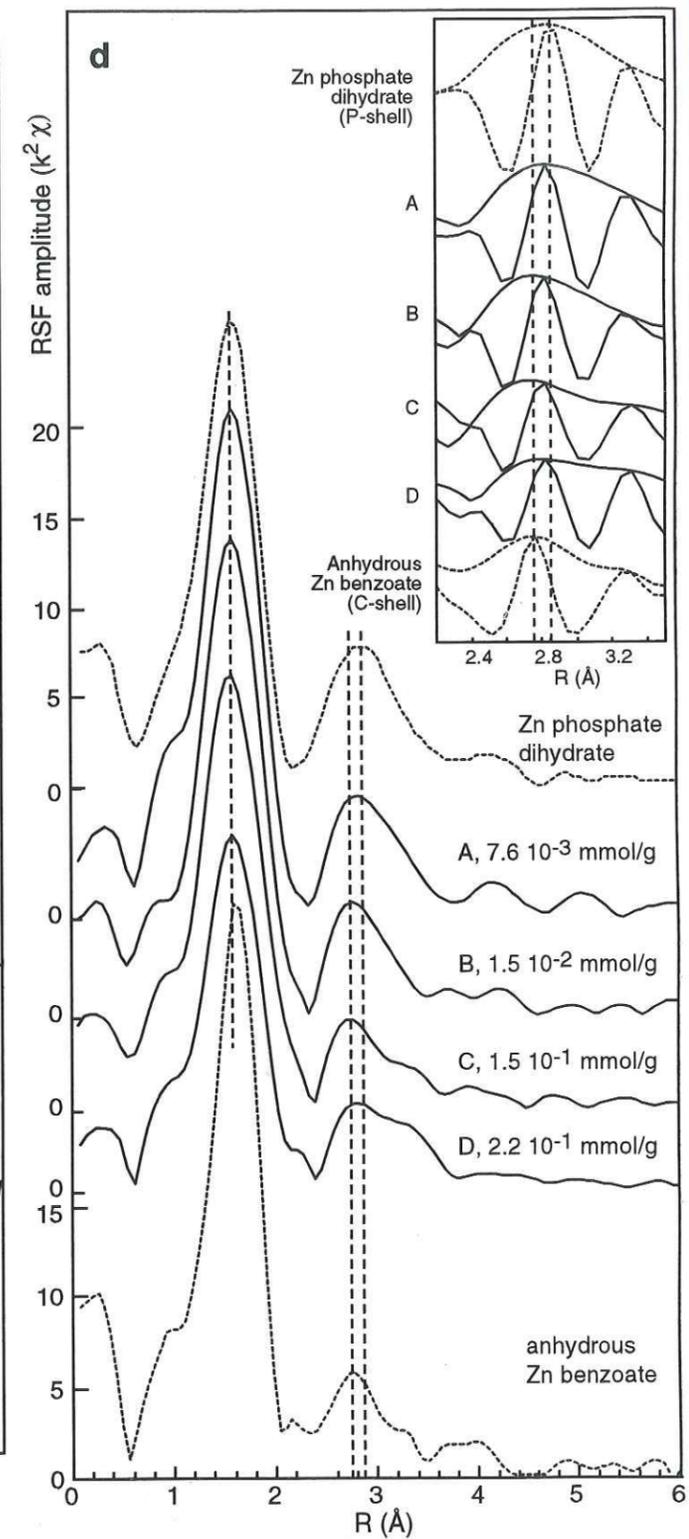


Figure 3



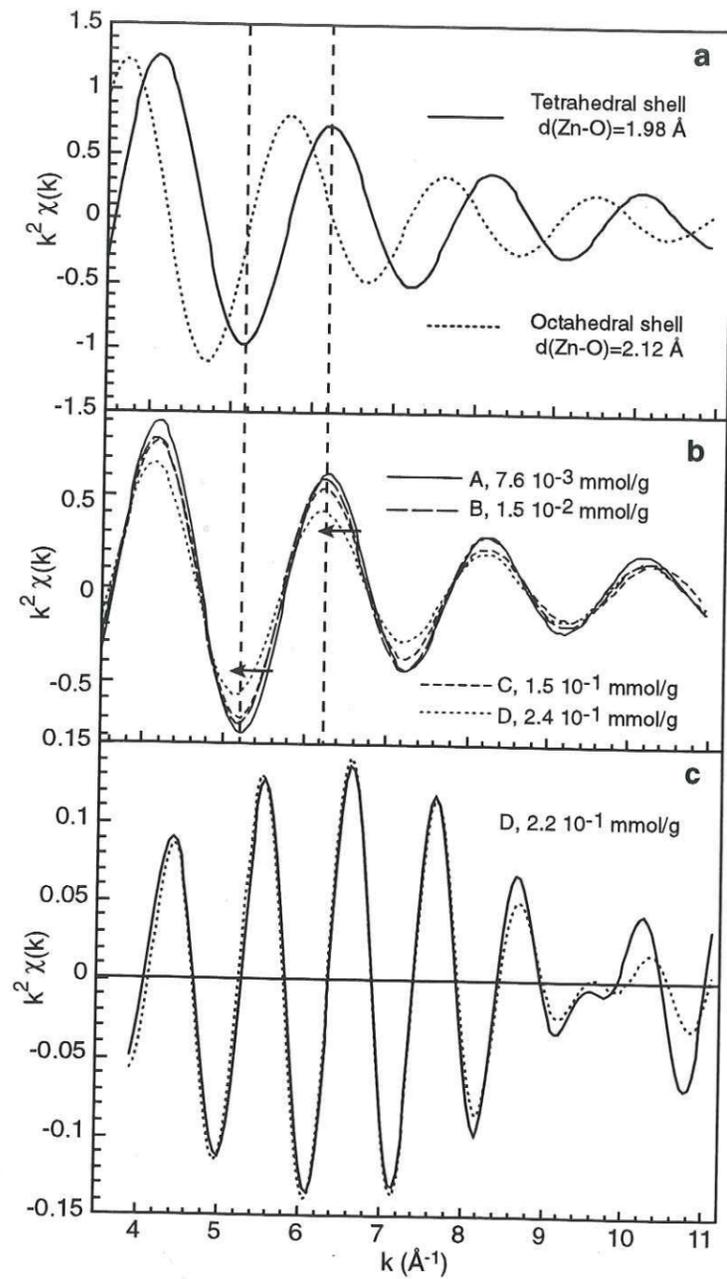


Figure 4

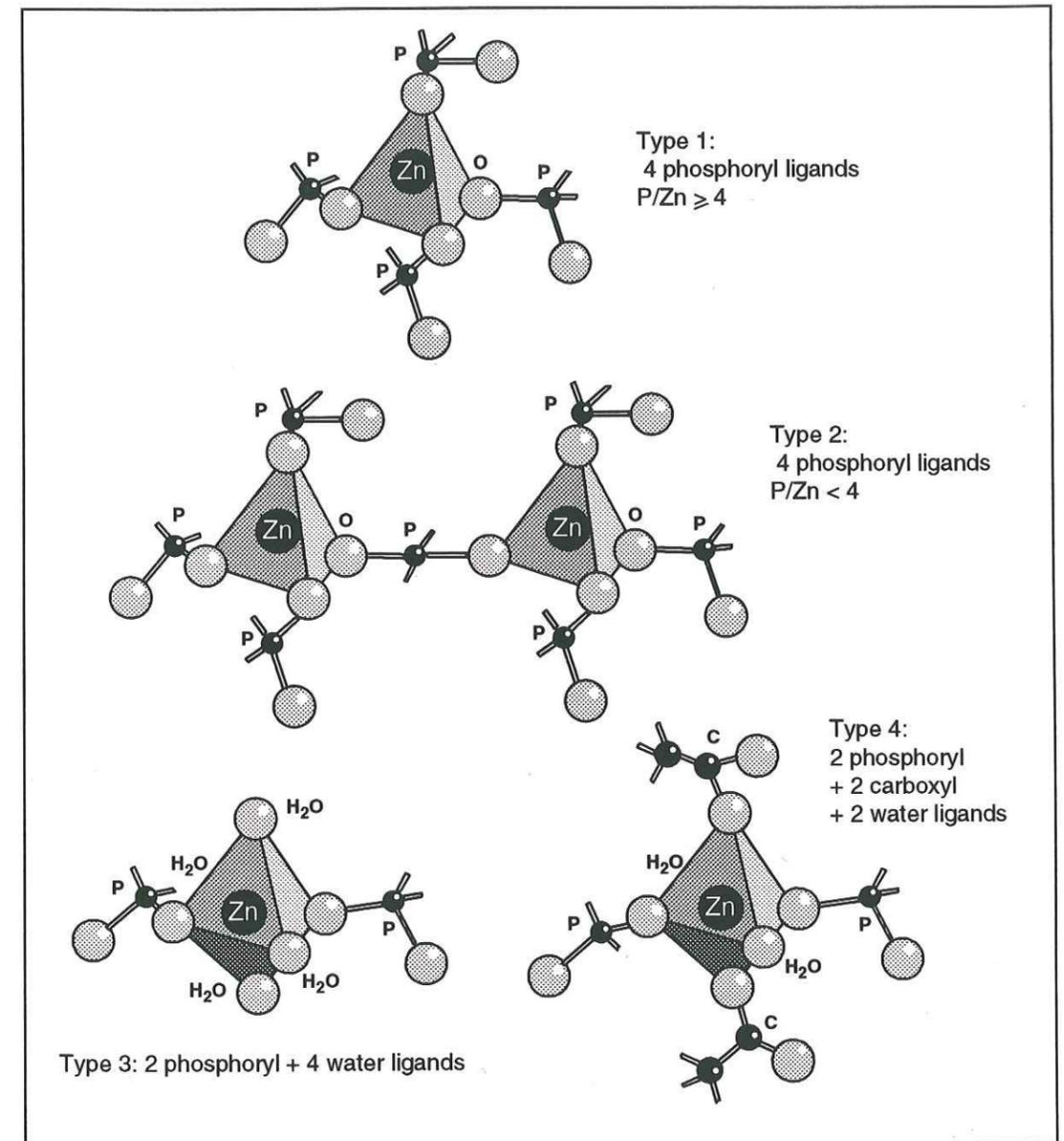


Figure 5

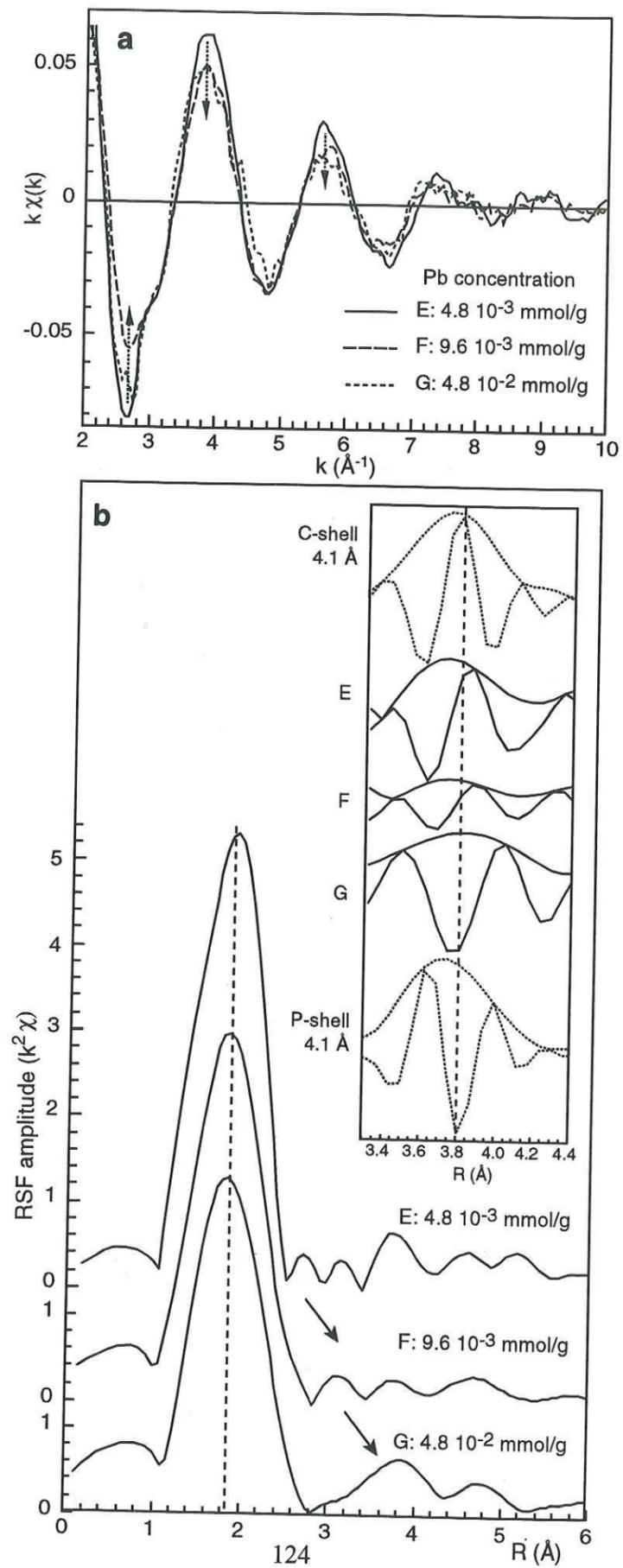


Figure 6

## CHAPITRE V.

### SPECIATION DU ZINC ET DU PLOMB DANS LES LICHENS

## CHAPITRE V. SPECIATION DU ZINC ET DU PLOMB DANS LES LICHENS

### V.1. INTRODUCTION

Les lichens sont des organismes symbiotiques, résultant de l'association d'une algue unicellulaire et d'un champignon. L'intérêt de ces organismes comme bioindicateurs de la qualité de l'air est connu depuis très longtemps [114]. Ils possèdent en effet plusieurs des caractéristiques du bioindicateur idéal [115]: Une large répartition géographique (*Xanthoria parietina* par exemple est un lichen subcosmopolite, on le trouve quasiment dans toutes les régions du monde), une robustesse [116], une longévité associée à une croissance très lente, et la capacité d'accumuler des métaux jusqu'à plusieurs % de leur poids sec sans dommage apparent pour l'organisme. Cette accumulation est facilitée par l'absence de cuticule et de système racinaire, qui permet un contact direct avec l'atmosphère et le sol. Un des atouts de la bioindication par les lichens est sa mise en oeuvre très simple et la richesse des informations fournies. Les lichens permettent d'étudier la pollution par des métaux [117-119], des radioéléments [120, 121], et même des composés organiques comme CO, NO<sub>x</sub>, SO<sub>2</sub> [122]. Mieux que des bioindicateurs, les lichens sont des espèces sentinelles («biomonitor» en anglais), *i.e.*, ils permettent de suivre les évolutions de la pollution au cours du temps. Ainsi, Déruelle [123] a observé la diminution de la concentration en plomb dans des lichens exposés au trafic autoroutier depuis l'introduction sur le marché de l'essence sans plomb. Le temps de résidence des métaux dans le thalle est donc limité. L'estimation de cette durée est pour l'instant controversée, et semble dépendre de plusieurs facteurs comme l'espèce considérée, la nature du métal, et les conditions climatiques [120].

Les mécanismes de piégeage et de bioaccumulation des éléments métalliques dans les lichens sont encore très mal connus. On distingue généralement chez les plantes deux types de comportements vis-à-vis des métaux. Certaines sont *hyperaccumulatrices* et peuvent contenir plus de 1 g/Kg de Co, Cu, Cr, Pb ou Ni, ou 10 g/Kg (1%) de Mn ou Zn [124]. Ces plantes développent probablement une réponse physiologique spécifique qui permet l'hyperaccumulation et la prévention de la toxicité des métaux. Elles sont actuellement très étudiées, notamment dans la perspective de leur utilisation en phytoremédiation [125-127]. Les autres sont seulement *tolérantes*, leur concentration en métaux est moindre, et leur métabolisme n'est pas modifié en présence d'éléments métalliques. Dans ce chapitre, nous allons étudier une espèce de lichen hyperaccumulatrice et deux espèces tolérantes, toutes les trois exposées à des

pollutions métalliques, afin de comparer les mécanismes extrêmement efficaces qui conduisent à la fixation des éléments métalliques dans les thalles lichéniques.

## V.2. ETAT DES CONNAISSANCES

### V.2.1. Méthodes analytiques d'étude des lichens

L'étude des végétaux requiert des précautions particulières afin d'éviter toute perturbation. En effet, la mise en contact des différents compartiments (cellulaires ou sub-cellulaires) entre eux peut modifier les équilibres chimiques. Il est donc indispensable d'observer des échantillons non perturbés. De nombreuses études ont été effectuées en incubant des thalles morts ou vivants dans des solutions contenant des métaux à différentes concentrations. Cela pose le problème de la transposition au milieu naturel des contaminations artificielles réalisées au laboratoire. En effet, dans le milieu naturel, les métaux peuvent être présents en solution, mais aussi dans les poussières, le substrat, etc... Il est donc préférable d'étudier des échantillons «naturellement pollués».

#### V.2.1.1. Concentration, composition

Les mesures de concentration sont généralement faites par ICP ou ICP-MS [118]. L'activation neutronique permet de doser simultanément un grand nombre d'éléments, mais le coût de l'analyse est souvent prohibitif. La chromatographie en couche mince est utilisée pour extraire les acides organiques et substances lichéniques. Par contre, elle modifie les équilibres chimiques et ne peut donc pas être utilisée pour étudier la spéciation des éléments métalliques.

#### V.2.1.2. Localisation des éléments métalliques

La microscopie électronique (TEM, SEM), la microsonde, et la fluorescence X en mode dispersif (EDX) sont les méthodes les plus couramment utilisées pour localiser les métaux dans les lichens. L'étude de lichens entiers ou en coupe a permis d'identifier des particules minérales comme  $\alpha\text{PbO}$  [128-132], ou des zones à forte concentration en métaux comme les parois cellulaires fongiques [131]. Ces techniques sont à l'origine d'une grande partie des connaissances actuelles sur la forme chimique des métaux dans les lichens. Cependant, elles ne sont applicables qu'à des thalles très concentrés en métaux. La fluorescence X sur rayonnement synchrotron a été utilisée sur des végétaux supérieurs, elle possède une limite de détection en concentration plus basse, et une meilleure résolution spatiale que la fluorescence X sur un générateur classique [16, 133]. Elle pourrait donc permettre d'étudier des échantillons moins

concentrés. Un autre inconvénient de ces méthodes est qu'elles ne permettent pas de quantifier les différentes formes chimiques identifiées.

### V.2.1.3. Spéciation des éléments métalliques

La diffraction des rayons X (DRX) peut être utilisée pour déterminer la forme chimique des éléments métalliques lorsque les concentrations sont élevées (> quelques %), les composés bien cristallisés et de structure connue. Purvis [134] a ainsi observé des cristaux d'oxalate de cuivre à la surface d'un lichen. Cette technique n'est cependant pas applicable aux complexes métal-substances lichéniques (voir V. 2. 2), dont la composition et la structure ne sont pas connues, ni aux complexes non ou mal cristallisés. Les spectroscopies infrarouge [134] et Raman [135] ont permis d'identifier des sels d'oxalate et de substances lichéniques. Ces techniques, comme la RMN du  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , ou  $^{31}\text{P}$ , ne permettent pas toujours d'identifier une forme chimique de façon certaine, ni de déterminer le pourcentage de métal présent sous cette forme. D'autres méthodes spectroscopiques ont été utilisées pour l'étude des plantes supérieures [136]. La RPE a été utilisée dans le cas d'ions paramagnétiques comme Mn(II), Co(II), Cu(II), V(V), Cr(V). L'XPS a également été mise en oeuvre pour déterminer le degré d'oxydation du platine à la surface des racines de *Eichhornia crassipes*. La spectroscopie d'absorption X a récemment été utilisée pour déterminer la forme chimique des métaux dans des plantes supérieures: La spectroscopie XANES a été employée pour étudier la forme chimique du cadmium dans la moutarde indienne [27], et du manganèse dans des racines de blé [29], la spectroscopie EXAFS a permis de montrer que le nickel est complexé à l'histidine dans l'espèce hyperaccumulatrice *Alyssum lesbiacum* [12].

### V.2.2. Mécanismes d'accumulation des éléments métalliques

Les polluants métalliques peuvent pénétrer dans le thalle sous forme de particules minérales d'origine atmosphérique, ou de cations présents dans la solution du sol ou dans l'eau de pluie. Goyal et al. [137] a montré la possibilité pour les rhizines de *Peltigera canina* d'absorber et de transporter les métaux (Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn) dans le thalle. Aujourd'hui, trois hypothèses sont proposées pour le piégeage et l'accumulation des métaux par les lichens [115, 138-141]. L'examen de la littérature concernant les interactions lichen - roche métallifère nous a conduit à formuler une quatrième hypothèse.

- Piégeage de particules minérales provenant de retombées atmosphériques dans l'entrelacs des filaments fongiques de la médulle [132]. Jones [131] a identifié par SEM et DRX du quartz, de la calcite, de la whewellite (oxalate de calcium monohydrate), du plomb métallique et oxydé, ainsi que de l'hydrocérussite  $[\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2]$  dans le thalle du lichen *Stereocaulon*

*vesuvianum* poussant sur les ruines d'une ancienne fonderie de plomb. De même, Johnsen [142] a identifié par SEM et EDX des particules de monoxyde de plomb  $\alpha\text{PbO}$  dans le thalle de *Lecanora conizaeoides* provenant d'une région industrielle. D'après Richardson [138], les particules minérales peuvent interagir par liaison faible (attraction électrostatique et/ou liaison hydrogène) avec la paroi du champignon. Les métaux restent sous forme minérale et ne pénètrent pas dans les cellules. Si les métaux sont majoritairement présents sous cette forme, les rapports de concentration, par exemple [143]/[Ti], sont alors identiques dans le thalle et les poussières atmosphériques [144]. Le dosage des éléments métalliques dans le lichen constitue donc un moyen simple pour identifier ce mode de piégeage.

- *Complexation ou échange ionique avec les macromolécules de la paroi fongique*, riches en groupements carboxyle, hydroxyle, phosphoryle, amine, sulfhydryle. Cette hypothèse s'appuie sur de nombreuses études de lichens placés dans des solutions métalliques, qui montrent la capacité d'adsorption des métaux sur la paroi [115]. Dans ce cas, la capacité d'accumulation est limitée intrinsèquement par la capacité d'échange cationique de la paroi. Haas [128] a étudié la bioaccumulation de l'uranium par le lichen *Peltigera membranacea*. Il a observé par microsonde l'accumulation d'U sur les surfaces corticales du lichen, et un rapport stoechiométrique U/P de 1, suggérant la complexation de U sur les groupements phosphate des parois cellulaires.
- *Localisation intracellulaire des métaux*. Beaucoup moins important et mal connu, ce mécanisme nécessiterait un transport transmembranaire consommateur d'énergie. Les métaux seraient localisés dans le cytoplasme ou dans la vacuole, complexés par des métallothionéines<sup>3</sup>, des acides aminés, ou des phosphates. [132] a montré par TEM et EDX que le lichen *Caloplaca aurantia* exposé à une pollution urbaine contenait du zinc à l'intérieur des cellules et sur les parois des hyphes.
- *Complexation extracellulaire par des acides organiques*. Les phénomènes d'altération des roches par les lichens ont été largement étudiés, en particulier pour la dégradation accélérée des monuments historiques qu'ils occasionnent [145]. Parmi les agents d'altération, l'**acide oxalique**, fort complexant cationique excrété par certains lichens, favorise la dissolution des minéraux. Il forme des précipités d'oxalate de Ca [135], de Cu [134, 146], de Mg et de Mn [147] selon la composition de la roche. L'oxalate est donc un agent immobilisateur de métaux, on peut envisager pour ce métabolite un rôle de complexant et d'agent anti-toxicité

<sup>3</sup> Les métallothionéines sont des protéines métallo-complexantes, polymères de glutamine, cystéine et glycine, de formule générale:  $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$ ,  $n=2-11$ . Le précurseur des métallothionéines est le glutathion ( $n=1$ ).

dans le cas de lichens pollués. Cette hypothèse est renforcée par une étude sur des champignons non lichénisés, qui montre la présence d'oxalate de cuivre chez des espèces résistantes au cuivre, métal fongicide traditionnel [148].

Des études sur les interactions entre les champignons filamenteux non lichénisés et les métaux [149, 150] ont montré que les éléments métalliques pouvaient être complexés à l'extérieur des cellules par divers acides organiques: l'acide oxalique, mais aussi l'**acide citrique, malique, malonique**. L'hypothèse de la présence de ces acides organiques et de leur rôle d'agent complexant des métaux doit donc être envisagée dans le cas des lichens. Les **substances lichéniques** [151] sont des métabolites secondaires spécifiques des lichens, localisés dans le cortex ou la médulle. Ce sont pour la plupart des polyphénols hydrophobes contenant un ou plusieurs groupements acides. Ils sont responsables de la couleur vive de certaines espèces. On leur prête de nombreuses fonctions [152]: absorption et conversion des radiations lumineuses, barrière à l'évaporation de l'eau à la surface du thalle, antioxydant [153], antibiotique, antiherbivore. Purvis a montré par SEM, microsonde, et spectroscopie infrarouge que les substances lichéniques d'un lichen poussant sur une roche cuprifère formaient des complexes avec le cuivre [154, 155]. Ils pourraient donc jouer un rôle de complexant des polluants métalliques.

Il faut noter que dans un même thalle, plusieurs mécanismes peuvent éventuellement opérer simultanément. De plus, de très nombreux facteurs externes ou internes semblent influencer sur l'accumulation des éléments métalliques:

- *Le facteur écologique*. Les conditions de milieu comme le climat, la pluviométrie, le vent, le degré d'hydratation du thalle, la nature du substrat (sol, roche, tronc d'arbre, etc...), la présence de cations compétiteurs des métaux (Ca, K, ...) peuvent modifier le taux d'accumulation des métaux. Ce facteur doit être pris en compte si on compare les concentrations en métaux dans des lichens originaires de régions différentes.
- *Le facteur morphologique*. La surface du lichen conditionne les échanges avec l'atmosphère ou le sol. Sloof et Wolterbeck (1992) ont montré que l'activité du radiocésium dans les thalles du lichen foliacé *Xanthoria parietina* prélevés sur un même site n'était pas proportionnelle à la masse de lichen, mais à sa surface. L'orientation du thalle (horizontale ou verticale) et sa position par rapport aux vents dominants sont aussi des facteurs à prendre en considération.
- *Le facteur physiologique* est le facteur déterminant pour l'accumulation des métaux dans les organismes vivants. De nombreuses études sur des végétaux supérieurs hyperaccumulateurs de métaux [156, 157] ont montré que la résistance de ces espèces résulte de la complexation intra- ou extracellulaire des éléments toxiques par des ligands spécifiques dont l'affinité est élevée. Les ligands peuvent être des métabolites simples (acides organiques, acides aminés)

ou des protéines de type métallothionéines (MT). La production des MT peut être induite par une forte concentration en métal, par modification de l'expression génétique et augmentation de la transcription du gène codant pour la MT [158, 159]. Il s'agit donc de mécanismes inductifs au niveau moléculaire, activant une voie métabolique particulière. Aucun de ces mécanismes moléculaire n'a encore été mis en évidence dans le cas des lichens.

### V.3. SPECIATION DU ZINC ET DU PLOMB DANS TROIS LICHENS CONTAMINÉS

#### V.3.1. Description des sites et des espèces étudiées

##### V.3.1.1. Auby (Nord)

Ce site métallifère se situe dans la région de Douai, à proximité de l'usine de traitement du minerai de plomb et de zinc Union Minière (anciennement Compagnie Royale Asturienne des Mines), en activité depuis le début du siècle. Les minerais utilisés ont été la calamine (silicate hydraté de zinc) pendant les premières années de fonctionnement, puis la blende (ZnS). Les scories résiduelles ont été épandues aux abords des unités de production. Les végétaux qui colonisent ce site sont donc soumis à deux sources de pollution métallique: les rejets atmosphériques de l'usine, et le sol. Le tableau V-1 donne les concentrations mesurées dans le sol. Les métaux en très forte concentration sont le zinc, le plomb, le fer, le thallium.

Tableau V-1: Analyses du sol d'Auby

Elément	conc. (mg/Kg)	Elément	conc. (mg/Kg)	Elément	conc. (mg/Kg)	Elément	conc. (mg/Kg)
Ag	10	Cr	100	La	25	Ta	0.3
Al	22 000	Cs	2	Mg	6 000	Tb	1.2
As	76	Cu	282	Mn	2 700	Th	9
Ba	440	Dy	11	Na	1 200	Tl	1 005
Br	8.5	Eu	2	Pb	1484	U	3
Ca	52 000	Fe	20 960	Rb	25	V	82
Cd	245	Hf	3	Sb	35	W	1
Ce	<30	Hg	<30	Sc	18	Zn	26 000
Co	16	K	4 160	Sm	8	Zr	350

Analyses effectuées par activation neutronique, fournies par C. Van Haluwyn.



Photo V-1: *Diploschistes muscorum*

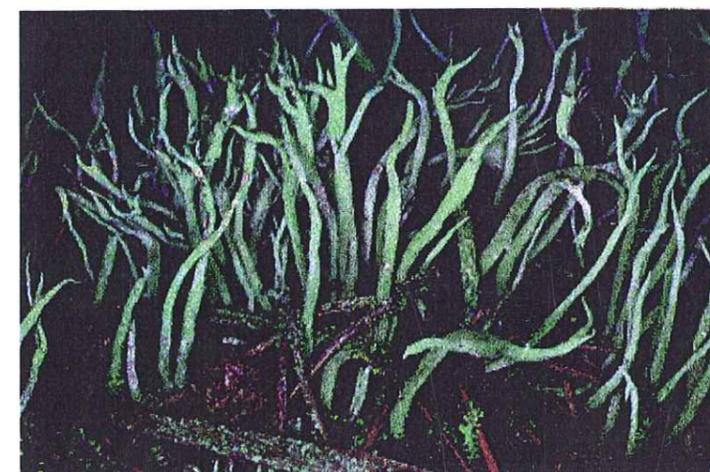


Photo V-2: *Cladonia subulata*

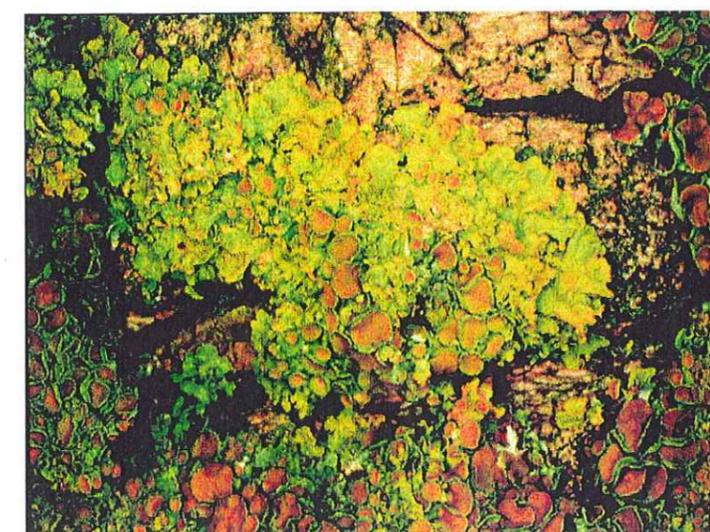


Photo V-3: *Xanthoria parietina*

Les lichens ont été prélevés dans un jardin à l'abandon, mitoyen de l'usine. Le milieu est colonisé par des plantes métallophytes absolues *Armeria maritima*, *Cardaminopsis halleri* et des pseudo-métallophytes *Arrhenaterum elatius*, *Silene vulgaris*, *Agrostis capillaris*. Les deux lichens étudiés, *Diploschistes muscorum* et *Cladonia subulata* (photos V-1 et V-2) sont des espèces terricoles, pseudo-métallophytes.

### V.3.1.2. Paimboeuf (Loire Atlantique)

La source de pollution de ce site est l'usine Octel qui produit du plomb tétraméthyle  $Pb(CH_3)_4$  et tétraéthyle  $Pb(C_2H_5)_4$ , additifs antidétonants pour l'essence. L'usine produit des rejets atmosphériques de ces organoplombiques. Dans le sol, ces molécules se décomposent sous l'effet de la chaleur, de la lumière et des bactéries, et le plomb tétravalent se transforme rapidement en plomb divalent [160, 161]. Le tableau V-2 donne les concentrations en métaux dans la tranche 0-20 cm d'un sol à proximité de l'usine (zone B) [143]. Le seul métal rejeté par l'usine étant le plomb, la présence d'autres métaux (Cr, Cu, Mn, Zn) provient probablement d'activités industrielles antérieures, ou de rejets atmosphériques d'industries proches.

Tableau V-2: Analyses du sol de Paimboeuf

Elément	conc. (mg/Kg)	Elément	conc. (mg/Kg)
Cd	0.36	Mn	936
Cr	98	Pb	234
Cu	45	Zn	257
Fe	5 100		

D'après Mench et al [143]

L'espèce lichénique étudiée, *Xanthoria parietina*, peut être saxicole ou corticole (photo V-3). Les lichens ont été prélevés sur des poteaux en ciments et sur des troncs d'arbre aux abords de l'usine. Ils ont été exposés uniquement aux polluants atmosphériques.

### V.3.2. Méthodes

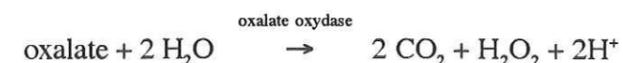
Les lichens d'une même station ont été collectés le même jour puis rincés à l'eau déionisée.

#### V.3.2.1. Analyse élémentaire

Les lichens ont été pesés et mis en solution dans l'eau régale. Un aliquot a été séché à l'étuve à 105° pendant 3.5 heures pour déterminer le poids sec. Les dosages ont été effectués par ICP-MS. Le lichen *D. muscorum* étant très riche en Zn, la solution a dû être diluée pour ne pas polluer l'appareil, ce qui a eu pour conséquence d'augmenter la limite de dosabilité des éléments traces. Ainsi, certains éléments, comme le chrome, n'ont pas pu être dosés dans ce lichen.

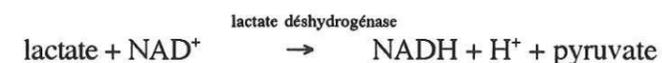
#### V.3.2.2. Dosage des acides organiques

L'oxalate a été dosé par la méthode enzymatique colorimétrique commercialisée par la société Biorea (Talent, 21). La réaction enzymatique (totale) catalysée par l'oxalate oxydase est la suivante:



Le lichen est mis en solution dans HCl 1M. Après sonification et centrifugation, l'oxalate présent dans le surnageant est précipité par le sulfate de calcium en milieu hydroalcoolique, le tout est centrifugé, on élimine ainsi les cations présents en solution. Le culot est remis en solution, l'oxalate est oxydé par addition d'oxalate oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé, en présence de périoxydase, oxyde le couple diéthylaniline/méthyl-3 benzothiazoline-2 hydrazone, qui donne un colorant bleu violacé. Ce produit dont le maximum d'absorbance se situe à 590 nm est dosé par colorimétrie.

Le lactate a aussi été dosé par une méthode enzymatique colorimétrique [162]. La réaction enzymatique (totale) catalysée par la lactate déshydrogénase est la suivante:



Le lichen est mis en solution dans  $\text{HClO}_4$ . Après passage dans la cuve à ultrasons et centrifugation, le surnageant est passé sur une résine cationique sous forme  $\text{H}^+$  (BIORAD AG 50W 200-400 mesh) afin d'éliminer les cations en solution, et le tout est centrifugé. Une prise d'essai du surnageant est ajoutée à une solution contenant un tampon hydrazine-glycine-EDTA à pH 9, du NAD, et la lactate déshydrogénase. Le NADH est dosé par colorimétrie (absorbance maximum à 340 nm).

Le malate a été dosé par électrophorèse capillaire. L'appareil utilisé est un CIA Waters équipé d'un détecteur UV. Les dimensions du capillaire en silice sont 60 cm de longueur totale (52.5 cm jusqu'au détecteur), et 75  $\mu\text{m}$  de diamètre interne. Les mesures ont été effectuées à 24°C, avec une tension de 20 kV. Avant injection, le capillaire est rincé avec NaOH 1 M et de l'eau déionisée. L'électrolyte est une solution à pH 8.3 contenant 4.6 M de chromate, de tensio actif OFM OH fourni par Waters, et d'acide borique. L'injection a été effectuée en mode électrocinétique à 5 kV pendant 15s. La longueur d'onde utilisée pour la détection des espèces est 254 nm. Pour la mise en solution du malate, 100 mg de lichen en poudre sont mis en suspension dans 300 ml d'acétone. Nous avons choisi ce solvant car l'utilisation de HCl ou  $\text{HNO}_3$  n'est pas possible: Lors de l'électrophorèse, la présence d'ions  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{NO}_3^-$  en solution crée un pic de très grande intensité, qui masque la plupart des autres pics. Après sonification et centrifugation de la suspension d'acétone, le surnageant est dilué aux 2/3 avec de l'eau déionisée. La concentration en malate dans la solution est déterminée à l'aide de trois standards internes,

préparés en ajoutant des quantités connues de malate à la solution de lichen. La concentration totale en malate est proportionnelle à l'aire du pic correspondant au malate.

### V.3.2.3. Diffraction et absorption X

Les thalles ont été lyophilisés et broyés dans l'azote liquide. Les diffractogrammes X ont été enregistrés sur la poudre. Les mesures d'absorption X ont été réalisées sur des poudres pressées sous forme de pastilles de 12 mm de diamètre. Le tableau V-3 liste les éléments étudiés par cette méthode pour chaque échantillon. Pour les échantillons dont la concentration de l'élément étudié est inférieure à 10 mg/Kg, les spectres ont été enregistrés en mode de fluorescence avec un détecteur au germanium Canberra à 13 éléments (taux de comptage: environ 200 000 cps/s), 2 à 5 spectres de 2 heures ont été ajoutés. Pour les autres échantillons plus concentrés, les spectres ont été enregistrés en transmission.

Tableau V-3: Eléments étudiés par spectroscopie d'absorption X dans les lichens

Lichen	Eléments
<i>Diploschistes muscorum</i> (Auby)	Zn, Pb
<i>Cladonia subulata</i> (Auby)	Zn
<i>Xanthoria parietina</i> (Paimboeuf)	Pb

### V.3.3. Résultats des analyses chimiques

Le tableau V-4 montre que d'après la définition de Baker et Brooks [124], seul *D. muscorum* est hyperaccumulateur de Pb et Zn. On voit que *Xanthoria parietina* ne contient pas seulement du plomb, mais aussi du nickel et du zinc. Il existe donc probablement une autre source de pollution métallique produisant des rejets atmosphériques à proximité du site de Paimboeuf.

Tableau V-4: Concentrations élémentaires en mg/Kg de poids sec

Lichen	Al	As	Ba	Ca	Cd	Co	Cr
<i>C. subulata</i>	185	0.45	10	1396	2	1	43
<i>D. muscorum</i>	1357	11	86	14143	178	13	-
<i>X. parietina</i>	4623	5	31	6306	4	7	38
Lichen	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ni	P
<i>C. subulata</i>	11	403	2276	490	17	180	729
<i>D. muscorum</i>	304	3626	2948	585	23	-	-
<i>X. parietina</i>	21	6164	6366	1727	-	111	988
Lichen	Pb	Rb	Sb	Sn	Sr	Zn	Zr
<i>C. subulata</i>	38	11	0	1	12	585	-
<i>D. muscorum</i>	2907	7	14	51	-	32458	-
<i>X. parietina</i>	581	27	-	5	16	276	49

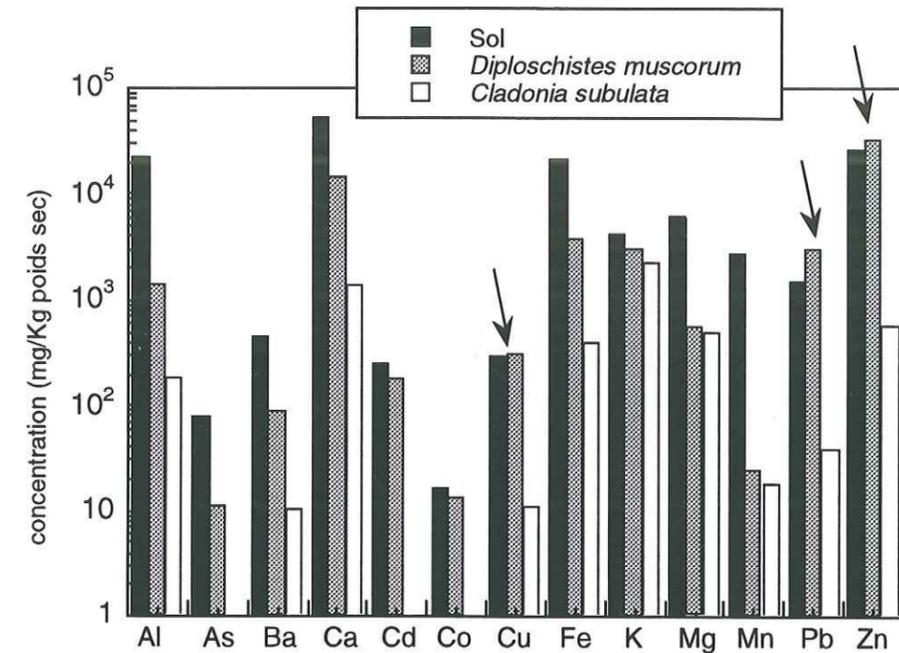


Figure V-1: Comparaison des concentrations en éléments dans le sol et dans les lichens d'Auby

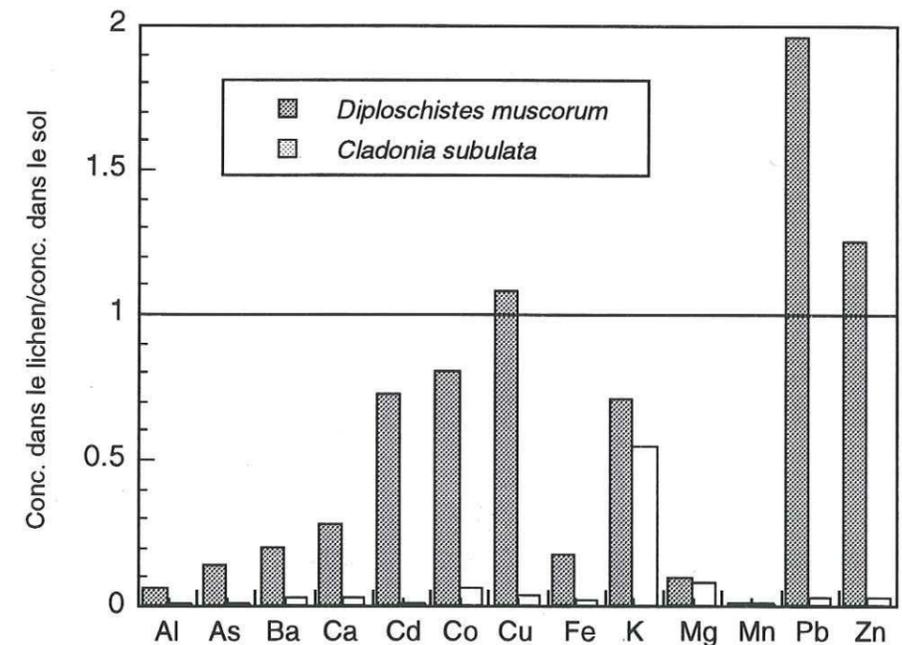


Figure V-2: Facteur d'accumulation des éléments dans les lichens d'Auby

Les figures V-1 et V-2 comparent les teneurs en éléments dans les deux lichens d'Auby (*D. muscorum* et *C. subulata*) et dans leur substrat, ainsi que les taux d'accumulation des différents éléments. Cette comparaison thalle/sol n'est pas possible pour *X. parietina*, car ce lichen n'est pas en contact avec le sol, il n'est exposé qu'aux rejets atmosphériques. Les taux d'accumulation varient fortement d'un lichen à l'autre bien que les deux soient soumis aux mêmes conditions de milieu. Ils sont tous plus élevés pour *D. m.* que pour *C. s.* Pour expliquer ces différences, on peut invoquer le facteur morphologique. *Diploschistes muscorum* possède un thalle crustacé, formé de petites écailles ou coupelles de quelques millimètres fixées sur le sol (photo V-1). Le rapport surface/masse est important. Ce lichen est donc très exposé aux retombées atmosphériques, aux particules et à la solution de sol avec lequel il est en contact étroit. *Cladonia subulata* possède un thalle composite, formé d'un thalle primaire squamuleux et d'un thalle secondaire fruticuleux, formé de podétions (pseudo-tiges creuses) (photo V-2). Sa surface ainsi que son contact avec le sol sont beaucoup plus limités que ceux de *D. muscorum*. La morphologie peut donc être une des facteurs expliquant la plus forte accumulation de métaux dans *D. muscorum* par rapport à *C. subulata*.

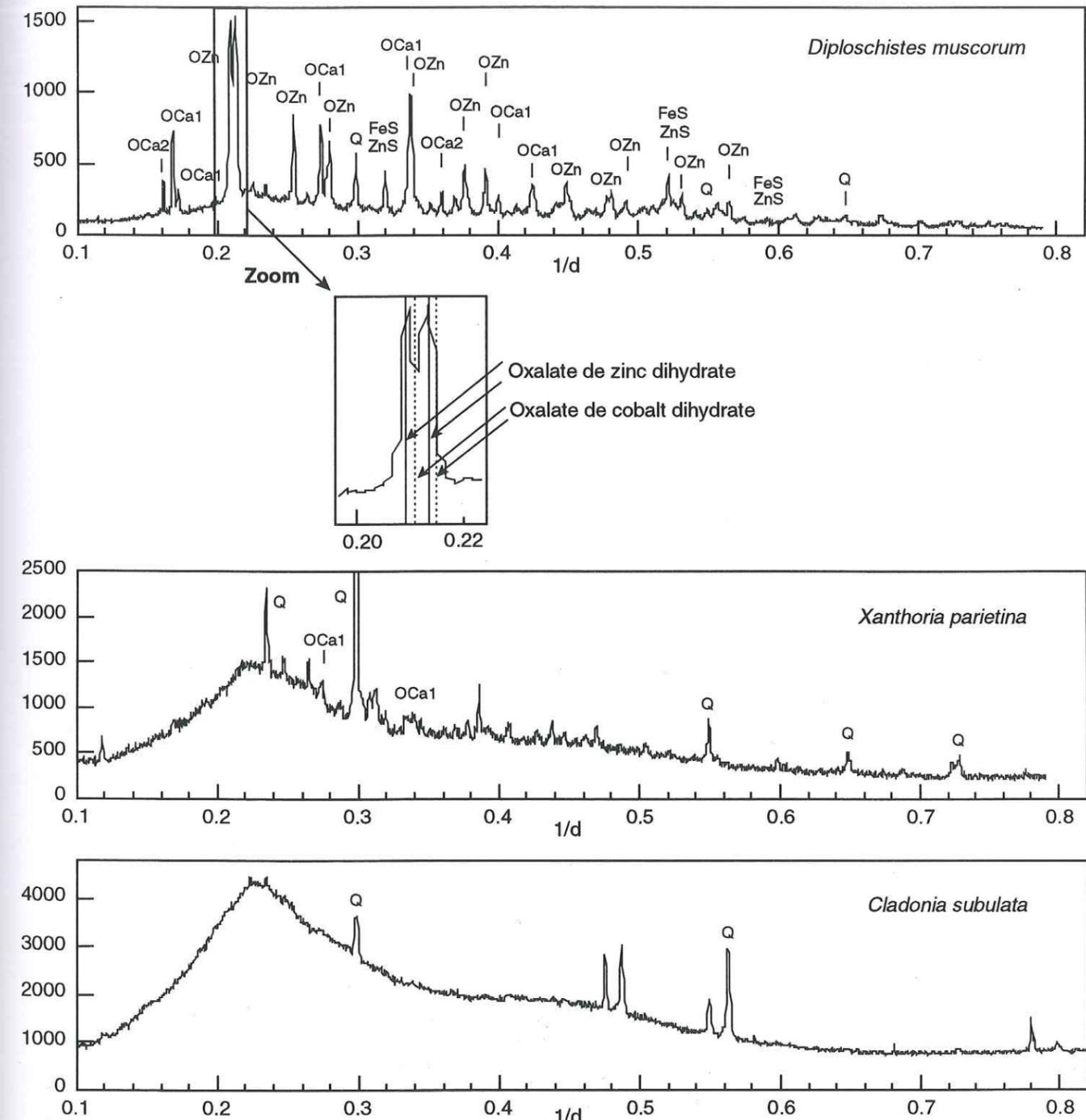
Cependant, on observe aussi des différences d'accumulation importantes en fonction de l'élément: Pour *D. muscorum*, le taux d'accumulation du zinc est 200 fois plus élevé que celui du manganèse. Ce lichen présente des taux supérieurs à 1 pour Cu, Pb et Zn, ce qui signifie qu'il concentre ces éléments de façon active. Ces observations nous conduisent à penser que *Diploschistes muscorum* a développé des mécanismes physiologiques adaptatifs en réponse à la présence de certains métaux comme le cuivre, le zinc ou le plomb, et qui favorisent leur hyperaccumulation. *Cladonia subulata* n'a pas développé de tels mécanismes. Pour tester cette hypothèse, et tenter de préciser la nature de la réponse physiologique de chacun des lichens à la présence de zinc et de plomb, nous allons déterminer la forme chimique de ces éléments.

### V.3.4. Mécanismes de bioaccumulation

#### V.3.4.1. Analyse par DRX

La figure V-3 compare les diffractogrammes X des trois lichens. Celui de *Diploschistes muscorum* présente des pics de diffraction intenses et fins. Ce lichen contient donc des composés bien cristallisés. Nous avons identifié du quartz, de l'oxalate de calcium mono et dihydrate, de l'oxalate de zinc dihydrate, et des sulfures de fer et/ou de zinc. Les oxalates dihydratés de Fe, Co, Cr, Mg, Mn, Ni sont isomorphes de l'oxalate de zinc dihydrate [44]. Leurs raies principales sont légèrement décalées par rapport à la position des pics attribués à l'oxalate de zinc dihydrate, comme le montre l'exemple de l'oxalate de cobalt dihydrate (Fig. V-3). Ces composés peuvent donc être présents dans le lichen, mais en quantité très inférieure à celle de l'oxalate de zinc. Les diffractogrammes de FeS et ZnS sont superposés, on ne peut

donc pas conclure savoir lequel des deux sulfures est présent dans le lichen. Aucun minéral de plomb n'a pu être identifié.



Q: Quartz, OCa1: whewellite (oxalate de calcium monohydrate), OCa2: weddelite (oxalate de calcium dihydrate), OZn: oxalate de zinc dihydrate, FeS: sulfure de fer, ZnS: sphalerite.

Figure V-3: Diffractogrammes X des lichens

*Xanthoria parietina* contient du quartz et de l'oxalate de calcium monohydrate. Certains pics n'ont pas été attribués, ils pourraient correspondre à la présence de cristaux d'acide pariétinique ou de pariétine, les deux substances lichéniques synthétisées par ce lichen. Mais la structure, et donc la position des raies de diffraction de ces composés ne sont pas connues.

Le seul minéral identifié dans *Cladonia subulata* est le quartz. Là aussi, des pics n'ont pas pu être attribués. Ils pourraient correspondre à la présence de substances lichéniques cristallisées (acide fumarprotocétrarique).

Si on normalise les trois diffractogrammes à la hauteur de leur ligne de base, correspondant au signal de la phase amorphe, cette ligne de base est identique pour les trois lichens. On peut donc penser que ce signal correspond à la matrice organique des lichens. Un à deux composés de zinc ont été identifiés dans *Diploschistes muscorum*. Cependant, cela ne permet pas de conclure de façon définitive sur la forme chimique de cet élément, qui peut être inclu par ailleurs dans des phases amorphes, invisibles par cette méthode. Pour *Cladonia subulata* et *Xanthoria parietina*, l'information obtenue par DRX est extrêmement limitée et ne permet pas de conclure sur la spéciation du zinc et du plomb.

#### V.3.4.2. Analyse par spectroscopie EXAFS

##### V.3.4.2.1. Spéciation du plomb et du zinc dans *Diploschistes muscorum* et *Xanthoria parietina*

#### Mechanism of lichen resistance to metallic pollution

(Article soumis à Environmental Science & Technology, Août 1997).

#### MECHANISM OF LICHEN RESISTANCE TO METALLIC POLLUTION

Géraldine Sarret<sup>1\*</sup>, Alain Manceau<sup>1</sup>, Damien Cuny<sup>2</sup>, Chantal Van Haluwyn<sup>2</sup>, Serge Déruelle<sup>3</sup>, Jean Louis Hazemann<sup>1,4</sup>, Yvonne Soldo<sup>4</sup>, Laurent Eybert-Bérard<sup>1</sup>, Jean-Jacques Menthonnex<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Environmental Geochemistry Group, LGIT-IRIGM, University of Grenoble and CNRS, BP53, 38041 Grenoble cedex 9, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de Botanique et de Cryptogamie, Faculté des sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 3, rue du Pr. Laguesse, 59006 Lille Cedex, France

<sup>3</sup> Institut d'écologie, équipe de lichénologie, 7 Quai St Bernard, 75252 Paris, France

<sup>4</sup> Laboratoire de Cristallographie, CNRS, 25 avenue des Martyrs, BP 166, 38042 Grenoble Cedex 9, France

\* Correspondence should be addressed to Géraldine Sarret, gsarret@obs.ujf-grenoble.fr; tel: (33) 4 76 82 80 11; fax: (33) 4 76 82 81 01.

**Keywords:** lichen, speciation, hyperaccumulation, tolerance, metal, biomonitor

**Abstract**

Some lichens have a unique ability to grow in heavily contaminated areas due to the development of adaptative mechanisms allowing a high tolerance to metals. Here we report on the chemical forms of Pb and Zn in the metal hyperaccumulator (1), *Diploschistes muscorum*, and of Pb in the metal tolerant lichen, *Xanthoria parietina*. The speciation of Zn and Pb is investigated by Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS) spectroscopy (2) using the advanced 3rd generation synchrotron radiation source of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF). This study reveals that in both lichens, cells are protected from toxicity by extracellular complexation of heavy metals, but the strategies differ: In *D. muscorum*, Pb and Zn are accumulated through an enhanced excretion of oxalate, which precipitates toxic elements as insoluble salts, whereas in *X. parietina*, Pb is complexed to carboxylic groups of the fungal cell walls. We conclude that hyperaccumulation of metals results from a reactive mechanism of organic acid production, whereas metallo-tolerance is achieved by a passive complexation to existing functional groups.

**Introduction**

Three different mechanisms of metal immobilization are supposed to exist in air- and soil-polluted lichens (3) (Figure 1): (i) entrapment of metal-rich particulates originating from atmospheric aerosols, the metal being in mineral form, (ii) intracellular uptake with likely complexation to S-containing proteins called metallothioneins, as demonstrated for several metal-resistant higher plants (4, 5) and fungi (6, 7), and (iii) extracellular complexation within fungal cell walls, the metal being complexed to hydroxyl, carboxyl, phosphate, amine, or sulfhydryl functional groups. But the actual molecular mechanism whereby a number of lichen species can withstand anthropogenic contamination remains unknown. Besides, saxicolous lichens are known to encrust onto rocks by weathering the minerals of the substrate thanks to exuded molecules that complex the cations (Cu, Zn, Fe, Mn, Mg, Ca). Among these molecules, oxalate and lichen substances, the later which are responsible for their bright colour (8) (Figure 1), are suspected to play a prominent role as a result of their strong metal binding ability (9-11). Metal complexation to citrate, malate or malonate has also been proposed for fungi (7, 12), and higher plants (13). This overview of the literature indicates that extracellular organic acids and lichen substances may also be responsible for the immobilization of metals in air- and soil-polluted lichens.

The difficulties faced in the determination of speciation of metals in lichens are of several-fold. First, pollution is most often polymetallic and lichen thalli generally contain a variety of metals, thus creating a multi-element system from which individual metal species are barely distinguishable. Second, metals are likely to be fixed to functional groups of biological molecules, and these molecules are not in a crystalline form. Third, the concentration of metals is relatively low, typically several hundreds of mg/Kg, although concentrations as high as several tens of thousands mg/Kg have been reported in case of heavily polluted sites and hyperaccumulating species (14). These three difficulties prohibit the use of long-range order sensitive and metal-site averaging (i.e. diffraction-based) structural techniques. For these reasons, determining the speciation of metals in biological systems remains challenging, and unprecedented in the case of lichens. This type of study is an emerging application of EXAFS (Extended X-Ray Absorption Structure) spectroscopy as a result of its elemental specificity, short-range order sensitivity, and unrivalled detection limit, presently equal to ~100 mg/Kg for most of heavy metals on the third generation synchrotron radiation source of the ESRF. This method was recently used to determine the speciation of nickel in *Alyssum lesbiacum*, an hyperaccumulator higher plant (15). Nickel resistance and transport *via* the xylem sap to the shoot were shown to result from its complexation to the amino acid histidine. Likewise, Salt et al. (16) determined by XANES (X-ray absorption near edge structure) spectroscopy the percentage of Cd bound to organic acids and to phytochelatin in seedlings of *Brassica juncea* grown in Cd solution. In this study, two polluted lichens were investigated: *Diploschistes*

*muscorum*, a metal hyperaccumulator terricolous lichen (1), and *Xanthoria parietina*, a metal tolerant saxicolous lichen.

#### Material and Method

**Materials.** *Diploschistes muscorum* was collected in the vicinity of a (Zn,Pb)S smelter located at Auby in the North of France. *Xanthoria parietina* was sampled on cement poles near a tetraethyl and tetramethyl lead factory located near Nantes, France. Lichen thalli were rinsed with deionized water, freeze-dried and the whole organism was grinded without further treatment. Zn and Pb concentrations were measured by ICP/MS. *D.muscorum* contains 32.5 mg/g Zn and 2.9 mg/g Pb, which compares to soil concentrations of 26 mg/g Zn and 1.4 mg/g Pb. *Xanthoria parietina* contains 0.58 mg/g Pb. *Penicillium chrysogenum* cell walls were prepared by drying, grinding, and washing dead fungi to remove plasmic and cytoplasmic material. Zn and Pb complexation was carried out at pH 6, and the samples were freeze-dried before EXAFS measurements. Rhein (4, 5-dihydroxyanthraquinon-2-carboxylic acid) provided by Aldrich was used as a structural analogous of parietinic acid (4, 5-dihydroxy-7-methoxyanthraquinon-2-carboxylic acid). Pb-rhein complex was formed in ethanol solution, by slow evaporation.

**EXAFS experiments.** Zn K-edge and Pb L<sub>III</sub>-edge EXAFS experiments were conducted on the D32 CRG/IF beamline at ESRF (Grenoble, France) with a beam current of ~180mA. Spectra were recorded at 10K in fluorescence or transmission mode depending on the metal concentration. Fluorescence was detected with a multi-element solid-state detector (Canberra).

#### Results and Discussion

##### Speciation of Zn in *Diploschistes muscorum*

Zn K-edge EXAFS spectrum for *D. muscorum* is presented in Figure 2. Zn speciation was determined by comparing this spectrum to a large database of inorganic and organic Zn compounds. Comparison to mineral references proved unsuccessful, indicating a change of chemical form from the atmospheric fallouts, and soil, to the lichen thallus. The possible complexation of Zn to S-containing intracellular proteins was also eliminated by comparison of lichen with Zn-cysteine spectra (Figure 2). The correctness of this last finding can be readily assessed by noting the unique wave frequency of the Zn-cysteine spectrum compared to the other Zn-organic compounds (Figure 2). This contrast originates from the difference of Zn-S (~2.2 - 2.3 Å) and Zn-O (~1.9 - 2.1 Å) bond lengths, as a result of the difference of S and O ionic radii. Therefore, one is left to propose either the complexation of Zn by fungal cell walls and/or organic acids. The first hypothesis was examined by recording Zn-complexed *Penicillium chrysogenum* cell walls at different Zn concentrations. A representative outcome of this analysis is presented in Figure 2. The quantitative analysis showed that Zn is mostly

complexed to phosphate groups of the *P. chrysogenum* cell walls (not shown), and the comparison with the lichen spectrum unambiguously indicates that this mechanism does not apply to *D. muscorum*.

Lastly, the hypothesis of a complexation by organic acids was examined by comparing the lichen spectrum with those of Zn-oxalate, citrate, malate, and malonate in their different hydration states. Figure 2 shows that a very good spectral match in amplitude and phase is obtained with Zn oxalate dihydrate. The radial structure function (RSF) obtained by Fourier transforming the EXAFS spectrum of *D. muscorum* displays three peaks denoted A, B, and C (Figure 3). They were analyzed by using an *ab initio* curved-wave formalism (17, 18) (Table 1). Peak A corresponds to the first oxygens shell (O1 and H<sub>2</sub>O), and is not diagnostic of a particular class of molecules since it is present in all oxygenated Zn compounds. Peak B corresponds to the four carbons of the chelating oxalate molecule (C1 shell), and peak C to the next-nearest oxygen shell (O2). Peak C has a strikingly high amplitude compared to other organic acids. This results from the high symmetry of the Zn oxalate dihydrate structure, which has 10 next-nearest oxygens at close distances (3.80-3.94 Å, Table 1). Four oxygens belong to the two chelating oxalates (Figure 3) and the 6 others to neighbouring oxalates (not shown in Figure 3). Examination of Table 1 shows that a very good agreement was obtained between EXAFS and crystallographic interatomic distances (*R*) and number of atomic neighbours (*N*) for the two nearest atomic shells (O1, H<sub>2</sub>O and C1). The agreement is slightly poorer for the O2 shell ( $\Delta R \sim 0.05 \text{ \AA}$ ;  $\Delta N = 2$ ) because of the existence of a focusing effect (19) between Zn, C1 and O2 atoms, which are virtually aligned in oxalate dihydrate (Figure 3). EXAFS spectroscopy is particularly sensitive to structural disorder, and the coexistence of various chemical forms for Zn would have resulted in a significant modification of the spectral shape, as well as a decrease in the amplitude of both the EXAFS spectrum and the RSF compared to references. The good agreement between *D. m.* and Zn oxalate dihydrate structural parameters allows us to conclude that at least 90% of Zn is complexed to oxalate dihydrate.

##### Speciation of Pb in *Diploschistes muscorum*

The speciation of Pb in *D. muscorum* was subsequently determined by recording L<sub>III</sub>-edge EXAFS spectrum. The comparison of experimental to reference L<sub>III</sub>-edge spectra led us to rule out the hypothesis of a mineral form for Pb, as well as the complexation with S-containing protein and fungal cell wall macromolecules. Among organic acids, anhydrous Pb oxalate was positively identified (Figure 4a). The presence of a shoulder at 6.3 Å<sup>-1</sup> was found to be particularly diagnostic in this identification. However, this reference did not allow the correct reproduction of the high wave vector (*k*) range, which suggests the presence of another chemical form. The best spectral match was obtained with a linear combination of 80±10 % of anhydrous oxalate plus 20±10 % of monohydrate Pb oxalate. The presence of two Pb species, combined with the high atomic disorder of Pb compounds (20), make quantitative structural

analysis of each species meaningless, and no numerical simulation was conducted for this lichen.

EXAFS analysis shows that both Zn and Pb are complexed to oxalate groups in *D. muscorum*, but in different hydration states: Zn oxalate is dihydrated, whereas Pb oxalate is partly anhydrous and partly dihydrated. These three compounds can be synthesized in the laboratory by simple aqueous precipitation of oxalate and metal salts (21-23). The absence of Pb oxalate trihydrate and anhydrous Zn oxalate can be explained by the fact that their syntheses require particular conditions, such as low pH or high temperature (24, 25). Oxalate concentration was measured in the contaminated and an unpolluted thalli. It is 2.5 times higher in the former (8.2 mmol/g) than in the uncontaminated thallus (3.3 mmol/g). Thus, *D. muscorum* produces oxalate in normal conditions, but its synthesis is enhanced by exposure to metallic pollution. This modification of the metabolism probably accounts for the hyperaccumulation of Zn and Pb, which are ~1.2 to 2-times more concentrated in the thallus than in the soil substrate. In this lichen, the concentration of oxalate is however far in excess of the amount of Zn and Pb (0.502 and 0.014 mmol/g respectively). This finding suggests that this particular lichen could grow on even more polluted sites, or that other cations like Fe, Cu, Cd, Ca... are also complexed to this molecule.

#### *Speciation of Pb in Xanthoria parietina*

Oxalate was also measured in the metal tolerant lichen, *X. parietina*. In contrast to the hyperaccumulator *D. m.*, polluted and blank thalli were found to contain approximately the same amount of oxalate (3.2 and 3.3 mmol/g, respectively), which indicates that oxalate synthesis is no longer enhanced by the exposure to metallic pollution. Consequently, Pb is presumably immobilized by another mechanism in this second lichen. This hypothesis is confirmed by the comparison of Pb L<sub>III</sub>-edge EXAFS spectra for the two lichens as they strongly differ in frequency and amplitude (Figure 4a). *X. parietina* was collected in the vicinity of a lead gasoline plant, and the possibility of the presence of tetramethyl and tetraethyl lead was therefore examined first. Figure 4b clearly shows a change of Pb speciation from the atmospheric fallout to the lichen. The spectral analysis also leads us to reject the presence of a mineral form, as well as the complexation of Pb by S-containing protein and organic acids. *Xanthoria parietina* produces a specific lichen substance called parietinic acid (Figure 1), which is an anthraquinone responsible for its yellow colour. Richardson (26) noted a change in the colour of *X. parietina* following its exposure to metallic pollution, which could be interpreted as the formation of a metal-parietinic acid complex. This hypothesis was tested with the EXAFS spectrum of the Pb-rhein complex (Figure 4b), which is structurally analogous to parietinic acid (Figure 1). Examination of Figure 4b shows that this species is not the predominant form of Pb in *X. parietina*. Finally, a good spectral agreement was obtained with Pb complexed to the cell

walls of *Penicillium chrysogenum* (Figure 4b). In this fungus, Pb is mostly bound to carboxylic groups (not shown).

#### **Comparative mechanisms of resistance**

This study shows that the metal hyperaccumulator *D. m.* and the tolerant *X. p.* have a different mechanism of resistance to metallic pollution. In these two lichens, metals are immobilized outside the plant cells by complexation to organic acids (*D.m*) or fungal cell walls (*X.p.*), and the mycobiont thus plays a critical role in the prevention of toxicity since the complexant molecules are synthesised by it. But the hyperaccumulation of metals is achieved by the active production and excretion of oxalate, which possesses strong metal binding properties. This adapting behaviour parallels the production of histidine in the nickel hyperaccumulator higher plant, *Alyssum lesbiacum* (15). In contrast, the tolerance to Pb is achieved by a passive mechanism. For *X. p.* the maximum amount of fixable metal is intrinsically limited by the total ion exchange capacity of the cell walls. This study exemplifies two different strategies used by organisms in order to grow in adverse conditions. This type of molecular-level information is particularly important in the selection of suitably adapted lichens and higher plants for the biomonitoring (27) and phytoremediation (28-30) of contaminated areas.

#### **Acknowledgments**

The authors wish to acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble for making access to the facility, J-C. Roux for providing the fungal cell wall material, and P. Saglio for oxalate measurement. This work was supported by the French Ministry of Environment (grant number 915-9242).

## Literature cited

- (1) Reeves, R. D.; Baker, A. J. M.; Brooks, R. R. *Mining Environmental Management* **1995**, *3*, 4-8.
- (2) Teo, B. K. *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*; Springer-Verlag: Berlin, 1986.
- (3) Nash, T. H. In *Metal tolerance in plants: Evolutionary aspects*; Shaw, A.J., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 1989.
- (4) Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H. *Science* **1985**, *230*, 674-676.
- (5) Robinson, N. J. In *Metal tolerance in plants: Evolutionary aspects*; Shaw, A.J., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 1989.
- (6) Brown, M. T.; Hall, I. R. In *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects*; Shaw, A.J., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 1990.
- (7) Gadd, G. M. *New Phytologist* **1993**, *124*, 25-60.
- (8) Huneck, S.; Yoshimura, I. *Identification of lichen substances*; Springer Verlag: Berlin, 1996.
- (9) Purvis, O. W.; Elix, J. A.; Broomhead, J. A.; Jones, G. C. *Lichenologist* **1987**, *19*(2), 193-203.
- (10) Purvis, O. W.; Elix, J. A.; Gaul, K. L. *Lichenologist* **1990**, *22*, 345-354.
- (11) Wilson, M. J. *Crypt. Bot.* **1995**, *5*, 299-305.
- (12) Sayer, J. A.; Raggett, S. L.; Gadd, G. M. *Mycol. Res.* **1995**, *99*, 987-993.
- (13) Streit, B.; Stumm, W. In *Plants as Biomonitors*; Markert, B., Ed.; VCH: Weinheim, 1993.
- (14) Lambinon, J.; Maquinay, A.; Ramaut, J. L. *Bull. Jard. Bot. Etat Brux.* **1964**, *34*, 273.
- (15) Kramer, U.; Cotter-Howells, J. D.; Charnock, J. M.; Baker, A. J. M.; Andrew, C.; Smith, J. *Nature* **1996**, *379*, 635-638.
- (16) Salt, D. E.; Pickering, I. J.; Prince, R. C.; Gleba, D.; Dushenkov, S.; Smith, R. D.; Raskin, I. *Environ. Science Technol.* **1997**, *31*, 1636-1644.
- (17) Rehr, J. J.; Mustre de Leon, J.; Zabinsky, S. I.; Albers, R. C. *J. American Chemical Society* **1991**, *113*, 5135-5145.
- (18) Zabinsky, S. I.; Rehr, J. J.; Ankudinov, R. C.; Albers, R. C.; Eller, M. J. *Phys. Rev. B* **1995**, *52*, 2995.
- (19) Dittmer, J.; Dau, H. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1993**, *12*, 1993-1988.
- (20) Manceau, A.; Boisset, M. C.; Sarret, G.; Hazemann, J. L.; Mench, M.; Cambier, P.; Prost, R. *Environ Sci. Technol.* **1995**, *30*, 1540-1552.
- (21) Boldyrev, V. V. *The influence of Defects on the Thermal Decomposition of Solids*; Tomsk. State Univ. Press: 1963.
- (22) Deyrieux, R.; Berro, C.; Peneloux, A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1973**, 25-34.
- (23) Virovets, A.; Naumov, D.; Boldyreva, E.; Podberezkaya, N. *Acta Crys.* **1993**, *C49*, 1882-1884.
- (24) Kondrashev, Y. D.; Bogdanov, V. S.; Gobulev, S. N.; Pron, G. F. *Zhurnal Strukturnoi Khimii* **1985**, *26*, 90-93.
- (25) Huang, S. H.; Wang, R.-J.; Mak, T. C. W. *J. Crystallographic and Spectroscopic Research* **1990**, *20*, 99-104.
- (26) Richardson, D. H. S. *Pollution monitoring with lichens*; Richmond Publishing: Slough, England, 1992.
- (27) Lange, C. R.; Lambert, K. E. *Water environment research* **1995**, *67*, 738-749.
- (28) Watanabe, M. E. *Environ. Science Technol.* **1997**, *31*, 182A-186A.
- (29) Salt, D. E.; Blaylock, M.; Kumar, P.; Dushenkov, V.; Ensley, B. D.; Chet, I.; Raskin, I. *Biotechnology* **1995**, *13*, 468-474.
- (30) Kumar, P. B. A. N.; Dushenkov, V.; Motto, H.; Raskin, I. *Environ Sci. Technol.* **1995**, *29*, 1232-1238.
- (31) Kroll, H., *et al.* *Z. Krist.* **1992**, *199*, 49-66.
- (32) Albertsson, J.; Abrahams, S. C. *Acta Crys.* **1989**, *B45*, 34-40.

TABLE 1. Structural parameters for Zn

Compound and method	First shell: Zn-(O1, H <sub>2</sub> O)			Second shell: Zn-C1			Third shell: Zn-O2			
	R (Å)	N	$\Delta\sigma$ (Å)	R (Å)	N	$\Delta\sigma$ (Å)	R (Å)	N	$\Delta\sigma$ (Å)	wR (Å)
ZnO (XRD)	1.974-1.989	4	-	1.978	-	-	-	-	-	-
Zn oxalate dihydrate (DVLS)	2.08-2.13	6	-	2.11	4	-	2.83	10	-	3.90
Zn oxalate dihydrate (EXAFS)	2.06	3	0.00	2.12	4	0.00	2.82	5	0.01	3.85
Diploschistes muscorum (EXAFS)	2.18	3	0.02	2.12	4	0.01	2.82	3	0.00	-
	2.06	3	0.00	2.12	4	0.01	2.82	8	0.01	3.84
	2.18	3	0.03							

Interatomic distances R, number of neighbours N, and Debye-Waller factor  $\Delta\sigma$  were determined by least-squares fitting of EXAFS spectra.  $\Delta\sigma$  is the difference of atomic disorder between the unknown sample and the first oxygen shell in the ZnO reference (32). Amplitude and phase functions for Zn-O and Zn-C atomic pairs were calculated ab initio using FEFF7 (17) from the structural model optimized by DVLS (31) (Figure 2). The precision on R is 0.02 Å for the two first shells, and 0.05 Å for the third one due to multiple scattering effects. The precision on N is 20%. wR are weighted distances.

## Figure Caption

FIGURE 1. Possible locations and uptake mechanisms of metals in the lichen thallus. 1: Metal-rich particulate entrapment on the lichen surface and in intercellular spaces of fungal filaments. 2: Intracellular complexation to metallothioneins. 3: Extracellular complexation to functional groups of fungal macromolecules from the cell walls. 4: Extracellular complexation to organic acids like oxalate, or lichen substances like parietinic acid in *Xanthoria parietina*.

FIGURE 2. Zn K-edge EXAFS spectra for *Diploschistes muscorum* and reference compounds. Structural model for Zn oxalate dihydrate has been calculated by distance-valence least squares (DVLS) modelling (31) from the known and isomorphous structure of Fe(II) oxalate dihydrate. The four carboxylic groups and Zn are coplanar, and water molecules are located on either sides of the oxalates plane. The shoulder on EXAFS spectrum at  $6.5 \text{ \AA}^{-1}$  (arrow) results from the interference of nearest O and C atoms of the carboxylic functional groups, and is typically well marked in the oxalate structure owing to the symmetric arrangement of the four COOH groups around Zn.

FIGURE 3. Zn K-edge radial structure functions (RSFs) obtained by Fourier transforming EXAFS spectra for *Diploschistes muscorum*. Solid lines are experimental data and dotted lines theoretical spectra. R represents the apparent distance to the central atom, uncorrected for phase shift. Peak A corresponds to the single scattering (SS) contribution of nearest oxygens (Zn→O1→Zn). Peak B originates from Zn→C1→Zn paths between Zn and the nearest C shell of the carboxylic groups at 2.84 Å (Table 1). Peak C has a more complex origin, and arises from the SS contribution of the second O shell at 3.80-3.94 Å, and from Zn→C1→O2→Zn third-order, and Zn→C1→O2→C1→Zn fourth-order direct and inverse multiple scattering (MS) paths. These multiple paths are intense in the oxalate dihydrate structure owing to the colinearity of Zn, C1 and O2 atoms (19).

FIGURE 4. Pb L<sub>III</sub>-edge EXAFS spectra for *Diploschistes muscorum* (a), *Xanthoria parietina* (b) and reference compounds. Rhein differs from parietinic acid by the absence of -O-CH<sub>3</sub> group. This group does not bind metals and these two structures can be considered as analogous. A possible structure of the Pb-rhein complex is shown.

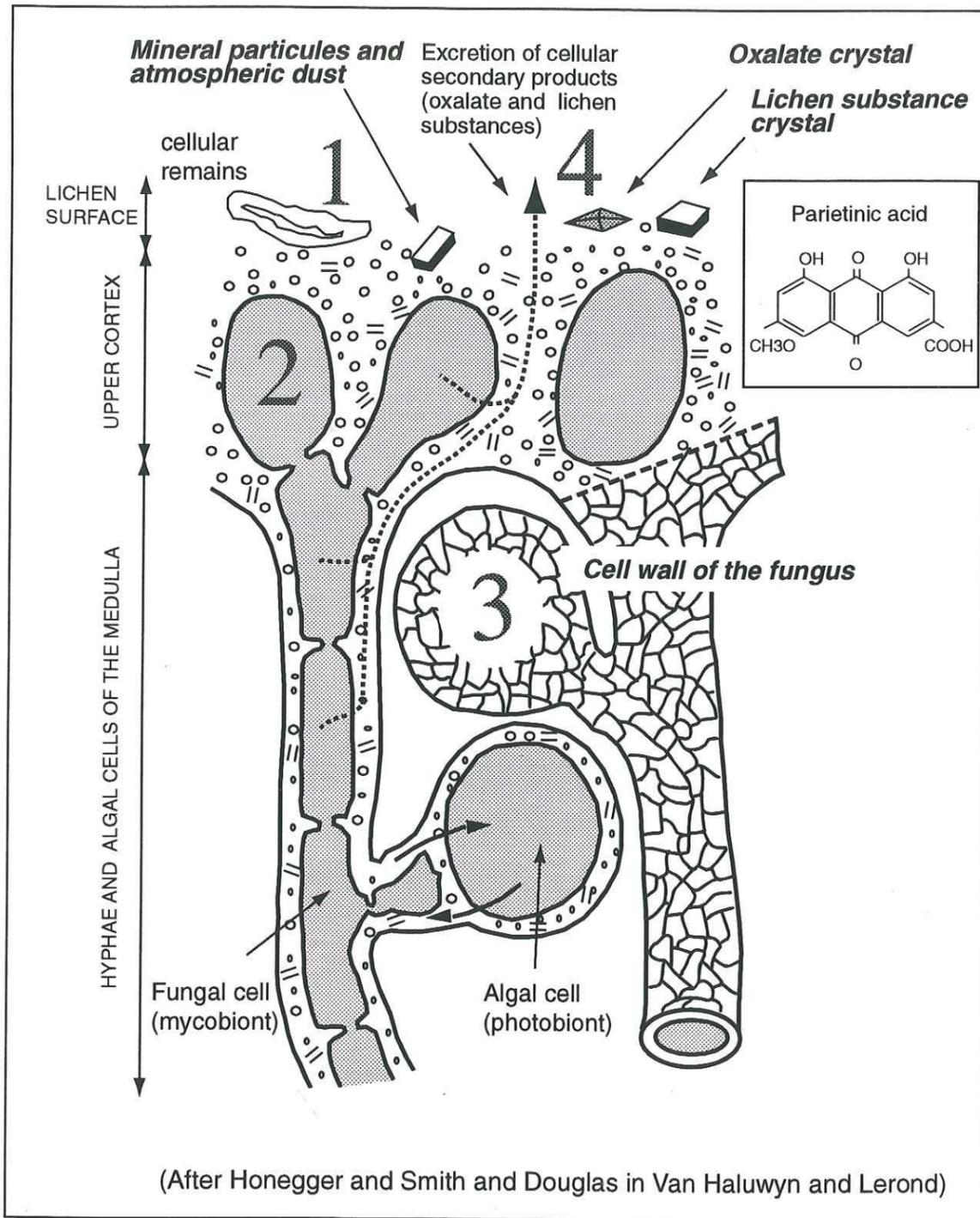


Figure 1

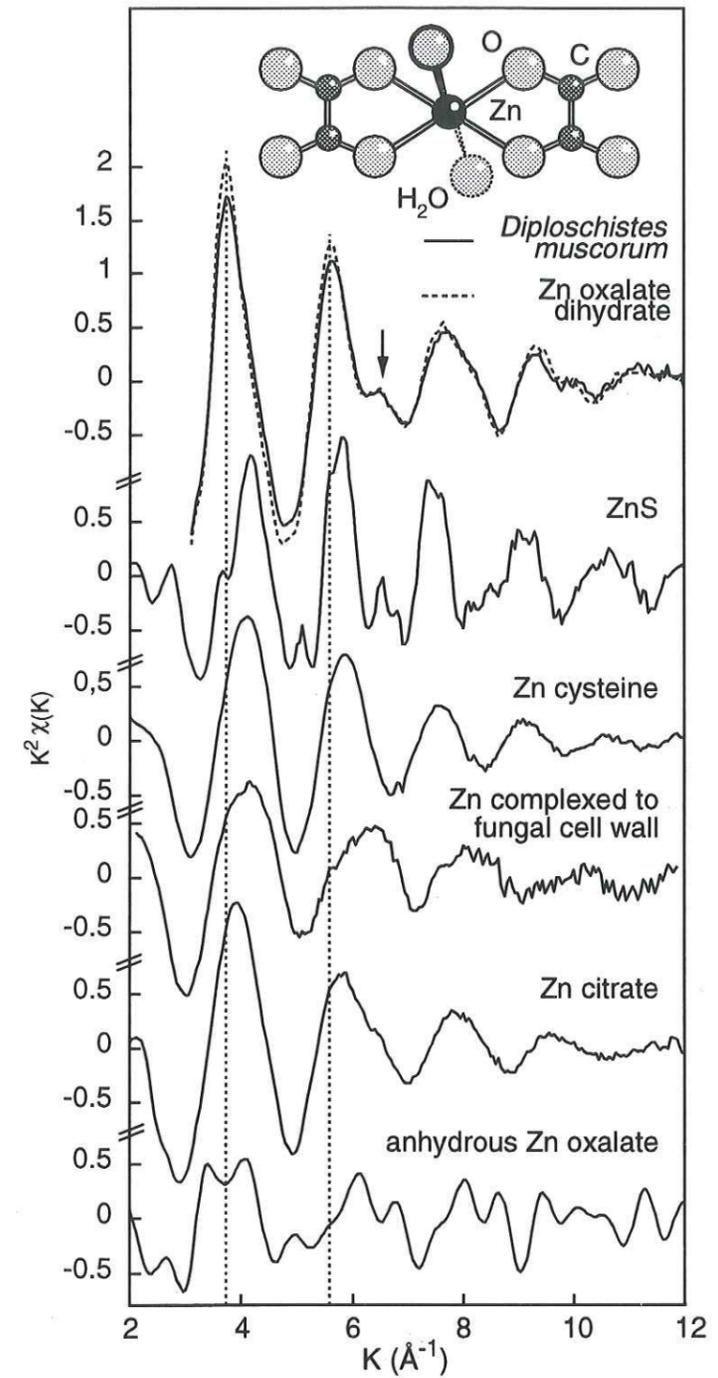


Figure 2

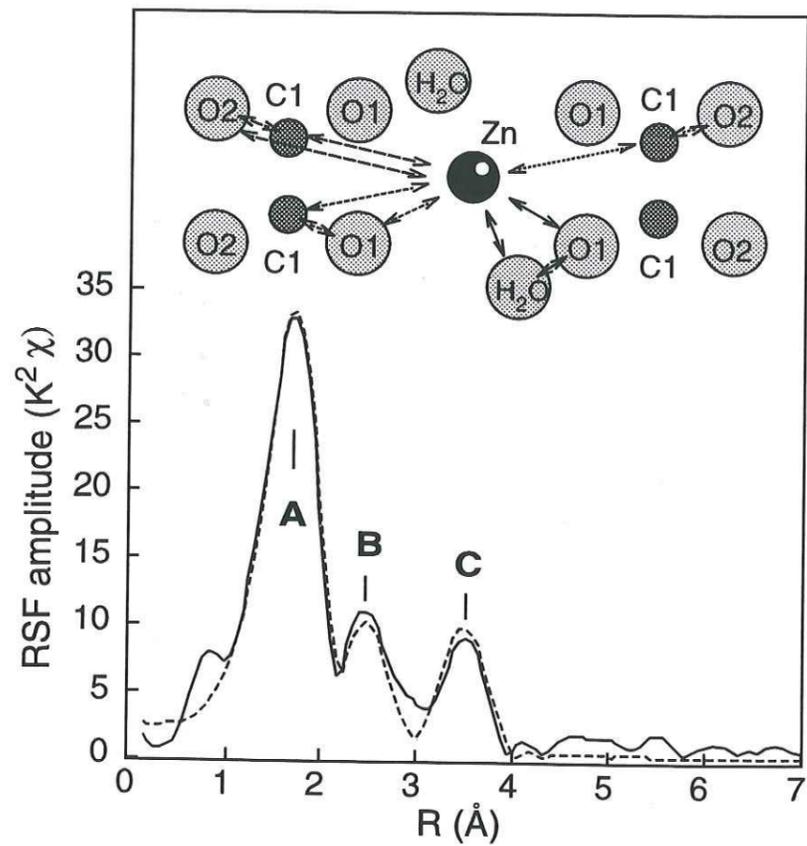


Figure 3

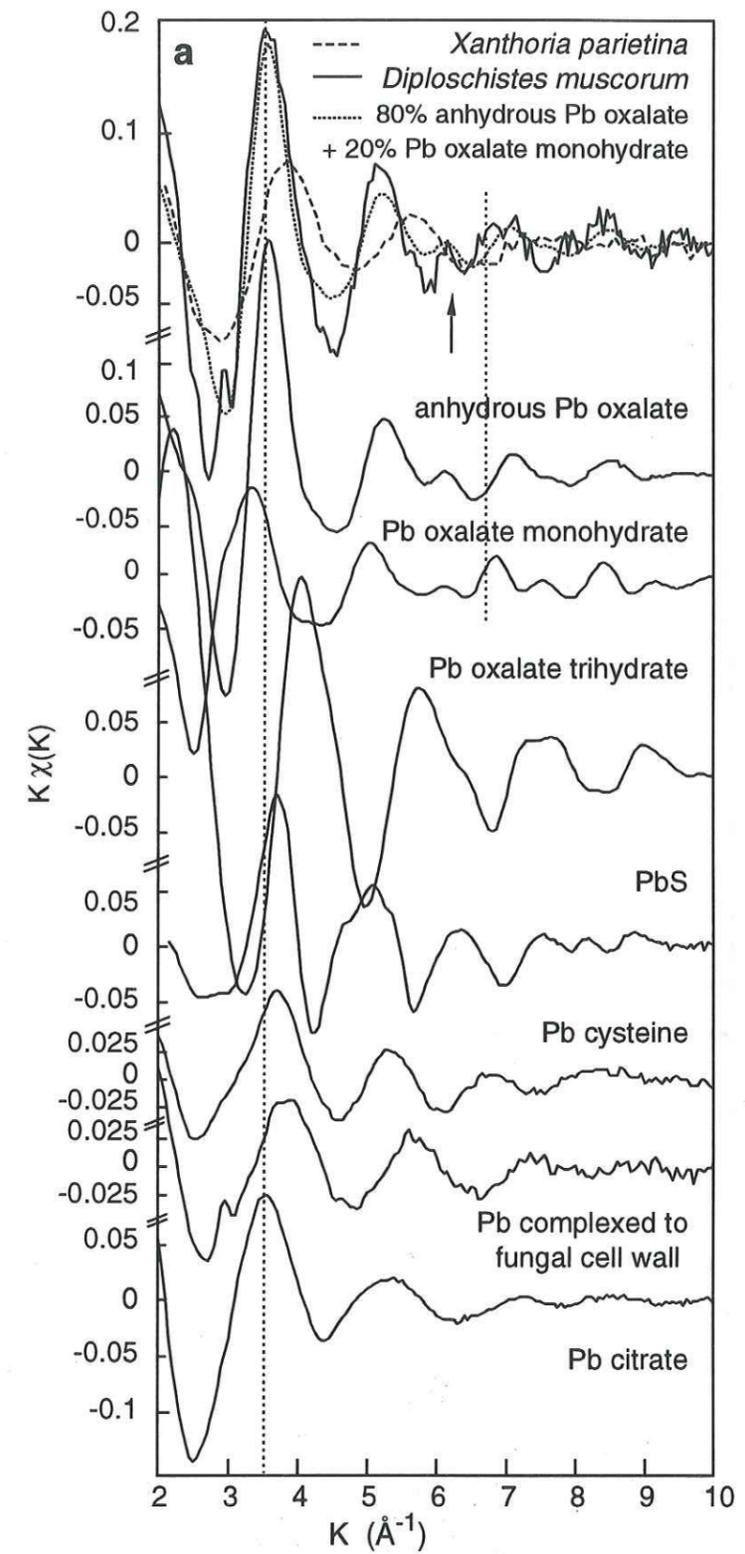


Figure 4

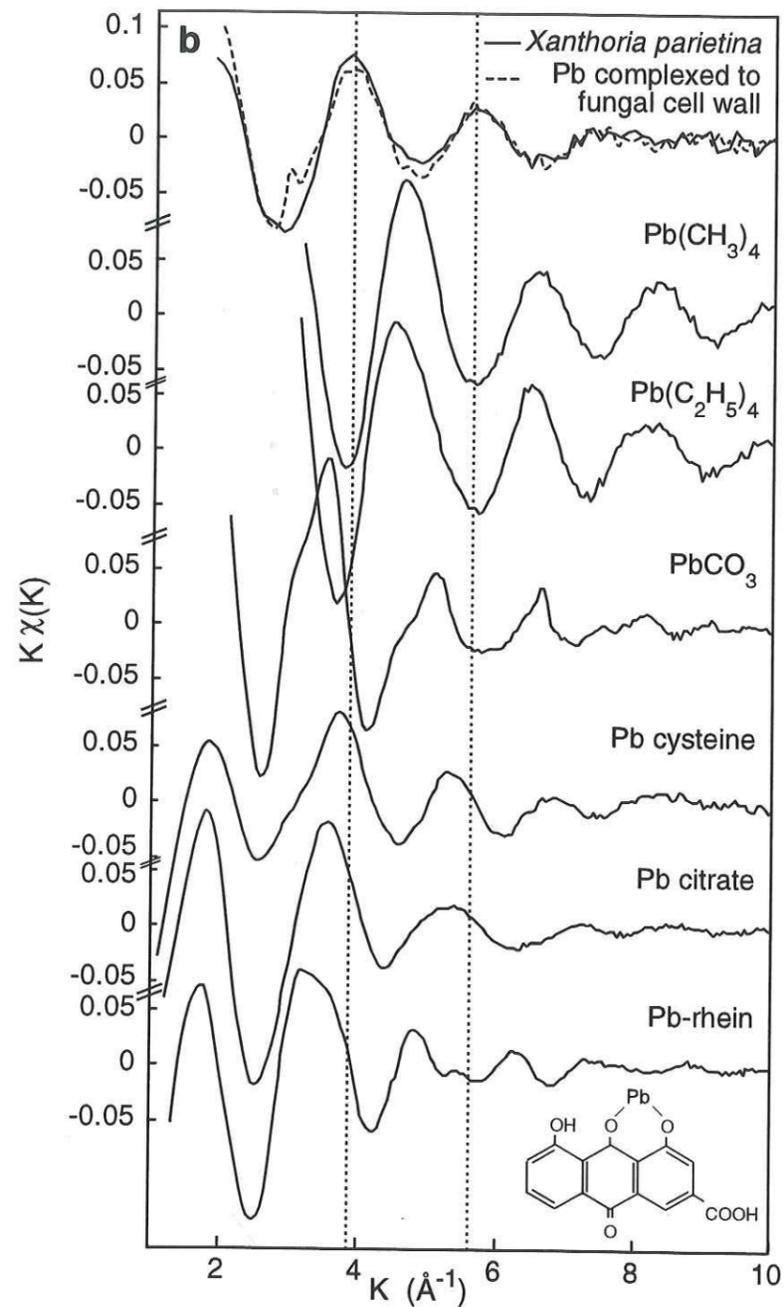


Figure 4

V.3.4.2.2. Spéciation du zinc dans *Cladonia subulata*

Nous venons de voir que l'hyperaccumulation du plomb et du zinc dans *Diploschistes muscorum* était réalisée par une production accrue d'oxalate, qui précipite avec le plomb et le zinc sous forme de sel. La figure V-4 compare les concentrations en oxalate dans les trois lichens étudiés et leur témoin non pollué. L'exposition à une pollution métallique n'entraîne pas de modification du métabolisme de l'oxalate pour *Cladonia subulata* et *Xanthoria parietina*, bien qu'ils contiennent une quantité importante d'oxalate en conditions normales. La somme des concentrations molaires des cations susceptibles d'être complexés par l'oxalate (Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Zn) est respectivement de 0.16, 1.08 et 0.79 mmol/g dans *C. s.*, *D. m.*, et *X. p.*, comparée à des teneurs en oxalate de 2.9, 8.2 et 3.3 mmol/g. Ainsi, pour les trois espèces, et pas seulement pour *D. m.*, l'oxalate est en large excès par rapport aux cations cités. Il pourrait donc fixer l'ensemble des éléments dans les trois lichens. Néanmoins, nous avons vu que le plomb n'était pas complexé par l'oxalate dans *Xanthoria parietina*. Qu'en est-il pour *Cladonia subulata* ?

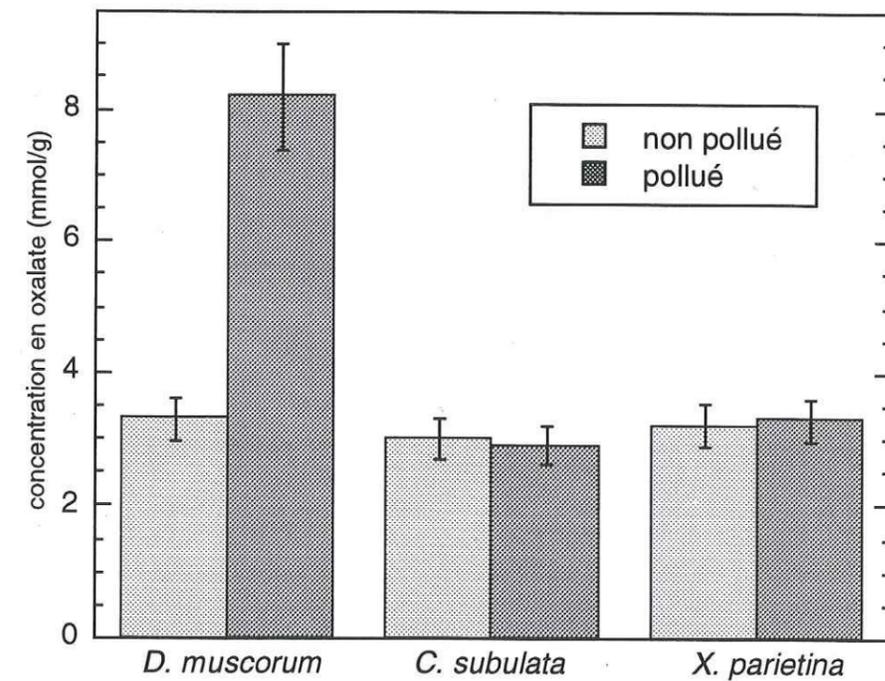


Figure V-4: Concentration en oxalate dans les lichens

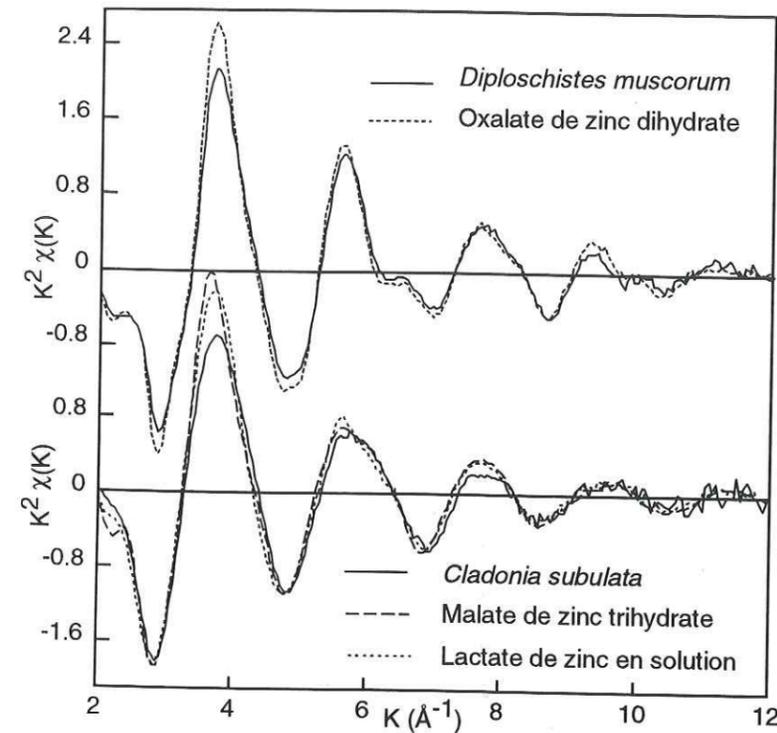


Figure V-5: Comparaison des spectres EXAFS au seuil K du zinc des lichens d'Auby

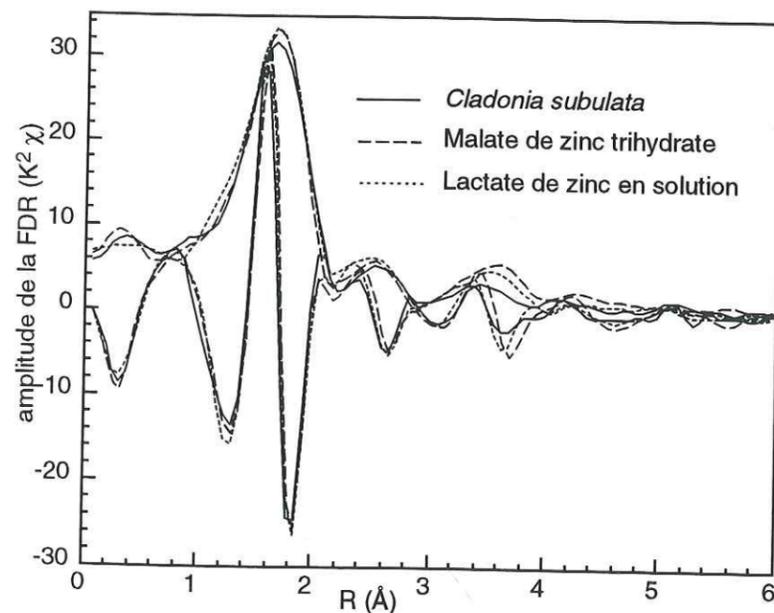
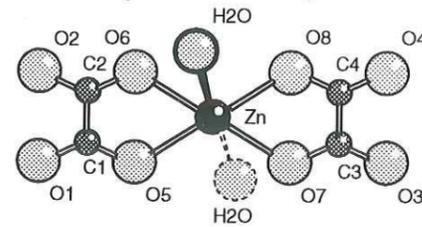
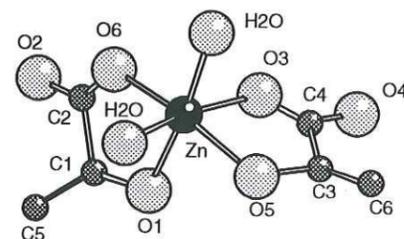


Figure V-6: Fonctions de distribution radiale (module et partie imaginaire) de Cladonia subulata et de composés de référence

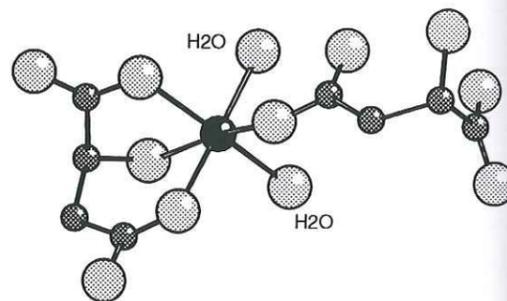
Oxalate de zinc dihydrate



Lactate de zinc trihydrate



Malate de zinc trihydrate



Acide fumarprotocétrarique

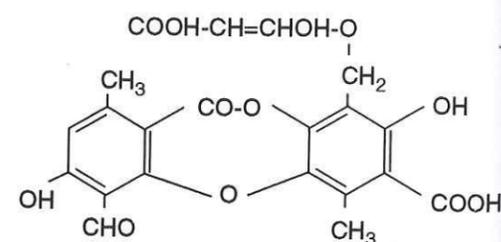


Figure V-7: Structure de quelques composés du zinc et de l'acide fumarprotocétrarique

La comparaison des spectres EXAFS de *D. muscorum* et *C. subulata* montre que le zinc n'est manifestement pas présent sous forme d'oxalate de zinc dihydrate dans *C. subulata* (Fig. V-5). Pour déterminer la forme chimique de cet élément, nous avons adopté la démarche par comparaison de spectres utilisée précédemment pour l'étude de *D. muscorum*. Cela nous a permis de montrer que (1) le zinc n'est pas présent sous forme minérale, (2) il n'est pas complexé par une protéine contenant du soufre, (3) il n'est pas complexé à la paroi cellulaire des champignons. Les hypothèses restantes sont la complexation par des acides organiques autres que l'oxalate, ou par des substances lichéniques. Les autres acides organiques généralement cités comme complexants possibles des métaux sont l'acide citrique, malique et malonique [12]. Tous ces ligands ont des constantes de complexation du zinc et du plomb comparables, l'oxalate et le citrate étant les deux plus forts complexants (Tableau V-5). La comparaison avec les spectres EXAFS des complexes nous a permis de rejeter les acides citrique et malonique. Par contre, un accord d'égale qualité a été obtenu avec les spectres du lactate de zinc et du malate de zinc (Fig. V-5, 6). Le tableau V-5 montre que le lactate n'est pas un très bon complexant du zinc. La complexation du zinc par cet acide dans *C. subulata* paraît donc peu probable. Par ailleurs, le dosage du lactate dans le lichen par enzymologie a montré que sa concentration était négligeable, cet hydroxyacide n'est donc pas le complexant du zinc dans *C. subulata*. Le malate a été dosé par électrophorèse capillaire car il n'existe pas à notre connaissance de test enzymatique pour cet acide. La figure V-8 montre que ce métabolite est effectivement présent dans *C. subulata*. Cependant, la quantité mesurée est insuffisante pour expliquer la complexation de la totalité du zinc: on trouve 2.3  $\mu\text{mol/g}$  de malate pour 8.9  $\mu\text{mol/g}$  de zinc. Nous pensons que le malate n'a pas été extrait en totalité lors de la mise en solution dans l'acétone (voir V.3.2.2). Cette présomption est corroborée par le fait que la concentration en oxalate mesurée par électrophorèse capillaire est très inférieure à celle mesurée par enzymologie. Pour vérifier cette hypothèse, il est prévu de tester un nouveau protocole pour le dosage de cet acide.

Tableau V-5: constantes de complexation de quelques acides organiques

complexant	log K*		log K*	
	ZnL	ZnL <sub>2</sub>	PbL	PbL <sub>2</sub>
oxalate	4.87	7.65	4.91	6.76
malate	3.32	-	-	-
malonate	3.84	-	-	-
citrate	6.10	6.70	4.34	6.08
lactate	2.22	3.75	2.78	3.3
acétate	1.57	1.90	2.4	3.4

\* réactions considérées: Me + L → MeL et Me + 2L → MeL<sub>2</sub>. Sources: Giordano, Smith et Martell [163-165]

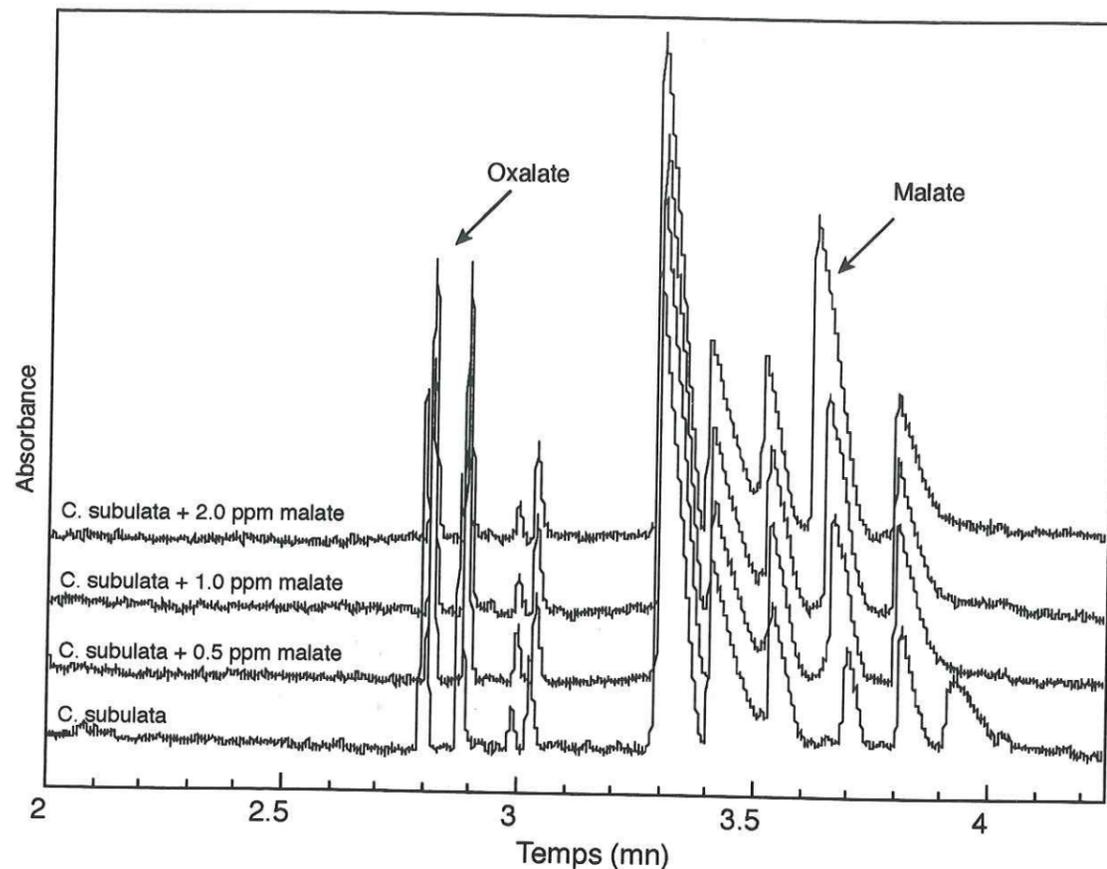


Figure V-8: Electrophorogramme du lichen *Cladonia subulata* en solution dans l'acétone

La figure V-5 montre que les spectres EXAFS du lactate et du malate de zinc sont semblables. Cette similitude suggère que les distributions atomiques radiales des deux composés sont proches, bien que les ligands du zinc soient de nature différente (Fig. V-7). Cela est confirmé par les simulations numériques: dans les deux composés, l'environnement du zinc s'organise en trois couches de coordination, à 2.11 Å, 2.9 Å et 3.9 Å environ (Tableau V-6). L'oxalate de zinc dihydrate présente aussi un arrangement en trois couches, mais sa structure est plus ordonnée que celle des deux autres composés (cf. II.2.2.2.1, Fig. V-7). On peut s'interroger sur la cause de la similitude de l'arrangement atomique dans ces trois composés. La figure V-7 montre que ceux-ci possèdent deux points communs: (1) ils sont hydratés, et (2) les acides organiques sont liés au zinc par plusieurs groupements (2 carboxyles pour l'oxalate, 1 carboxyle + 1 hydroxyle pour le lactate, 2 carboxyles + 1 hydroxyle pour le malate). Ce sont donc des ligands de type chélatants (notons qu'une des molécules de malate est non chélatante). En conséquence, (1) la première couche de coordination est octaédrique (cf. II.2.1), et (2) la deuxième couche est constituée par les quatre atomes de carbone de chaque groupement complexant. Ces atomes sont tous à une distance Zn-C comparable (environ 2.9 Å), cette deuxième couche est donc bien individualisée. Dans le cas de ligands non chélatants, la

deuxième couche ne se situe pas forcément vers 2.9 Å, et la distribution radiale est souvent plus dispersée, comme dans l'acétate de zinc dihydrate (cf. Fig. II-5). Cette comparaison permet de conclure que la présence de deux couches de coordination à 2.11 et 2.9 Å environ est caractéristique de complexes hydratés dont les ligands sont de type chélatants. Notons qu'il est plus difficile de comparer la troisième couche de coordination, car dans le cas du malate, sa composition est plus complexe.

La principale substance lichénique produite par *Cladonia subulata* est l'acide fumarprotocétrarique (Fig. V-7). Cette molécule possède une fonction de type salicylate et une fonction carboxylique aliphatique terminale. On peut donc penser que la structure locale du zinc complexé à l'acide fumarprotocétrarique serait comparable à celle dans le salicylate de zinc dihydrate (cf. II. 2. 2. 2. 4), ou dans l'acétate de zinc dihydrate. La comparaison du spectre EXAFS du lichen avec ceux de ces deux composés modèles permet de rejeter l'éventualité de la complexation du zinc par l'acide fumarprotocétrarique.

On conclut que pour ce lichen, le zinc est lié à un ligand de type chélatant, dont on a de bonnes raisons de penser qu'il s'agit du malate.

## V.4. CONCLUSION

L'hyperaccumulation du plomb et du zinc dans le lichen *Diploschistes muscorum* provient d'une surproduction d'oxalate par l'organisme. L'acide oxalique est synthétisé par de nombreuses espèces de lichens en conditions normales, ses fonctions connues sont: (1) l'altération du substrat rocheux qui permet une meilleure incrustation du lichen, (2) la nutrition minérale par mobilisation des éléments K, P, Fe [167]. Chez les champignons non lichénisés, l'oxalate joue aussi un rôle dans la mobilisation des éléments Fe, Al, Ca, PO<sub>4</sub> [168], SO<sub>4</sub> présents dans le sol. Il peut aussi jouer le rôle (3) d'anti-pathogène par acidification des tissus de l'hôte et séquestration du calcium présent dans ses parois, (4) de catalyseur pour la dégradation de la lignine, et (5) d'agent de détoxification du cuivre par complexation [42]. Notre étude démontre pour la première fois le rôle de l'acide oxalique comme agent de prévention contre la toxicité des métaux chez un lichen. L'hyperaccumulation du plomb et du zinc chez *Diploschistes muscorum* est principalement dû à un processus adaptatif impliquant l'activation d'une voie métabolique. Il s'agit donc d'un mécanisme physiologique inductif, de même nature que ceux qui ont été observés chez des plantes supérieures hyperaccumulatrices [156, 157]. Bien que soumis à la même pollution, le lichen *Cladonia subulata* n'hyperaccumule pas les éléments métalliques: son taux d'accumulation du zinc est de 0.02 contre 1.2 pour *Diploschistes muscorum*. Dans ce lichen, le zinc n'est pas immobilisé par l'oxalate, mais probablement par le malate, qui est un moins fort complexant que l'oxalate (Tableau V-5). Ce facteur, ajouté au fait que la morphologie de *D. muscorum* favorise le contact avec les métaux, peut expliquer les écarts de taux d'accumulation observés entre les deux lichens. A l'opposé des deux mécanismes précédents, dans *Xanthoria parietina* la tolérance s'effectue par adsorption du plomb sur la paroi fongique, il s'agit donc d'un mécanisme passif, qui ne permet pas l'hyperaccumulation.

Cette étude a permis de préciser les mécanismes moléculaires qui sont à l'origine de l'hyperaccumulation ou de la tolérance des métaux dans des lichens contaminés. Elle montre en outre le potentiel de la spectroscopie d'absorption X pour l'étude de la forme chimique des métaux dans les plantes. Ce domaine est d'ailleurs actuellement en pleine expansion, grâce en particulier aux avancées technologiques des centres de rayonnement synchrotron, qui délivrent un flux de photons X toujours plus élevé. Ce travail montre également la nécessité de compléter les résultats de la spectroscopie d'absorption X par une investigation macroscopique, comme le dosage des molécules organiques identifiées par EXAFS.

Tableau V-6: Paramètres structuraux déterminés pour le lichen *Cladonia subulata*, et pour le malate et le lactate de zinc

	Cladonia subulata				Malate de zinc trihydrate				Lactate de zinc en sol. aq.						
	R (Å)	N	$\Delta\sigma$ (Å)	$\langle R \rangle$ (Å)	Q (R <sup>2</sup> )	R (Å)	N	$\Delta\sigma$ (Å)	$\langle R \rangle$ (Å)	Q (R <sup>2</sup> )	R (Å)	N	$\Delta\sigma$ (Å)	$\langle R \rangle$ (Å)	Q (R <sup>2</sup> )
1 <sup>re</sup> couche: Zn-(O, H <sub>2</sub> O)	2.02	2	0.00	2.11	0.002	2.05	2	0.00	2.12	0.004	2.05	3	0.00	2.12	0.004
	2.12	4	0.02			2.12	4	0.01			2.19	3	0.01		
2 <sup>me</sup> couche: Zn-C	2.90	2	0.01	2.90	0.02	2.92	4	0.03	2.92	0.02	2.88	3	0.02	2.88	0.03
3 <sup>me</sup> couche: Zn-O <sup>1</sup>	3.89	3	0.02	3.89	0.02	3.92	7	0.03	3.92	0.01	3.89	3	0.02	3.89	0.03

Les fonctions d'amplitude et de déphasage ont été calculées par FEFF d'après les structures du lactate de zinc trihydrate [45] et du malate de zinc trihydrate [166].  $\Delta\sigma$  est calculé par rapport à la première couche d'oxygène de la structure ZnO,  $\langle R \rangle$  représente R moyen. 1<sup>re</sup> couche contient des atomes de carbone en plus des atomes d'oxygène, mais elle a été simulée simplement par une couche d'oxygène du fait du désordre structural important à cette distance.

**CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons étudié les interactions de deux éléments métalliques, le zinc et le plomb, avec trois systèmes organiques naturels de complexité bien différente que sont des acides humiques extraits de sols, des parois cellulaires de champignons filamenteux et des lichens. La principale méthode d'investigation utilisée a été la spectroscopie d'absorption X. Cette méthode structurale permet d'étudier *in situ* et de façon non destructive la forme chimique des éléments traces formant des composés cristallisés ou non, dans des systèmes multiéléments. Les principaux résultats acquis au cours de cette étude peuvent être synthétisés comme suit.

- *Acides humiques.* Ces polymères naturels polyfonctionnels constituent une des composantes stables de la matière organique des sols, et jouent de ce fait un rôle primordial dans le cycle biogéochimique des éléments traces. Pour le zinc et le plomb, nous avons montré que les AH possèdent des sites d'affinités différentes en fonction de la concentration en métal. Dans le cas du zinc, les sites de haute affinité (observés pour  $[Zn] < 10^{-3}$  mmol/g) ont une géométrie tétraédrique ou octaédrique selon la nature de l'AH, les ligands sont majoritairement des groupements carboxyles monodentates, et probablement des molécules d'eau dans le cas de la coordinence octaédrique. Les sites de moyenne affinité (majoritaires pour  $[Zn] \approx 5 \cdot 10^{-1}$  mmol/g) sont octaédriques, la proportion de ligands  $H_2O$  par rapport aux ligands carboxyles est probablement plus importante dans ces sites que dans ceux de haute affinité. Les sites de faible affinité (majoritaires pour  $[Zn] \approx 8$  mmol/g) correspondant à des complexes de sphère externe, dans lesquels le zinc est solvato par 6 molécules d'eau, et lié par des liaisons faibles aux groupements fonctionnels de l'AH. Dans le cas du plomb, les sites sont constitués de groupements carboxyles et de molécules d'eau, et varient en fonction de la concentration en métal. Aux concentrations étudiées ( $[Pb] < 9.6 \cdot 10^{-1}$  mmol/g), nous n'avons pas observé de complexes de sphère externe.

- *Parois cellulaires de champignons filamenteux.* Ces sous-produits industriels sont très riches en groupes fonctionnels, et ils peuvent de ce fait être valorisés comme biosorbants pour le traitement d'eaux chargées en éléments métalliques. Nous avons étudié les mécanismes de complexation du plomb et du zinc sur les parois cellulaires de *Penicillium chrysogenum* en couplant l'approche macroscopique par chimie de solution, et l'approche microscopique par spectroscopie d'absorption X. Pour chacun des deux métaux, deux sites de complexation ont été mis en évidence: (1) des groupements phosphate représentant environ 90% des sites de complexation qui constituent les sites de plus haute affinité pour le zinc, et (2) des groupements carboxyle représentant environ 10% des sites de complexation, qui constituent les sites de plus haute affinité pour le plomb.

- *Lichens.* Certaines espèces de lichens sont résistantes à la pollution métallique et accumulent des quantités plus ou moins grandes de métaux lourds. Ces espèces présentent un

intérêt comme bioindicateurs de pollution. Nous avons étudié la forme chimique du plomb et du zinc dans différents lichens contaminés dans le but de préciser les mécanismes de résistance et de bioaccumulation. *Diploschistes muscorum* est une espèce hyperaccumulatrice, l'immobilisation du zinc et du plomb dans le thalle est réalisée par une surproduction d'oxalate, ce qui permet de précipiter les métaux à l'extérieur des cellules sous forme de sel. La résistance à la toxicité provient donc de l'activation d'une voie métabolique, induite par la présence de métaux. Pour une même exposition à la pollution, *Cladonia subulata* présente des taux d'accumulation très inférieurs à ceux de *D. muscorum*. Dans ce lichen, le zinc est complexé par un acide organique différent de l'oxalate, probablement le malate, moins fort complexant que l'oxalate. L'écart d'affinité de ces métabolites, en plus des différences morphologiques observées entre les deux thalles, peuvent expliquer le contraste d'accumulation entre ces deux lichens. Dans le troisième lichen étudié, *Xanthoria parietina*, le plomb est piégé de façon passive, par complexation sur les macromolécules de la paroi cellulaire des filaments fongiques. Le taux d'accumulation est donc intrinsèquement limité par le nombre de sites de la paroi. La comparaison de ces trois lichens montre que l'hyperaccumulation des métaux est réalisée par un mécanisme adaptatif au niveau physiologique, les espèces tolérantes (c'est-à-dire non hyperaccumulatrices), quant à elles, ne développant pas un tel mécanisme.

Ce travail a permis d'évaluer pour la première fois le potentiel de la spectroscopie d'absorption X pour l'étude de la forme chimique des éléments traces dans les systèmes organiques naturels. Des informations structurales très précises ont été obtenues dans le cas du zinc, mais la méthode s'est révélée moins performante dans le cas du plomb, du fait des propriétés stéréochimiques particulières de cet élément et en particulier le très fort désordre structural. Ce travail a montré l'intérêt d'utiliser des *composés modèles*, qui sont des complexes simples et de structure connue, pour aborder des systèmes complexes comme les composés organiques. Ce travail a montré l'intérêt de compléter l'approche par spectroscopie EXAFS par d'autres méthodes, ce qui permet une compréhension plus complète des systèmes étudiés, et la validation des résultats obtenus par spectroscopie d'absorption X. En parallèle de la spectroscopie d'absorption X, nous avons utilisé notamment la RMN, le calcul des valences de liaison, la chimie de solution et le dosage d'espèces chimiques identifiées par EXAFS.

## PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons fait le pari d'étudier des systèmes organiques naturels complexes par une méthode structurale classiquement appliquée aux composés inorganiques. Cette approche originale s'est révélée tout à fait fructueuse, et elle ouvre des perspectives particulièrement intéressantes pour chacun des systèmes étudiés.

- *Acides humiques*. Pour approfondir la compréhension des mécanismes de complexation des métaux par les acides humiques, il sera nécessaire d'étudier des complexes à concentration encore plus faible en zinc, ce qui permettra de tester l'hypothèse selon laquelle les sites de haute affinité pour ce métal sont tétraédriques pour l'ensemble des AH. Bien que les ligands soufrés des AH soient généralement considérés comme des groupements fortement complexants, on a montré que les ligands principaux des AH étaient des groupements carboxyles. Afin d'étudier spécifiquement ces ligands soufrés, on pourrait bloquer chimiquement les groupements carboxyles par méthylation [169], ou encore étudier l'environnement d'un métal ayant une affinité fortement marquée pour le soufre, comme le mercure. A titre de comparaison, les produits de solubilité ( $pK_{sp}$ ) du cinnabre HgS, de la galène PbS, et de la sphalérite ZnS sont de 52, 28 et 24 respectivement.

- *Biosorption*. Dans le prolongement de l'étude des mécanismes de biosorption des métaux sur les parois cellulaires de champignons, notre équipe participe à un programme régional de recherche sur la bioremédiation des sols contaminés [170] regroupant 6 équipes. Ce programme porte sur l'application des biotechnologies au traitement *ex situ* des sols pollués par des métaux et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les techniques de biolixiviation / biosorption des métaux, d'immobilisation du chrome par réduction bactérienne, de dégradation bactérienne des HAP, et de phytoremédiation seront étudiées à la fois au niveau de leurs mécanismes réactionnels et des procédés envisageables pour leur mise en oeuvre. Notre équipe est responsable de l'étude des mécanismes de biosorption du zinc et du plomb sur du matériel bactérien mort ou vivant, et de bioréduction des ions chromates en ions chromiques par des bactéries vivantes. Ces deux systèmes seront étudiés au niveau macroscopique par des expériences de biosorption et de bioréduction en batch et en colonne, et au niveau microscopique par spectroscopie d'absorption X.

- *Lichens*. L'étude par spectroscopie d'absorption X des mécanismes de bioaccumulation et de résistance aux métaux dans les lichens a montré le potentiel de cette méthode pour l'étude des végétaux. Actuellement, la recherche sur les plantes supérieures hyperaccumulatrices en vue de leur utilisation pour la phytoremédiation des sites contaminés est un domaine en plein essor. Des études botaniques et des essais de culture sur sols pollués ont déjà permis de sélectionner des écotypes candidats à la phytoremédiation. Par exemple, la photo 1 montre une pelouse calaminaire du nord de la France, naturellement colonisée par les espèces métallophytes *Cardaminopsis halleri* et *Arméria maritima*. La photo 2 montre que la première se développe

spécifiquement sur un niveau de cendres extrêmement riche en éléments métalliques (Zn, Pb, Cd, ...), où la plupart des autres espèces ne peuvent survivre. La compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques responsables de la bioaccumulation et de la résistance aux métaux lourds est indispensable pour maîtriser, et éventuellement augmenter grâce au génie génétique, le rendement d'extraction des métaux par ces plantes. Une approche pluridisciplinaire couplant la phytosociologie, la biologie moléculaire, et l'étude structurale de la forme chimique des métaux nous semble être la démarche la plus appropriée pour comprendre ces systèmes. Dans ce cadre, une action de recherche soutenue par le programme national d'écotoxicologie (PNETOX) a été initiée en collaboration avec une équipe de généticiens et de botanistes. L'objectif est d'étudier différents aspects de l'acquisition de la résistance aux métaux chez les végétaux supérieurs hyperaccumulateurs:

- Un aspect communautaire, visant à mettre en évidence des indices de métallotolérance et à préciser le rôle de l'endomycorhisation sur la bioaccumulation des éléments traces (Pb, Zn).
- Un aspect génétique basé sur l'étude des gènes codant pour les métallothionéines et leurs produits d'expression ainsi que leur mode de régulation.
- Un aspect moléculaire, visant à déterminer les mécanismes de complexation des éléments traces dans les différents organes végétaux.

*Arméria maritima*      *Cardaminopsis halleri*



Photo 1: pelouse métallicole de Mortagne du Nord.



Photo 2: *Cardaminopsis halleri* poussant sur un niveau de cendres (Mortagne du Nord)

ANNEXES

## ANNEXE FEFF7

Le programme comprend quatre modules, qui peuvent s'exécuter indépendamment:

1- POTPH calcule les potentiels de diffusion de chaque atome, les déphasages atomiques, la matrice des éléments dipolaires et les énergies absolues. Les potentiels de diffusion sont calculés par recouvrement des densités des atomes libres dans une approximation de Muffin-tin. Dans cette approximation, les potentiels sont constants à l'intérieur d'une sphère de rayon  $r$ . Les potentiels sont dits moléculaires car ils tiennent compte de l'influence des électrons environnants.

2- PATHS dénombre tous les chemins de diffusion au sein du cluster. Un premier filtre en fonction de l'amplitude des chemins est appliqué, le calcul utilisant l'approximation en ondes planes. Ensuite un second filtre basé sur un calcul en ondes sphériques est appliqué à tous les chemins restants.

3- GENFMT calcule pour chaque chemin l'amplitude effective de rétrodiffusion ( $F_{\text{eff}}$ , d'où le nom du programme), le déphasage total, et les autres paramètres XAFS pour chaque chemin.

4- FF2CHI calcule le spectre  $\chi(k)$  total en prenant en compte certains paramètres comme le facteur de Debye-Waller ( $\sigma$ ), le décalage en énergie ( $\Delta E$ ), et le facteur de réduction d'amplitude ( $S_0^2$ ). Il fournit aussi les fonctions amplitude et déphasage pour chaque chemin.

#### Les paramètres du fichier d'entrée FEFF.INP

Ce fichier contient au minimum la nature des atomes de la structure étudiée (paramètre POTENTIAL), leur position en coordonnées cartésiennes (paramètre ATOMS), ainsi que la nature du seuil étudié (HOLE). Les autres paramètres (facultatifs) qui ont été utilisés pour notre étude sont CONTROL, CORRECTIONS, NLEG, RMAX, CRITERIA, SIG2.

CONTROL potph paths genfmt ff2chi

Permet de définir quels modules sont exécutés par le programme. La valeur 1 signifie que le module est exécuté, la valeur 0 interdit son exécution.

NLEG nleg

Ce paramètre indique le nombre de trajets entre deux atomes pour le photoélectron. Par exemple, nleg=2 correspond aux chemins de diffusion simple, nleg=3 aux chemins de diffusion simple + d'ordre 3.

RMAX rmax

Ce paramètre fixe le rayon effectif maximal, qui représente la moitié du chemin total de diffusion. Par défaut, rmax est fixé à deux fois la distance du plus proche voisin.

## CRITERIA critcw critpw

Le nombre de chemins de diffusion multiple est souvent très grand, la plupart d'entre eux ont une intensité faible et peuvent être négligés. Ce paramètre permet de simplifier l'analyse en éliminant les chemins dont l'intensité est inférieure à un certain pourcentage de la plus importante contribution. Un premier filtrage est effectué en approximation d'onde plane (critpw). Ce calcul, plus rapide qu'un calcul rigoureux en onde courbe, donne des résultats satisfaisants à 20% près. Le second filtrage utilise le calcul en onde courbe (critcw). Par défaut, les valeurs de critpw et critcw sont fixées à 4.5 et 2. Des valeurs de 6 et 3 permettent de limiter le temps de calcul et le nombre de fichiers sans perte d'information.

## CORRECTIONS real-energy-shift imaginary-energy-shift

Les deux valeurs indiquent dans l'ordre le décalage réel et imaginaire en énergie. Le décalage réel permet de changer la valeur de  $E_0$  calculée par FEFF, le décalage imaginaire permet de convoluer la largeur du spectre calculé par une largeur instrumentale (ce deuxième paramètre n'a pas été testé).

## SIG2 sig2

Il s'agit du facteur de Debye Waller global qui est appliqué au spectre  $\chi(k)$  total. Comme ce facteur varie d'une couche à l'autre, il est plus juste de donner une valeur de sig2 pour chaque chemin de diffusion en modifiant le fichier list.dat, et en exécutant ensuite le module FF2CHI seul pour obtenir le spectre  $\chi(k)$  total.

## 1- Exemple de fichier FEFF.INP utilisé pour calculer des fonctions d'amplitude et de déphasage théoriques.

```
TITLE ZnO
POTENTIAL
0 30 Zn
1 8 O
2 30 Zn

HOLE
1 1.0

CONTROL 1 1 1 1
PRINT 0 0 0 3
NLEG 2

ATOMS
.00000 .00000 .00000 0 Zn .00000
.93810 1.62484 - .61495 1 O1 1.97441
END
```

atome central: Zn, de numéro atomique 30, rétrodiffuseurs O (numéro atomique 8) et Zn.

Seuil K du zinc,  $S_0^2=1$

4 sous-programmes exécutés (POTPH, PATHS, GENFMT, FF2CHI).

Création des fichiers FEFFNNN.DAT pour chaque chemin pris en compte. Seule la diffusion simple est prise en compte.

Coordonnées cartésiennes des atomes du cluster.

Le fichier FEFFNNN.DAT contient les fonctions d'amplitude, de déphasage et de libre parcours moyen pour une paire atomique donnée. Les paramètres  $S_0^2$ , CORRECTIONS, SIG2 ne sont pas pris en compte dans ce fichier.

## 2- Fichier FEFF.INP utilisé pour ajuster le spectre calculé au spectre expérimental. Les paramètres ajustés manuellement par l'utilisateur sont remplacés par une étoile (\*).

```
TITLE ZnO
POTENTIAL
0 30 Zn
1 8 O
2 30 Zn

HOLE
1 *
```

atome central: Zn, de numéro atomique 30, rétrodiffuseurs O (numéro atomique 8) et Zn.

Seuil K du zinc,  $S_0^2$ =paramètre ajusté, proche de 0.85 en général.

3 premiers sous-programmes exécutés.

décalage réel en énergie

Multiplicité des chemins maximale: 5

Rayon effectif maximal: 7 Å  
Critères d'élimination des chemins de faible amplitude: 6% et 3%.

```
CONTROL 1 1 1 0
CORRECTIONS *
NLEG 5
RMAX 7
CRITERIA 6 3

ATOMS
.00000 .00000 .00000 0 Zn .00000
.93810 1.62484 - .61495 1 O1 1.97441
END
```

Coordonnées cartésiennes des atomes du cluster

Ensuite, les paramètres SIG2 pour chaque chemin sont introduits par l'utilisateur dans le fichier LIST.DAT, et le module 4 est exécuté seul (CONTROL 0 0 0 1) pour obtenir le spectre total  $\chi(k)$  (fichier CHI.DAT). L'affinement des SIG2 se fait par comparaison des transformées de Fourier FEFF et expérimentales.

## ANNEXE DVLS (Distance-Valence Least-Squares)

**Principe**

Ce programme est basé sur le concept de *valence de liaison*, qui permet de calculer la force d'une liaison chimique entre deux atomes. Brown [171] a défini une formulation empirique de la valence de liaison, applicable à pratiquement tous les types de composés: La force de liaison entre deux atomes  $i$  et  $j$ , ou *valence de liaison* ( $s_{ij}$ ) est une fonction exponentielle de la longueur de la liaison  $r_{ij}$ :

$$s_{ij} = \exp [(r_0 - r_{ij})/0.37] \quad (1)$$

avec  $r_0$ : rayon effectif du cation (valeur empirique qui dépend de la paire atomique considérée).  $s_{ij}$  est exprimée en unités de valence. Pour un atome  $i$  donné, la somme de ses valences de liaison doit compenser sa charge:

$$\sum_j s_{ij} = V_i \quad (2)$$

$V_i$  étant le degré d'oxydation formel de l'atome.

Ce modèle est remarquable par sa simplicité: il ne fait pas appel à la mécanique quantique pour décrire les liaisons, mais seulement à la nature chimique des paires atomiques considérées et à la longueur de la liaison. Il s'applique à tous les types de liaisons entre atomes. Les liaisons covalentes ont une valence généralement supérieure à 0.6, les liaisons ioniques ou électrostatiques une valence inférieure à cette valeur. L'approche par valence de liaison est tout à fait complémentaire de celle par spectroscopie d'absorption X. En effet, l'EXAFS fournit une bonne précision sur les distances interatomiques (0.02 Å) et sur la nature des atomes, mais une moins bonne précision sur le nombre de voisins (10-20%).  $N_{\text{EXAFS}}$  peut donc être confronté à  $N_{\text{DVLS}}$  et validé de cette manière. Le programme DVLS peut aussi être utilisé pour déterminer les angles entre les liaisons interatomiques. [172-174]. Il peut aussi permettre d'évaluer la stabilité d'une structure, ou d'affiner les positions atomiques d'un cluster afin de satisfaire la relation (2).

**Description du programme**

Le programme DVLS [175] permet le calcul des valences de liaison pour une structure donnée, ou l'affinement d'une structure par la méthode des moindres carrés, en utilisant comme critère d'affinement la relation (2). Les paramètres ajustables sont les paramètres de maille et/ou les positions atomiques. Les paramètres de consigne possibles (égalité ou limites supérieures et/ou inférieures) sont les distances interatomiques, les angles entre les liaisons, la valence des atomes. On affecte à chaque paramètre un poids selon l'importance qu'on veut lui donner. Le programme ORFEE permet de créer le fichier d'entrée de DVLS à partir des paramètres de maille et des positions atomiques initiaux. Pour tous les affinements effectués, les paramètres de mailles ont été fixés, et les positions atomiques initiales ont été choisies de façon aléatoire. On a vérifié que le programme convergeait vers une solution unique.

## ANNEXE Acides humiques

Cette annexe présente l'article lié au chapitre III. Il reprend certains des résultats présentés dans ce chapitre.

Cet article a été publié dans le Journal de Physique [176].

*EXAFS study of the nature of zinc complexation sites in humic substances as a function of Zn concentration*

G. SARRET, A. MANCEAU, J-L. HAZEMANN, A. GOMEZ\*, M. MENCH\*

Environmental Geochemistry Group, LGIT-IRIGM, University of Grenoble and CNRS, BP 53, 38041 Grenoble, Cedex 9, France, \* INRA, Unité de Recherches en Agronomie, Centre de Bordeaux, BP81, 33883 Villenave d'Ornon, cedex, France

**Abstract**

Humic substances are known to play a key role in the immobilisation of metals in soils. The main complexing ligands that are supposed to interact with metals are carboxylic and phenolic. The complexation mechanism of zinc by two natural humic acids (T and F) was studied by EXAFS spectroscopy at the Zn-K edge over a wide range of zinc concentration. The ligation mechanism of Zn was found to vary with the metal concentration and the nature of the humic acid. As Zn concentration is raised, the amplitude of EXAFS spectra decreases, which is interpreted as an increased distribution of ligand sites. At low Zn concentration (300-5000 mg/Kg), zinc forms inner sphere complexes in octahedral coordination for T humic acid, and in octahedral and tetrahedral coordinations for F humic acid. At intermediate Zn concentration (32 g/Kg), a large number of different sites are observed and only octahedral coordination is detected. At high Zn concentration (500 g/Kg), most Zn forms outer sphere complexes. The difference of complexation mechanisms between humic acids F and T can be related to differences in their structure as indicated by  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy.

shortened title: EXAFS STUDY OF ZINC-HUMIC ACIDS COMPLEXATION

**1. Introduction**

Soils are the most significant sink for trace elements released in the environment. It is now widely admitted that the toxicity of metals depends not only on their total concentration, but mainly on their chemical form, i.e. their speciation. Humic substances (HS) possess a polyfunctional (with O, N, and S-containing groups), polyelectrolytic and hydrophilic character,

and the capacity to form intermolecular associations, and to change their spatial conformation [2]. Due to these characteristics, they can form stable complexes with metals. Despite the sustained interest of this topic for many years, much remains unknown regarding mechanistic aspects of the complexation. Several models have been proposed, including the formation of inner and outer sphere complexes [1]. In the present study, the complexation mechanism of Zn as a function of the metal concentration was investigated in two humic acids (HA) differing by the nature and/or proportion of their functional groups. Because of its versatile structural chemistry, Zn is a very good candidate for probing the different functional groups of HS that are likely to complex metals.

## 2. Experimental

Two HA were studied, one originating from a french soil [5], (T), and a reference material supplied by Fluka. They were extracted following the standardized International Humic Substances Society recipe [6].  $^{13}\text{C}$ -NMR analysis showed that the two HA are structurally different: T HA contains predominantly aromatic, and F HA aliphatic functional groups. Zn complexation was carried out at pH 5 by placing the humic acid in a dialysis membrane (Spectrapor 6 for PM 1000),  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  being in the external solution. The system was stirred for 24 hours, and the absence of aqueous Zn at the end of the reaction was verified by ICP-AES. Zn-HA complexes were then freeze-dried for EXAFS experiments. EXAFS measurements were performed on the CRG/IF beamline ID32 bending magnet at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble. Zn K-edge spectra for diluted samples were recorded at room temperature in fluorescence detection mode using a 5-element Ge detector having a total counting rate of 350 000 ph/s. For each sample 3-6 scans were collected and averaged. EXAFS spectra for concentrated HA and references were measured in transmission mode. Interatomic distances and coordination numbers (CN) were calculated by using experimental phase shift and amplitude functions extracted from ZnO [7] (Table I).

## 3. Results and discussion

### 3.1 Reference compounds

The sensitivity of the method to different coordination chemistries will be exemplified with anhydrous Zn acetate, where Zn is 4-fold coordinated ( $\text{IVZn}$ ) to four monodentate carboxyls ( $d(\text{Zn-O})=1.973$  and  $1.992$  Å) [8], and aqueous  $\text{Zn}^{2+}$ , where it is fully solvated by six water molecules ( $d(\text{Zn-O})=2.08$ - $2.17$  Å) [9]. These differences of site geometry are visualized on radial structure functions (RSFs) by a shift and change in amplitude of first RSFs peaks (fig. 1). Zn-O distances and CN determined by least squares fitting are in good agreement with crystallographic values (Table I). A systematic structural analysis of Zn organic and coordination complexes contained in the Cambridge Structural Database showed that  $\langle d(\text{IVZn-O}) \rangle \sim 1.9$  Å and  $\langle d(\text{VI Zn-O}) \rangle \sim 2.1$  Å. It is concluded from this analysis of reference compounds that the coordination site of Zn can be confidently inferred from bond length determination.

### 3.2 Zn complexed humic acids

Raw EXAFS spectra and RSFs for samples F and T as a function of Zn concentration are contrasted in fig. 2, 3, 4 and 5. For sample T, Zn-O distances are typical of 6-fold coordination regardless of the complexation rate. As the Zn concentration is raised, the amplitude of the first three peaks markedly decreases, except for the most concentrated sample. This is expressed in Table I by an apparent decrease of CN with increasing metal concentration down to 1.8 for the 32 g/Kg sample. In the 300-500 mg/Kg concentration range, the RSFs amplitude was found to be notably higher than in most reference spectra. This indicates that Zn is bound to structurally similar complexing sites, and that individual Zn-O distances are coherent. The loss in amplitude when the Zn concentration is raised is interpreted by an increased distribution of complexing sites. As more Zn is added, new types of ligands would participate in the complexation, in the reverse order of their affinity for the metal. However, the highest concentrated sample (500g/Kg Zn) does not follow this evolution. Its first RSF peak amplitude is very high, indicating that one Zn species predominates (fig. 4). From comparison with aqueous  $\text{Zn}^{2+}$ , it can be concluded that at high concentration, Zn forms predominantly an outer sphere complex. This interpretation is corroborated by cation exchange capacity (CEC) measurements. At pH 5, this capacity is between 175 to 260 meq of charge/100g [3], i.e., 57 to 85 g/Kg  $\text{Zn}^{2+}$ . Thus, at 500g/Kg Zn, only 10 to 20% of total Zn can be bound to functional groups, the remaining being weakly bound by an outer sphere complexation mechanism. The fact that the 500g/Kg sample has a slightly lower Zn-O amplitude than aqueous  $\text{Zn}^{2+}$  is probably due to the contribution of the minor inner sphere complexes, which represent 10 to 20% of total Zn. The presence of an outer sphere complex at high metal concentration (5 to 50 wt. %  $\text{Fe}^{3+}$ ) was also observed by Mössbauer spectroscopy in  $\text{Fe}^{3+}$ -HA complexes [10].

The same amplitude evolution is observed for the F humic acid, but first shell Zn-O distances are shorter (Table I, fig. 5). Values typically lie between 4-fold and 6-fold coordination. This suggest a mixture of the two coordinations, the former prevailing at lower concentration. This interpretation agrees with the ESR study by Senesi et al. [10] of  $\text{Fe}^{3+}$ -HA at low Fe concentration (2.8% Fe). They showed that part of the metal was bound to carboxylic and possibly phenolic groups as an inner sphere complex, in a tetrahedral and octahedral coordination. The present results show that tetrahedral configuration occurs only at very low Zn concentration. This 4-fold coordination is generally achieved by four monodentate carboxyl groups, as in anhydrous Zn acetate.

#### 4. Conclusion

At low concentration, Zn forms inner sphere complexes being either solely 6-fold (T) or 6-fold and 4-fold (F) coordinated to O ligands. This difference in Zn site geometry observed for HA T and F can be related to their differences in structure as indicated by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. As Zn concentration is raised, the number of different ligand sites increases, the coordination being exclusively octahedral. At very high metal concentrations, the major part of Zn (80-90%) is bound as an outer sphere complex. Therefore, this study demonstrates the existence of a plurality of binding sites in HA, and thus provides a structural support to the use of a continuum of thermodynamic stability constants to model solution complexation experiments [11].

#### Acknowledgments

The authors wish to thank the ESRF for making access to the facility.

#### 5. References

- [1] Senesi N., in Biogeochemistry of Trace elements, (Lewis 1992) 429-496.
- [2] Buffle J., in Metals Ions in Biological Systems, vol 18, Circulation of metals in the environment, Sigel, H., Ed. (M. Dekker 1984) 165-221.
- [3] Stevenson, F. J., Humus Chemistry (Wiley 1994) 378-404.
- [4] Manceau A., Boisset M-C., Sarret G., Hazemann J-L, Mench M., Cambier Ph., Prost R., Env. Sci. & Technol. 30 (5) (1996) 1540-1552.
- [5] Arrouays D., Baize D., Hardy M., Le Lay C., 1992, Sciences du sol, Vol. 30, 4, 227-247.
- [6] Thurman E. M., in Humic Substances and Their Role in the Environment, Frimmel F. H. and Christman R. F., (Wiley 1988) 31-43.
- [7] Albertsson J., Abrahams S. C., Kvik A., Acta Cryst. B45 (1989) 34-40.
- [8] Clegg W., Little I. R., Straughan B. P., Acta Cryst., C 42 (1986) 1701.
- [9] Burgess J. Ions in Solution (Ellis Horwood Ltd 1988) pp. 36-44.
- [10] Senesi N., Griffith S. M., Schnitzer M., Townsend M. G., Geochim. et Cosmochim. Acta 41 (1977) 1131-1138.
- [11] Benedetti M F, Milne C J, Kinniburgh D G, Van Riemsdijk W H, Koopal L K, 1995, Env. Sci. & Technol., 29, 446-457.

Table I: EXAFS and XRD structural parameters

sample	atomic pair	XRD		EXAFS				weighted distance (Å)
		R (Å)	N	R (Å)	N	$\Delta\sigma$ (Å)	$\Delta E$ (eV)	
Reference: ZnO	Zn-O	1.973	3	1.98	4	0	0	1.98
	Zn-O	1.992	1					
Anhydrous Zn acetate monoclinic	Zn-O	1.949	1	1.97	4	0.01	0.64	1.97
	Zn-O	1.952	1					
	Zn-O	1.96	1					
	Zn-O	1.965	1					
Zn in aqueous solution	Zn-H <sub>2</sub> O	2.08-2.17	6	2.07	42	0	0	2.11
				2.2	2	0		
HA T 200 mg/Kg Zn	Zn-O			2.03	3	0	0	2.07
	Zn-O			2.17	1.4	0	0	
HA T 500 mg/Kg Zn	Zn-O			2.05	3.1	0	0	2.06
	Zn-O			2.15	0.5	0	0	
HA T 5000 mg/Kg Zn	Zn-O			2.02	2.4	0	0	2.06
	Zn-O			2.17	1	0	0	
HA T 32 g/Kg Zn	Zn-O			2.06	1.8	0.01	0	2.06
HA T 500 g/Kg Zn	Zn-O			2.04	3.5	0.01	0	2.08
	Zn-O			2.16	1.6	0.01	0	
HA F 1000 mg/Kg Zn	Zn-O			1.99	2.4	0	0	2.04
	Zn-O			2.10	1.8	0	0	
HA F 5000 mg/Kg Zn	Zn-O			1.98	2.3	0	0	
	Zn-O			2.11	1.5	0	0	
HA F 500 g/Kg Zn	Zn-O			2.03	3.1	0.01	0	2.07
	Zn-O			2.16	1.6	0.01	0	

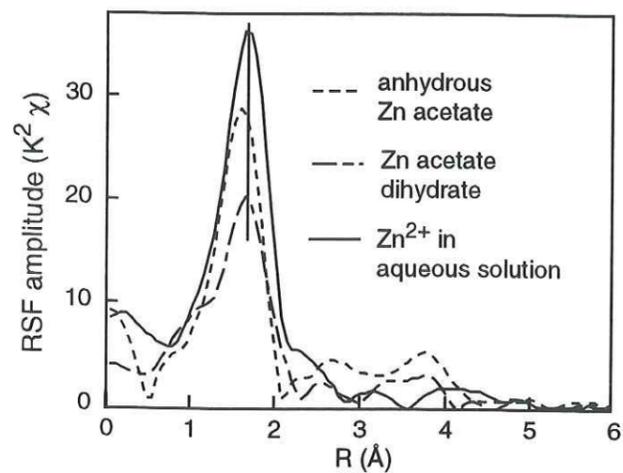


Fig. 1: Comparison of RSFs for Zn reference compounds

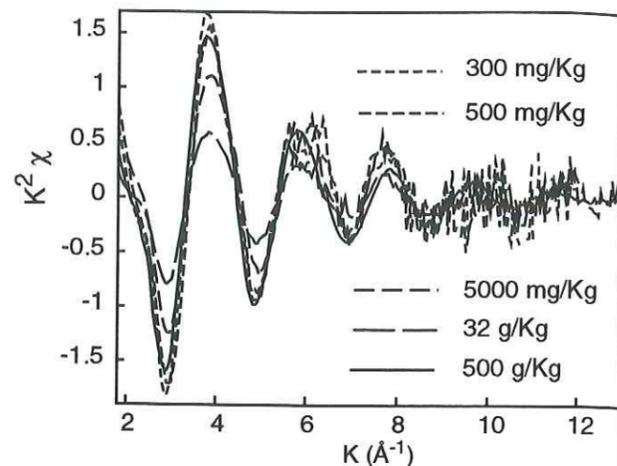


Fig. 2: EXAFS spectra for Zn-T humic acid complexes at different Zn concentrations

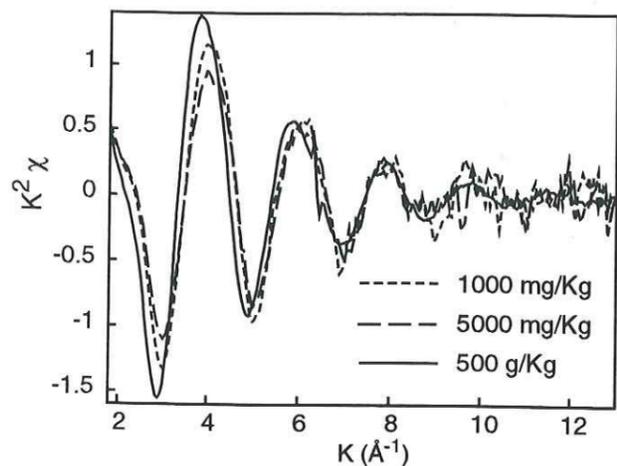


Fig. 3: EXAFS spectra for Zn-F humic acid complexes at different Zn concentrations

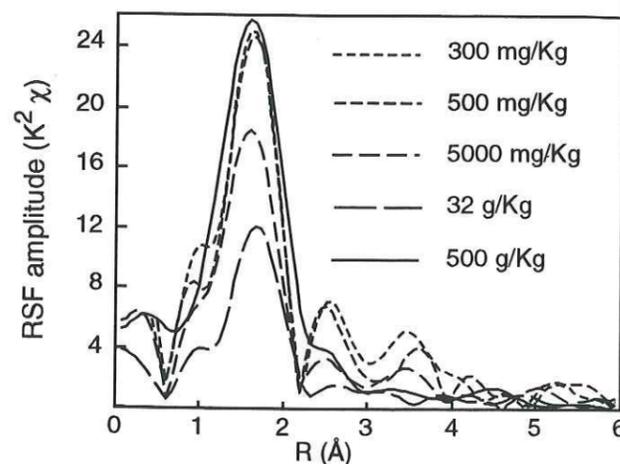


Fig. 4: Comparison of RSFs for Zn-T humic acid complexes at different Zn concentrations

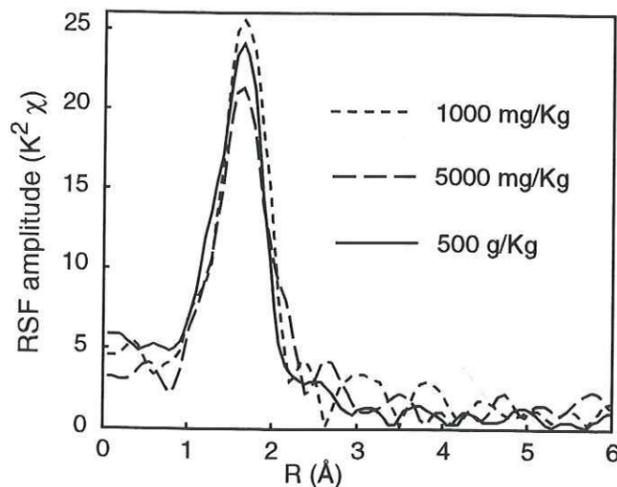


Fig. 5: Comparison of RSFs for Zn-F humic acid complexes at different Zn concentrations

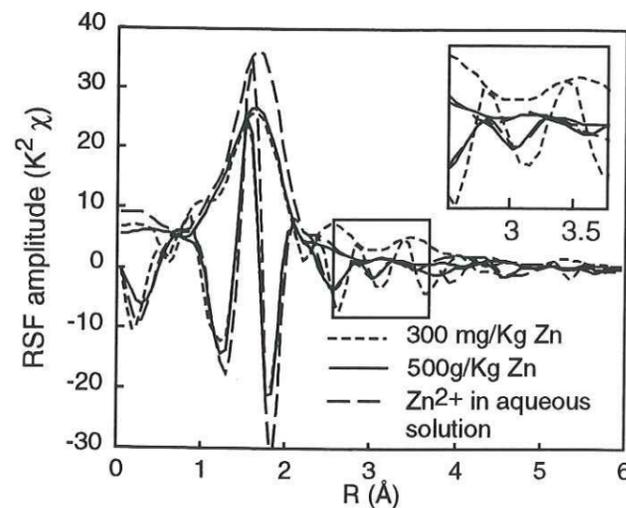


Fig. 6: Comparison of RSFs for Zn-T humic acid complexes and  $Zn^{2+}$  in aqueous solution

## BIBLIOGRAPHIE

## BIBLIOGRAPHIE

1. Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. *Trace elements in soils and plants* (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1984).
2. Nriagu, J.O. & Pacyna, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **333**, 134-139 (1988).
3. Nriagu, J.O. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* **338**, 47-49 (1989).
4. Davies, B.E. in *Heavy Metals in Soils, 2nd Edition* (eds. Alloway, B.J.) 206 (Blackie Academic and Professional, London, 1995).
5. Moore, J.W. Inorganic contaminants in surface water.
6. Pain, D.J. in *Handbook of Ecotoxicology* (eds. Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, A.G. & Cairns, J.) 356-391 (Lewis Publishers, Boca Raton, 1995).
7. Kiekens, L. in *Heavy Metals in Soils, 2nd Edition* (eds. Alloway, B.J.) 568 (Blackie Academic and Professional, London, 1995).
8. Wixson, B.G. & Davies, B.E. *Lead in soil, Recommended guidelines* (Science Reviews, Northwood, England, 1993).
9. Gilfillian, S.C. Lead poisoning and the fall of Rome. *J. Occup. Med.* **53**, (1965).
10. Volesky, B. *Biosorption of heavy metals* (CRC Press, Boca raton, 1990).
11. Beyer, W.N. & Storm, G. in *Handbook of Ecotoxicology* (eds. Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, A.G. & Cairns, J.) (Lewis Publishers, Boca Raton, 1995).
12. Kramer, U., *et al.* Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**, 635-638 (1996).
13. Sayers, D.E., Stern, E.A. & Lytle, F.W. *Phys. Rev. Lett.* **27**, 1204 (1971).
14. Murata, T. Synchrotron radiation for structure analysis - EXAFS and XANES. *Microkimica Acta II*, 435-444 (1991).
15. Lagarde, P. EXAFS, voir l'environnement des atomes. *La Recherche* **17**, 52-61 (1986).
16. Schulze, D.G. & Bertsch, P.M. Synchrotron X-ray Techniques in soil, plant, and environmental research. *Advances in Agronomy* **55**, 1-66 (1995).
17. Koningsberger, D. & Prins, R. *X-Ray Absorption: Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS, and XANES* (Wiley, New York, 1988).
18. Margaritondo, G. *Introduction to Synchrotron Radiation* (Oxford University Press, 1988).
19. Teo, B.K. *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis* (Springer-Verlag, Berlin, 1986).
20. Lagarde, P. Rayonnement synchrotron dans le domaine des rayons X, p. 300. *Ecole d'été d'Aussois* (1986).

21. Manceau, A. & Combes, J.-M. Structure of Mn and Fe oxides and oxyhydroxides: a topological approach by EXAFS. *Physical and Chemistry of Minerals* **15**, 283-295 (1988).
22. Vaarkamp, M., Dring, I., Oldman, R.J., Stern, E.A. & Koningsberger, D.C. Comparison of theoretical methods for the calculation of extended x-ray absorption fine structure. *The American Physical Society* **50**, 7872-7883 (1994).
23. Teo, B. & Lee, P.A. *Ab initio* calculation of amplitude and phase functions for extended X-ray absorption fine structure spectroscopy. *J. Amer. Chem. Soc.* **101**, 2815-2822 (1979).
24. McKale, A.G., Veal, B.W., Paulikas, A.P., Chan, S.K. & Knapp, G.S. Improved *ab initio* Calculations for Extended Absorption Fine Structure Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **110**, 3763-3768 (1988).
25. Stern, E.A. Theory of the extended x-ray-absorption fine structure. *Physical Review B* **10**, 3027 (1974).
26. Raoux, D. Rayonnement synchrotron et etude des materiaux. *L'Act. Chim.* **6**, 3-19 (1997).
27. Salt, D.E., *et al.* Metal accumulation by aquacultured seedlings of indian mustard. *Environ. Science Technol.* **31**, 1636-1644 (1997).
28. Xia, K., Bleam, W. & Helmke, P.A. Studies of the nature of binding sites of first row transition elements bound to aquatic and soil humic substances using X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**, 2223-2235 (1997).
29. Schulze, D.G., McCay-Buis, S.R., Sutton, S.R. & Huber, D.M. Manganese oxidation states in *Gaeumannomyces* infested wheat rhizospheres probed by micro XANES spectroscopy. *Phytopathology* **85**, 990-994 (1995).
30. Shriver, D.F., Atkins, P.W. & Langford, C.H. *Inorganic Chemistry* (Oxford Univ. Press, 1990).
31. Ochiai, E.I. Uniqueness of zinc as a bioelement. *Journal of Chemical Education* **65**, 943-946 (1988).
32. Shannon, R.D. & Prewitt, C.T. Effective Ionic Radii in Oxides and Fluorides. *Acta Cryst.* **B25**, 925-945 (1969).
33. Shannon, R.D. Revised effective ionic radius and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica* **B25**, 925-946 (1976).
34. Denecke, M.A., *et al.* Measurements of the structural parameters for interaction of uranium(VI) with natural and synthetic humic acids using EXAFS. *Radiochimica Acta* (accepted).
35. Albertsson, J. & Abrahams, S.C. Atomic displacement, anharmonic thermal vibration, expansivity and pyroelectric coefficient thermal dependences in ZnO. *Acta Cryst.* **B45**, 34-40 (1989).

36. Burgess, J. *Ions in solution* (Ellis Horwood Series in Inorganic Chemistry, Chichester, England, 1988).
37. Whitaker, A. The crystal structure of Hopeite,  $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$ . *Acta Cryst.* **B31**, 2026-2035 (1975).
38. Skinner, B.P.B. Effect of FeS on the unit cell edge of sphalerite. *Econ. Geol.* **54**, 1040 (1959).
39. Baker, E.N., Baker, H.M., Anderson, B.F. & Reeves, R.D. *Inorg. Chim. Acta* **78**, 281 (1983).
40. Chairidchai, P. & Ritchie, S.P. Zinc adsorption by a lateritic soil in the presence of organic ligands. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **54**, 1242-48 (1990).
41. Furrer, G. & Stumm, W. The coordination chemistry of weathering: I. Dissolution kinetics of  $Al_2O_3$  and  $BeO$ . *Geochimica et Cosmochimica Acta* **50**, 1847-1860 (1986).
42. Dutton, M.V. & Evans, C.S. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.* **42**, 881-895 (1996).
43. Giordano, T.H. & Barnes, H.L. Lead transport in Mississippi valley-type ore solutions. *Econ. Geol.* **76**, 2200-2211 (1981).
44. Deyrieux, R., Berro, C. & Peneloux, A. Contribution à l'étude des oxalates de certains métaux bivalents. III.- Structure cristalline des oxalates dihydratés de manganèse, de cobalt, de nickel et de zinc. Polymorphisme des oxalates dihydratés de cobalt et de nickel. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 25-34 (1973).
45. Singh, K.D., Jain, S.C., Sakore, T.D. & Biswas, A.B. The crystal and molecular structure of zinc lactate trihydrate. *Acta Cryst* **B31**, 990 (1974).
46. Dittmer, J. & Dau, H. On the influence of multiple scattering contributions to the extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) spectra of the photosystem II manganese complex. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **12**, 1993-1988 (1993).
47. Thomas, F., *et al.* Aluminum(III) speciation with hydroxy carboxylic acids.  $^{27}Al$  NMR study. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 2511-2516 (1993).
48. Rissanen, K., Valkonen, J., Kokkonen, P. & Leskela, M. Structural and thermal studies on salicylato complexes of divalent manganese, nickel, copper and zinc. *Acta Chemica Scandinavica* **A41**, 299-309 (1987).
49. Van Niekerk, J.N., Schoening, F.R.L. & Talbot, J.H. The crystal structure of zinc acetate dihydrate,  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ . *Acta Cryst.* **6**, 720 (1953).
50. Smith, G., Reilly, E.J.O., Kennard, C.H.L., Stadnika, K. & Oleksyn, B. *Inorg. Chim. Acta* **47**, 111 (1981).
51. Reilly, E.J.O., Smith, G., Kennard, C.H.L. & Mak, T.C.W. *Aust. J. Chem.* **40**, 1147 (1987).

52. Yang, M.M., Crerar, D.A. & Irish, D.E. A Raman spectroscopic study of lead and zinc acetate complexes in hydrothermal solutions. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **53**, 319-326 (1989).
53. Blackburn, N.J. & al., e. *Biochem. J.* **213**, 765-768 (1983).
54. Clegg, W., Little, I.R. & Straughan, B.P. Monoclinic anhydrous zinc(II) acetate. *Acta Cryst.* **C42**, 1701-1703 (1986).
55. Guseinov, G.A. & al., e. *Koord. Khim* **10**, 117 (1984).
56. Kaupp, M. & Schleyer, R. Ab initio study of structures and stabilities of substituted lead compounds. Why is inorganic lead chemistry dominated by Pb(II) but organolead chemistry by Pb(IV)? *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 1061-1073 (1993).
57. Galy, J., Meunier, G., Andersson, S. & Astrom, A. *J. Solid State Chem.* **13**, 142 (1975).
58. Leciejewicz, J. On the crystal structure of tetragonal (red) PbO. *Acta Cryst.* **14**, 1304 (1961).
59. Schurmann M, H.F. A redetermination of lead(IV) acetate. *Acta Cryst.* **C50**, 1710-1713 (1994).
60. Bryant, R.G., Chacko, V.P. & Etter, M.C. <sup>13</sup>C CP/MAS NMR and Crystallographic investigations of the structure and solid-state transformations of lead(II) acetate trihydrate. *Inorg. Chem.* **23**, 3580 (1984).
61. Boucher, M.L. & Peacor, D.R. The crystal structure of alamosite, PbSiO<sub>3</sub>. *Zeit. fur Krist.* **126**, 98-111 (1968).
62. Dai, Y. & Hugues, J.M. Crystal structure refinements of vanadite and pyromorphite. *Canadian Mineralogist* **27**, 189-192 (1989).
63. Yu, Y.H., Tylliszczak, T. & Hitchcock, A.P. Pb L<sub>3</sub> EXAFS and near-edge studies of lead metal and lead oxides. *J. Phys. Chem. Solids* **51**, 445-451 (1990).
64. Meerschaud, A., Guemas, L., Auriel, C. & Rouxel, J. *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.* **27**, 557 (1990).
65. Christensen, A.N., Cox, D.E. & Lehmann, M.S. A crystal structure determination of PbC<sub>2</sub>O<sub>4</sub> from synchrotron X-ray and neutron powder diffraction data. *Acta Chem. Scand.* **43**, 19-25 (1989).
66. Virovets, A., Naumov, D., Boldyreva, E. & Podberezskaya, N. Structure of lead(II) oxalate dihydrate. *Acta Cryst.* **C49**, 1882-1884 (1993).
67. Huang, S.H., Wang, R.-J. & Mak, T.C.W. Crystal structures of isomorphous cadmium(II) and lead(II) oxalate trihydrates. *J. Crystallographic and Spectroscopic Research* **20**, 99-104 (1990).
68. Chisholm-Brause C J, H.K.F., Roe A L, Brown G E, Parks G A, Leckie J O. Spectroscopic investigations of Pb(II) complexes at the δ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/water interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **54**, 1897-1909 (1990).

69. Manceau, A., Gorshkov, A.I. & Drits, V.A. Structural Chemistry of Mn, Fe, Co, and Ni in Mn hydrous oxides. II. Information from EXAFS spectroscopy, electron and X-ray diffraction. *American Mineralogist* **77**, 1144-1157 (1992).
70. Manceau, A., Gorshkov, A.I. & Drits, V.A. Structural Chemistry of Mn, Fe, Co, and Ni in Mn hydrous oxides. I. Information from XANES spectroscopy. *American Mineralogist* **77**, 1133-1143 (1992).
71. Spadini, L., Manceau, A., Schindler, P.W. & Charlet, L. Structure and Stability of Cd<sup>2+</sup> Surface Complexes on Ferric Oxides. I. Results from EXAFS Spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* **168**, 73-86. (1994).
72. Manceau, A., et al. Direct determination of lead speciation in contaminated soils by EXAFS spectroscopy. *Environ Sci. Technol.* **30**, 1540-1552 (1996).
73. Senesi, N. in *Biogeochemistry of Trace Metals* (eds. C, A.D.) 429-496 (Lewis Publishers, Boca Raton, 1992).
74. Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L. & MacCarthy, P. *Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Geochemistry, Isolation and Characterisation* (Wiley, New-York, 1985).
75. Thurman, E.M. in *Humic Substances and Their Role in the Environment* (eds. Frimmel, F.H. & Christman, R.F.) (Wiley, 1988).
76. Stevenson, F.J. *Humus chemistry* New York, 1994).
77. Steelink, C., Wershaw, R.L., Thorn, K.A. & Wilson, M.A. in *Humic Substances II: In Search of Structure* (eds. Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L. & Swift, R.S.) 281-308 (Wiley, New-York, 1989).
78. Buffle, J. *Complexation Reactions in Aquatic Systems ; an Analytical Approach* Chichester (UK), 1988).
79. Rice, J.A. & Lin, J.S. Fractal nature of humic material. *Env. Sci. & Technol.* **27**, 413-414 (1993).
80. Senesi, N. *Humic substances in the global environment and implications on human health* 1-3-41 (Elsevier, Monopoly, 1992).
81. Sigg, L., Stumm, W. & Behra, P. *Chimie des eaux aquatiques* (Masson, Paris, 1992).
82. Ephraim, J.H., Reddy, M.M. & Marinski, J.A. *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment* (Springer Verlag, New York, 1991).
83. De Wit, J.C.M., Van Riemsdijk, W.H. & Koopal, L.K. Proton binding to humic substances. 2. Chemical heterogeneity and adsorption models. *Env. Sci. & Technol.* **27**, 2015-2022 (1993).
84. Nederlof, M.M., De Wit, J.C.M., Van Riemsdijk, W.H. & Koopal, L.K. Determination of proton affinity distributions for humic substances. *Env. Sci. & Technol.* **27**, 846-856 (1993).

85. Milne, C.J., Kinniburgh, D.G., De Wit, J.C.M., Van Riemsdijk, W.H. & Koopal, L.K. Analysis of proton binding by a peat humic acid using a simple electrostatic model. *Geochim. Cosmochim. Acta* **59**, 1101-1112 (1995).
86. Leenheer, J.A., Wershaw, R.L. & Reddy, M.M. Strong-acid, carboxyl-group structures in fulvic acid from Suwannee River, Georgia. 1. Minor structures. *Environ. Sci. & Technol.* **29**, 393-398 (1995).
87. Leenheer, J.A., Wershaw, R.L. & Reddy, M.M. Strong-acid, carboxyl-group structures in fulvic acid from Suwannee River, Georgia. 2. Major structures. *Environ. Sci. & Technol.* **29**, 399-405 (1995).
88. Morra, M.J., Fendorf, S.E. & Brown, P.D. Speciation of sulfur in humic and fulvic acids using X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy. *GCA* **61**, 683-688 (1997).
89. SSSA. *Interactions of soils minerals with natural organics and microbes* (SSSA special publication, n° 17, Madison, USA, 1989).
90. Buffle, J. in *Metal Ions in Biological Systems, vol. 18, Circulation of Metals in the Environment* (eds. Sigel, H.) (Dekker, New-York, 1984).
91. Saar, R.A. & Weber, J.H. Fulvic acid : Modifier of metal-ion chemistry. *Environ. Sci. Technol.* **16**, 510A-517A (1982).
92. Saar, R.A. & Weber, J.H. Comparison of spectrofluorometry and ion selective electrode potentiometry for determination of complexes between fulvic acid and heavy metal ions. *Anal. Chem.* **52**, 2095-2100 (1980).
93. Benedetti, M.F., Milne, C.J., Kinniburgh, D.G., Van Riemsdijk, W.H. & Koopal, L.K. Metal ion binding to humic substances: application of the non-ideal competitive adsorption model. *Env. Sci. & Technol.* **29**, 446-457 (1995).
94. De Wit, J.C.M., Van Riemsdijk, W.H. & Koopal, L.K. Proton binding to humic substances. 1. Electrostatic effects. *Env. Sci. & Technol.* **27**, 2005-2014 (1993).
95. Bryan, N.D., *et al.* Metal-humic interactions: a random structural modelling approach. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **61**, 805-820 (1997).
96. Schnitzer M. Relations between fulvic acid, a soil humic compound and inorganic soil constituents. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **33**, 75-81 (1969).
97. Schnitzer M, S.S.I.M. Organo-metallic interactions in soils : 4. Carboxyl and hydroxyl groups in organic matter and metal retention. *Soil science* **99**, 278-284 (1995).
98. Boyd, S.A., Sommers, L.E. & Nelson, D.W. Copper(II) and iron (III) complexation by the carboxylate group of humic acid. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* **45**, 1241-1242 (1981).
99. Piccolo, A. & Stevenson, F.J. Infrared spectra of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  complexes of soil humic substances. *Geoderma* **27**, 195-208 (1982).
100. Sposito, G., Holtzclaw, K.M. & Baham, J. Analytical properties of the soluble, metal complexing fractions in sludge-soil mixtures: II. Comparative structural chemistry of fulvic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **40**, 691-697 (1976).

101. Boyd, S.A., Sommers, L.E. & Nelson, D.W. Infrared spectra of sewage sludge fraction: Evidence for an amide metal binding site. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **43**, 893-899 (1979).
102. Schnitzer, M. & Khan, S.U. *Soil Organic Matter* Amsterdam, 1978).
103. Senesi, N., M., G.S. & Schnitzer, M. Binding of  $\text{Fe}^{3+}$  by humic materials. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**, 969-976 (1977).
104. Xia, K., Bleam, W. & Helmke, P.A. Studies of the nature of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  binding sites in soil humic substances using X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**, 2211-2221 (1997).
105. Milne, C.J., Kinniburgh, D.G., De Wit, J.C.M., Van Riemsdijk, W.H. & Koopal, L.K. Analysis of metal-ion binding by a peat humic acid using a simple electrostatic model. *J. Coll. Interf. Sci.* **175**, 448-460 (1995).
106. Almendros, G., *et al.* CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR study of lignin preparations from wheat straw transformed by five lignocellulose-degrading fungi. *J. Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1297-1302 (1992).
107. Baes, C.F. & Mesmer, R.E. *The hydrolysis of cations* (Wiley, 1976).
108. Almendros, G. Sorptive interactions of pesticides in soils treated with modified humic acids. *European J. Soil Sci.* **46**, 287-301 (1995).
109. Kubicki, J.D., Itoh, M.J., Schroeter, L.M. & Apitz, S.E. Bonding mechanisms of salicylic acid adsorbed onto illite clay: an ATR-FTIR and molecular orbital study. *Environ. Science Technol.* **1151-1156**, (1997).
110. Hargé, J.-C. *Spéciation comparée du zinc, du plomb et du manganèse dans des sols contaminés* (Joseph Fourier, Grenoble, 1997).
111. Davis J A, L.J.O. Effect of adsorbed complexing ligands on trace metal uptake by hydrous oxides. *Env. Sci. & Technol.* **12**, 1309-1315 (1978).
112. Lovgren, L. Complexation reactions of phthalic acid and aluminium(III) with the surface of goethite. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **55**, 3639-3645 (1991).
113. Glaus M A, H.W., Van Loon L R. Stability of mixed-ligand complexes of metal ions with humic substances and low molecular weight ligands. *Environ. Sci. & Technol.* **29**, 2150-2153 (1995).
114. Nylander W. Les lichens du jardin du Luxembourg. *Bull. Soc. Bot. France* **13**, 364-372 (1866).
115. Garty, J. in *Plants as biomonitors* (eds. Markert, B.) 193-264 (VCH, Weinheim, 1993).
116. Friedman, E.I. Endolithic microorganisms in the antarctic cold desert. *Science* **215**, 1045-1053 (1982).
117. Gombert, S. & Asta, J. The effect of refuse incinerator fumes on the lead and cadmium content of experimentally exposed corticolous lichens. *Water, air and soil pollution sous presse*, (1997).

118. Carignan J, G.C. Isotopic composition of epiphytic lichens as a tracer of the sources of atmospheric lead emissions in southern Quebec, Canada. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **59**, 4427-4433 (1995).
119. Nimis, P.L., Castello, M. & Perotti, M. in *Plants as biomonitors* (eds. Markert, B.) 265-284 (VCH, Weinheim, 1993).
120. Nimis, P.L. Radiocesium in plants of forest ecosystems. *Studia Geobotanica* **15**, 19-21 (1996).
121. Crête, M., Lefebvre, M.A., Zikovsky, L. & Walsh, P. Cadmium, lead, mercury and <sup>137</sup>cesium in fruticose lichens of northern Quebec. *Sci. Tot. Env.* **121**, 217-230 (1992).
122. Henderson, A. Literature on air pollution and lichens XLII. *Lichenologist* **27**, 395-404 (1995).
123. Déruelle, S. La fiabilité des lichens comme bioindicateurs de la pollution plombique. *Ecologie* **27**, 285-290 (1996).
124. Baker, A.J.M. & Brooks, R.R. *Biorecovery* **1**, 81 (1989).
125. Watanabe, M.E. Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environ. Science Technol.* **31**, 182A-186A (1997).
126. Salt, D.E., *et al.* Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* **13**, 468-474 (1995).
127. Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V., Motto, H. & Raskin, I. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1232-1238 (1995).
128. Haas, J.R., Bailey, E.H. & Purvis, O.W. *Bioaccumulation of aqueous uranium by lichens: the influence of surface phosphate groups on short-term uptake and release* (Tucson, Arizona, 1997).
129. Richardson, D.H.S., Shore, M., Hartree, R. & Richardson, R.M. The use of X-ray fluorescence spectrometry for the analysis of plants, especially lichens, employed in biological monitoring. *The Science of the Total Environment* **176**, 97-105 (1995).
130. Caniglia, G., Calliari, I., Celin, L. & Tollardo, A.M. Metal determination by EDXRF in lichens. *Biological Trace Elements Research* 213-221 (1994).
131. Jones, D., Wilson, M.J. & Laundon, J.R. Observations on the location and form of lead in *Stereocaulon vesuvianum*. *Lichenologist* **14**, 281-286 (1982).
132. Garty, J., Galun, M. & Kessel, M. Localisation of heavy metals and other elements accumulated in the lichen thallus. *New phytologist* **82**, 159-168 (1979).
133. Hunter, D.B., Clark, S.B. & Bertsch, P.M. Uptake and metabolism of metals by aquatic plants determined by synchrotron X-ray absorption micro-analysis. *Agron. Abstr.* 256 (1994).
134. Purvis, O.W. The occurrence of copper oxalate in lichens growing on copper sulphide-bearing rocks in Scandinavia. *Lichenologist* **16** (2), 197-204 (1984).

135. Edwards, H.G.M., Russell, N.C. & Seaward, M.R.D. Calcium oxalate in lichen biodeterioration studied using FT-Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta, part A* **53**, 99-105 (1997).
136. Farago, M.E. in *Plants and the chemical elements* (eds. Farago, M.E.) 266-283 (VCH, Weinheim, 1994).
137. Goyal R, S.M.R.D. Metal uptake in terricolous lichens, III. Translocation in the thallus of *Peltigera Canina*. *New Phytologist* **90**, 85-98 (1982).
138. Richardson, D.H.S. Metal uptake in lichens. *Symbiosis* **18**, 119-127 (1995).
139. Richardson, D.H.S. *Pollution monitoring with lichens* (Richmond Publishing, Slough, England, 1992).
140. Nash, T.H. in *Metal tolerance in plants: Evolutionary aspects* (eds. Shaw, A.J.) 119-131 (CRC Press, Boca Raton, 1989).
141. Tyler, G. Uptake, retention and toxicity of heavy metals in lichens, a brief review. *Water, Air and Soil Pollution* **47**, 321-333 (1989).
142. Johnsen, I. *Silva Fennica* **4**, 444-445 (1981).
143. Mench, M. & al, e. *Rapport d'activité pour le ministère de l'environnement, DRAEI, Comité sols et déchets* (1993).
144. Nieboer, E., Richardson, D.H.S. & Tomassini, F.D. Mineral uptake and release by lichens: an overview. *Bryologist* **81**, 226 (1978).
145. Wilson, M.J. Interactions between lichens and rocks; a review. *Crypt. Bot.* **5**, 299-305 (1995).
146. Chishlom, J.E., Jones, G.C. & Purvis, O.W. Hydrated copper oxalate, moolooite, in lichens. *Mineralogical Magazine* **51**, 715-718 (1987).
147. Wilson, M.J. & Jones, D. The occurrence and significance of manganese oxalate in *Pertusaria corallina*. *Pedobiologia* **26**, 373-379 (1984).
148. Murphy, R.T. & Levy, J.F. Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **81**, 165-168 (1983).
149. Gadd, G.M. Tansley Review No. 47: Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist* **124**, 25-60 (1993).
150. Brown, M.T. & Hall, I.R. in *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects* (eds. Shaw, A.J.) 95-104 (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990).
151. Huneck, S. & Yoshimura, I. *Identification of lichen substances* (Springer Verlag, Berlin, 1996).
152. Van Haluwyn, C. & Lerond, M. *Guide des lichens* (Editions Lechevalier, Paris, 1993).
153. Silberstein, L., Siegel, B.Z., Siegel, S.M., Mukhtar, A. & Galun, M. Comparative studies on *Xanthoria parietina*, a pollution-resistant lichen, and *Ramalina duriaei*, a sensitive species. II. Evaluation of possible air pollution-protection mechanisms. *Lichenologist* **28** (4), 367-383 (1996).

154. Purvis, O.W., Elix, J.A. & Gaul, K.L. The occurrence of copper psoromic acid in lichens from cupriferous substrata. *Lichenologist* **22**, 345-354 (1990).
155. Purvis, O.W., Elix, J.A., Broomhead, J.A. & Jones, G.C. The occurrence of copper-norstictic acid in lichens from cupriferous substrata. *Lichenologist* **19**(2), 193-203 (1987).
156. Verkleij, J.A.C. & Schat, H. in *Metal tolerance in plants: Evolutionary aspects* (eds. Shaw, A.J.) 179-193 (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989).
157. Robinson, N.J. in *Metal tolerance in plants: Evolutionary aspects* (eds. Shaw, A.J.) 195-214 (CRC Press, Boca Raton, 1989).
158. Pollard, A.J. & Baker, A.J.M. The quantitative genetics of zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* **132**, 113-118 (1996).
159. Murphy, A. & Taiz, L. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten Arabidopsis ecotypes, correlation with copper tolerance. *Plant physiology* **109**, 945-954 (1995).
160. Ou L T, J.W., Thomas J E. Degradation and metaolism of tetraethyllead in soils. *J. Indust. Microbiol.* **14**, 312-318 (1995).
161. Ou L T, T.J.E., Jing W. Biological and chemical degradation of tetraethyl lead in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**, 238-245 (1994).
162. Bergmeyer, H.U. *Methods of enzymatic analysis* (Verlag Chemie, Weinheim, 1974).
163. Giordano, T.H. & Drummond, S.E. The potentiometric determination of stability constants for zinc acetate complexes in aqueous solutions to 295°C. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **55**, 2401-2415 (1991).
164. Giordano, T.H. Anglesite (PbSO<sub>4</sub>) solubility in acetate solutions : The determination of stability constants for lead acetate complexes to 85°C. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **53**, 359-366 (1989).
165. Smith, R.M. & Martell, A.E. *Critical Stability Constants* (Plenum Press, New-York, 1982).
166. Reed, A.T. & Karipides, A. The crystal structure of S-Malatodiaquozinc(II) hydrate. *Acta Cryst.* **B32**, 2085 (1976).
167. Boyle, A.P., McCarthy, P.M. & Stewart, D. Geochemical control of saxicolous lichen communities on the Creggaun Gabbro, Letterfrack, Co. Galway, Western Ireland. *Lichenologist* **19**, 307-317 (1987).
168. Allen, M.F., Figuerona, C., Weinbaum, B.S., Barlow, S.B. & Allen, E.B. Differential production of oxalate by mycorrhizal fungi in arid ecosystems. *Biol. Fertil. Soils* **22**, 287-292 (1996).
169. Pompe, S., *et al.* A comparison of natural humic acids with synthetic humic acid model substances: Characterisation and interaction with Uranium(VI). *Radiochimica Acta preprint*, (1996).

170. Watanabe, M.E. *Environ. Science Technol.* **31**, 187A (1997).
171. Brown, I.D. & Altermatt, D. Bond-valence obtained from a systematic analysis of the inorganic crystal structure database. *Acta Cryst.* **B41**, 244-247 (1985).
172. Bargar, J.R., Towle, S.N., Brown, G.E. & Parks, G.A. XAFS and bond valence determination of the structures and compositions of surface functional groups and Pb(II) and Co(II) sorption products on single crystal  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Journal of colloid and interface science* **185**, 473-492 (1997).
173. Garner, C.D., Collison, D. & Pidcock, E. The nature of the coordination sites of transition metals in proteins. *Phil Trans Roy Soc London A* **354**, 325-357 (1996).
174. Shu L, C.Y., Orville A M, Miller M A, Lipscomb J D, Que L. X-ray absorption spectroscopic studies of the Fe(II) active site of catechol 2,3-dioxygenase. Implications for the extradiol cleavage mechanism. *Biochemistry* **34**, 6649-6659 (1995).
175. Kroll, H., *et al.* Simulation of crystal structures by a combined distance-least-squares/-valence-rule method. *Z. Krist.* **199**, 49-66 (1992).
176. Sarret, G., Manceau, A., Hazemann, J.L., Gomez, A. & Mench, M. EXAFS study of the nature of zinc complexation sites in humic substances as a function of Zn concentration. *J. Phys. IV France* **7**, C2-799-C2-802 (1997).

THESE DE DOCTORAT  
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

Titre de l'ouvrage:

**BIOGEOCHIMIE STRUCTURALE DU ZINC ET DU  
PLOMB PAR SPECTROSCOPIE EXAFS:  
INTERACTIONS AVEC DES ACIDES HUMIQUES, DES PAROIS  
CELLULAIRES DE CHAMPIGNON, ET DES LICHENS**

Auteur: **Géraldine SARRET**

Etablissement: **Observatoire de Grenoble  
Laboratoire de Géophysique Interne et  
Tectonophysique**

**RESUME**

Le risque écotoxicologique des métaux présents dans le milieu naturel dépend beaucoup plus de leur statut physico-chimique que de leur concentration totale. Afin de déterminer ce statut, nous avons étudié par spectroscopie EXAFS les interactions au niveau moléculaire du zinc et du plomb avec différents systèmes naturels organiques: des acides humiques (AH), constituants de la matière organique des sols; des parois cellulaires de champignons filamenteux, utilisés comme biosorbants pour le traitement d'eaux chargées en métaux; et des lichens, utilisés comme bioindicateurs de pollution.

- Pour les deux métaux étudiés, les AH possèdent une distribution de sites d'affinités différentes. Les ligands majoritaires sont des groupements carboxyles monodentates et des molécules d'eau, la proportion de molécules d'eau augmentant quand l'affinité du site diminue. Pour le zinc, les sites de plus faible affinité forment des complexes de sphère externe, où le métal est solvate par 6 molécules d'eau, et lié aux groupements fonctionnels des AH par des liaisons faibles.

- Les parois cellulaires du champignon *Penicillium chrysogenum* possèdent deux sites de complexation pour Zn et Pb: environ 90% sont des groupements phosphate, constituant les sites de plus haute affinité pour Zn, et 10% sont des groupements carboxyle, constituant les sites de plus haute affinité pour Pb.

- Dans le lichen hyperaccumulateur *Diploschistes muscorum*, Zn et Pb sont immobilisés sous forme de sels d'oxalate. Il s'agit d'un mécanisme physiologique adaptatif, qui n'existe pas chez les espèces tolérantes: dans *Cladonia subulata*, le zinc est complexé par un acide organique moins fort complexant que l'oxalate, probablement le malate; dans *Xanthoria parietina*, le plomb est piégé de façon passive par complexation sur les macromolécules de la paroi cellulaire des filaments fongiques. L'étude de ces trois systèmes a permis d'évaluer le potentiel et les limites de la spectroscopie d'absorption X pour l'étude des systèmes organiques naturels. Elle ouvre des perspectives intéressantes dans le domaine du traitement biologique des pollutions métalliques, comme la phytoremédiation ou la bioremédiation.

**MOTS-CLES**

spéciation - EXAFS - zinc - plomb - biosorption -  
complexation - bioindication - hyperaccumulation - tolérance