



HAL
open science

Modélisation et évaluation des équilibres de complexation entre la matière organique naturelle, les métaux traces et le proton. Applications aux eaux naturelles

Cédric Garnier

► **To cite this version:**

Cédric Garnier. Modélisation et évaluation des équilibres de complexation entre la matière organique naturelle, les métaux traces et le proton. Applications aux eaux naturelles. Autre. Université du Sud Toulon Var, 2004. Français. NNT : . tel-00009140

HAL Id: tel-00009140

<https://theses.hal.science/tel-00009140>

Submitted on 29 Apr 2005

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.

UNIVERSITE DU SUD TOULON VAR

THESE

pour obtenir le grade de:

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DU SUD TOULON VAR

Discipline:

CHIMIE – Chimie fine, chimie analytique, chimie de l'environnement marin

**MODELISATION ET EVALUATION DES EQUILIBRES DE
COMPLEXATION ENTRE LA MATIERE ORGANIQUE
NATURELLE, LES METAUX TRACES ET LE PROTON.
APPLICATIONS AUX EAUX NATURELLES**

Cédric GARNIER

soutenue le 12 juillet 2004 à l'Université du Sud Toulon Var, devant la commission d'examen:

J.Y. BENAÏM	Professeur	Université du SUD Toulon Var	Directeur de thèse
D. COSSA	Chercheur (HDR)	IFREMER Nantes	Examinateur
P. LE CORRE	Professeur	Université de Bretagne Occidentale	Examinateur
Y. LUCAS	Professeur	Université du SUD Toulon Var	Examinateur
I. PIŽETA	Professeur	Ruđer Bošković Institute (Croatie)	Rapporteur
M. WARTEL	Professeur	Université des Sciences et Technologies de Lille	Rapporteur

à Véro et à ma famille
à papy

REMERCIEMENTS:

Ce travail de thèse n'aurait pu avoir lieu sans l'appui d'un grand nombre de personnes que je vais tâcher de remercier ici, en espérant ne pas oublier trop de monde.

Je tiens à remercier tout d'abord le professeur J.Y. Benaïm pour m'avoir accueilli à Toulon, au sein du laboratoire RCMO, et m'avoir dirigé au cours de ces 4 années de thèse. Ses conseils et son expérience ont toujours été d'une aide précieuse.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, le Dr. D. Cossa, le Pr. P. Le Corre, le Pr. I. Pižeta et le Pr. M. Wartel.

Je remercie également l'ensemble des membres du laboratoire PROTEE, et son directeur, Yves Lucas, pour m'avoir permis de réaliser mes travaux dans les meilleures conditions possibles.

Ainsi, j'adresse mes remerciements, dans le désordre, à Rudy Nicolau, Nathalie Patel-Sorrentino, Pascal Brun, Claude Benamou, Sandrine Huclier, Olivia Darcheville, Christophe Le Poupon, Annick Ortalo-Magné, Gérald Culioli, Annie Praud-Tabaries, Mohamed El Hattab, Claire Germain, les physiciens et les biologistes de PROTEE, et pour certains d'entre eux leurs familles que j'ai eu l'occasion d'apprécier.

Je remercie Stéphane Mounier, d'abord en sa qualité de co-directeur de thèse pour les nombreuses discussions que nous avons eu, souvent acharnées et pas toujours sur des sujets scientifiques... mais surtout car il a été pour moi beaucoup plus proche d'un frère que d'un collègue. Par la même j'en profite pour remercier Sophie et les p'tits Mounier, que j'ai vu grandir et avec qui j'ai passé tellement de bons moments, ainsi que la famille Mounier en général qui a su m'accueillir à de nombreuses reprises.

Je remercie Gérard et Dominique Fevrier pour m'avoir accueilli à bras ouverts dans cette région que je ne connaissais pas. J'ai passé tellement de bons moments à Collobrières, Cargues ou encore Mars, que je ne saurais les dénombrer, et évidemment encore moins les oublier. Merci de m'avoir permis à maintes reprises de me défouler, de me divertir, ou encore de compléter mes connaissances culinaires... Vous resterez toujours pour moi la famille qui me manquait dans le Sud.

Au cours de trois années de monitorat et d'une année d'ATER, j'ai eu l'occasion d'apprécier les services du secrétariat de l'UFR Sciences et de la reprographie, qu'ils en soient ici remerciés. Je remercie également les « habitants » du bâtiment U, et plus particulièrement Laure Agostini, Pascale Giraudet, Hervé Glotin, Vincent Fevrier.

Merci également à Pierre Seppecher pour la patience qu'il a eu envers les chimistes que nous sommes, et nos problèmes à répétition...

Merci à mes étudiants de DEUG, Licence et Maîtrise qui m'ont supporté alors que je n'avais pas toujours beaucoup de temps à leur consacrer.

Après un séjour à Zagreb et de très nombreuses discussions, je voudrais remercier l'équipe du Pr. G. Kniewald, et plus particulièrement Ivanka Pižeta auprès de qui j'ai pu approfondir mes connaissances de l'électrochimie et entamer des travaux très intéressants, qui j'espère pourront être poursuivis.

Je souhaite également remercier les chercheurs de l'IFREMER, et plus particulièrement Jean Louis Gonzalez, Bernard Boutier et Bénédicte Thouvenin.

Merci à ... mon bureau... où j'ai passé de très nombreuses heures, souvent jusque tard le soir, le weekend ou encore les jours fériés... Tant qu'à faire, merci à mon ordinateur de ne pas avoir claqué avant la fin de cette thèse.

Enfin, mes attentions se portent vers ma très grande famille qui m'a soutenu tout au long de cette thèse, le plus souvent « à distance » faute de l'éloignement, mais qui par ses encouragements a été indispensable au bon déroulement de cette thèse. Merci également à la famille Lenoble !

Pour finir, merci à Véro, pour tout !

TABLE DES MATIERES:

LISTE DES ABREVIATIONS	6
AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION	8
CHAPITRE I/ LES METAUX TRACES DANS L'ENVIRONNEMENT – ROLE DE LA MATIERE ORGANIQUE NATURELLE	10
I.A/ Généralités	10
I.B/ Spéciation des métaux traces	10
I.C/ Origine, nature, propriétés et rôle de la Matière Organique Naturelle (MON) dissoute	12
I.C.1/ Origine de la MON	12
I.C.2/ Composition de la MON	13
I.C.3/ Etude des propriétés de la MON	14
a/ Analyse globale de la MON	14
b/ Fractionnement préalable de la MON en groupes de composés	14
I.C.4/ Rôle de la MON vis-à-vis de la spéciation des métaux traces	15
I.D/ Analyse et modélisation des propriétés de complexation et d'acidité de la MON	15
I.D.1/ Analyse	15
a/ Les techniques non séparatives	16
a.1/ Les techniques électrochimiques – voltamétrie et potentiométrie	16
a.2/ La spectroscopie de fluorescence	17
b/ Les techniques séparatives	18
b.1/ La DGT (Diffusive Gradient in Thin film)	18
b.2/ Les autres techniques séparatives	18
I.D.2/ Modélisation des propriétés de complexation et d'acidité de la MON	18
CHAPITRE II/ MODELISATION DES INTERACTIONS MON - METAUX TRACES ET PROTON	20
II.A/ Problématique	20
II.B/ Représentation des propriétés de la MON – les différentes approches	21
II.B.1/ Approche continue	22
II.B.2/ Approche discrète	23
II.C/ Modélisation discrète des propriétés de la MON – concept de <i>quasi-particules</i>	24
II.C.1/ Concept de <i>quasi-particules</i>	24
II.C.2/ Utilisation des <i>quasi-particules</i> – définition du <i>chimio-type</i>	26
II.D/ Optimisation de paramètres de complexation et d'acidité	27

II.D.1/ Calcul couplé MINEQL-MultiSimplex	28
II.D.2/ Développement de <i>PROSECE</i> : PRogramme d'Optimisation et de SpÉciation Chimique dans l'Environnement	28
a/ Objectifs	28
b/ Fonctionnement général	29
c/ Module de calcul de la spéciation chimique	29
c.1/ Composants, composés et réactions d'équilibres	29
c.2/ Tableau des équilibres	30
c.3/ Equations	31
c.4/ Résolution du système chimique	31
c.5/ Autres algorithmes de calcul de spéciation	32
d/ Module d'optimisation des paramètres de complexation, d'acidité, ...	33
d.1/ Méthode du simplex	33
d.2/ Algorithme d'optimisation utilisé par <i>PROSECE</i>	34
e/ Synopsis du fonctionnement de <i>PROSECE</i>	35
II.E/ Comparaison théorique de <i>PROSECE</i> à d'autres traitements mathématiques de données de complexation	37
II.E.1/ Problématique - objectifs	37
II.E.2/ Simulation des points "expérimentaux"	38
II.E.3/ Techniques de traitement de données	41
II.E.4/ Résultats obtenus	41
a/ Systèmes à un ligand:	41
a.1/ Titration linéaire	43
a.2/ Titrations logarithmique et décade	44
a.3/ Conclusions	44
b/ Systèmes à deux ligands	45
b.1/ Titration linéaire	49
b.2/ Titration logarithmique	49
b.3/ Titration décade	50
b.4/ Influence de la distribution aléatoire du bruit	51
b.5/ Possibilité de prédire l'erreur sur un paramètre – utilité des graphiques contours	52
b.6/ Etude de la variation de l'écartype sur la mesure de M_f au cours d'une titration logarithmique - modélisation de la variation du bruit aléatoire à ajouter à des expériences simulées	57
II.E.5/ Conclusions de cette étude théorique	58
II.F/ Etude théorique de la détermination de propriétés de complexation de systèmes mono- et multi-ligands mono- et poly-dentates	58
II.F.1/ Problématique - objectifs	58
II.F.2/ Systèmes chimiques étudiés – simulation des expériences	59
a/ Systèmes chimiques étudiés	59
b/ Expériences simulées – modèles de complexation	60
b.1/ Cas I – systèmes mono-ligand mono- et bi-dentates	60
b.2/ Cas II – systèmes multi-ligands mono- et bi-dentates	61
b.3/ Cas III – systèmes multi-ligands mono-, bi-dentates et mixtes	61
b.4/ Ajout de bruit aléatoire aux données simulées	61
II.F.3/ Résultats obtenus	62

CHAPITRE III/ TECHNIQUES D'ANALYSE UTILISEES POUR ETUDIER LES INTERACTIONS MON - METAUX TRACES ET PROTON	64
III.A/ Généralités	64
III.B/ Analyse des métaux traces par une technique électrochimique, la DPASV	64
III.B.1/ Considérations générales sur les techniques électrochimiques par redissolution	65
III.B.2/ Principe de fonctionnement de l'ASV	66
a/ La cellule de mesure et les électrodes	66
b/ Etape de dépôt – préconcentration	67
c/ Etapes de repos et de redissolution	69
III.B.3/ Mesure par DPASV des concentrations en métaux traces	69
a/ Notion de labilité électrochimique – définition de la spéciation chimique	70
b/ Procédure de détermination des concentrations totales en métaux	71
b.1/ Appareillage utilisé	71
b.2/ Développement d'une procédure analytique spécifique à la mesure des traces	72
b.3/ Présentation des voltamogrammes	73
b.4/ Traitement des voltamogrammes	75
III.C/ Analyse des interactions MON-métaux	76
III.C.1/ Mise au point de l'appareillage pour les titrations en mode logarithmique	77
III.C.2/ Développement d'une procédure analytique adéquate	79
a/ Mesure par DPASV des concentrations en métaux labiles	79
b/ Modification de l'appareillage de mesure	80
III.C.3/ Traitement mathématique des voltamogrammes	82
a/ Simulation de la ligne de base des voltamogrammes	82
b/ Déconvolution des pics de DPASV:	83
b.1/ Fonction gaussienne	83
b.2/ Fonction de <i>Kambara</i>	84
b.3/ Fonction en $1/\cosh^2$	85
III.D/ Analyse des interactions MON-proton par potentiométrie	87
III.D.1/ Appareillage utilisé – procédure analytique	88
III.D.2/ Traitement des données expérimentales	89
CHAPITRE IV/ APPLICATIONS A DES SYSTEMES NATURELS	93
IV.A/ Détermination d'une distribution de ligands modélisant les propriétés de complexation de l'Acide Fulvique Suwannee River (AFSR) à l'aide de titrations en mode logarithmique	93
IV.A.1/ Problématique	93
IV.A.2/ Matériels et méthodes	94
a/ Matériel	94
b/ Réactifs	94
c/ Procédures Analytiques	94
IV.A.3/ Traitement des voltamogrammes - Modélisation des propriétés de complexation	95

IV.A.4/ Résultats et discussion	97
a/ Analyse des titrations logarithmiques d'AFSR par Cd et Pb	97
b/ Modélisation de la complexation d'AFSR	97
IV.A.5/ Conclusions	100
IV.B/ Etude des propriétés d'acidité de MON issues de La Seine (programme Seine Aval2)	101
IV.B.1/ Contexte – Problématique	101
IV.B.2/ Sites de prélèvement	102
IV.B.3/ Matériel et méthodes	103
a/ Carbone organique dissous et particulaire	103
b/ Spectroscopie de fluorescence	103
c/ Titrations acido-basiques	105
d/ Modélisation des propriétés d'acidité des MON	105
IV.B.4/ Résultats et discussion	106
a/ Carbone organique	106
b/ Titrations acido-basiques	107
c/ Spectroscopie de fluorescence	108
d/ Chlorophyll A et phaeo-pigments	110
e/ Modélisation des propriétés d'acidité	111
IV.B.5/ Conclusions	113
IV.C/ Influence de la teneur en carbone organique dissous sur la modélisation des propriétés d'acidité des matières organiques naturelles	114
IV.B.1/ Problématique	114
IV.C.2/ Expériences	115
a/ Matières organiques naturelles et réactifs	115
b/ Titrations potentiométriques	115
c/ Modélisation des données expérimentales: <i>PROSECE</i>	116
IV.C.3/ Résultats et discussion	116
a/ Titrations des solutions concentrées d'AFLR et AHLR	116
b/ Titrations des solutions diluées d'AFLR et AHLR	118
c/ Titrations des solutions modèles d'acétate de sodium et de phénol	119
d/ Titrations des échantillons naturels	120
IV.C.4/ Conclusions	121
IV.D/ Evolution de <i>PROSECE</i> : adaptation au fitting de courbes de quenching de fluorescence	122
IV.D.1/ Problématique	122
IV.D.2/ Mise en place du système chimique – évolution de <i>PROSECE</i>	124
a/ Définition du système chimique	124
b/ Modification de l'algorithme d'optimisation de <i>PROSECE</i>	125
IV.D.3/ Exemples de modélisation	127
a/ Expérience simulée à 2 ligands de type (α)	127
b/ Quenching de fluorescence sur une MON	128
IV.D.4/ Conclusions	130
IV.E/ Analyse des propriétés de complexation et d'acidité de MON issues d'eaux côtières	130
IV.E.1/ Contexte – Objectifs	130
IV.E.2/ Prélèvement du 10/03/04 – Bassin d'Arcachon	131
a/ Concentration sur nano-membrane de la MON	131

b/ Etudes chimiques de l'échantillon osmosé	132
b.1/ Concentrations en majeurs	132
b.2/ Propriétés d'acidité –titrations acido-basiques	133
b.3/ Titrations logarithmiques des propriétés de complexation	134
b.3.1/ Expériences réalisées	134
b.3.2/ Traitement des voltamogrammes	135
b.3.3/ Analyse des résultats obtenus	137
IV.E.3/ Analyse critique des résultats obtenus, évolutions expérimentales et analytiques à prévoir	140
CONCLUSION GENERALE	142
LISTE DES ANNEXES	145
ANNEXES	146
LISTE DES FIGURES	184
LISTE DES TABLEAUX	188
BIBLIOGRAPHIE	190

LISTE DES ABREVIATIONS:

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy (GF- : Graphit Furnace)
AF	Acide Fulvique (-LR : Laurentian River, -SR : Suwannee River)
AH	Acide Humique (-LR : Laurentian River, -SR : Suwannee River)
ASV	Anodic Stripping Voltammetry (DP-: Differential Pulse)
C_i	<i>composant principal</i>
C_L	capacité complexante
COD	Carbone Organique Dissous
CSV	Cathodic Stripping Voltammetry
DGT	Diffusive Gradient in Thin film
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
H_T	concentration totale en protons
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
I_a	intensité du fluorophore A
I_c	intensité du fluorophore C
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
ISE	Ionic Selective Electrode
K_i ou K_{iM}	constante de complexation (le plus souvent d'un complexe 1:1 métal-ligand i)
K_{iH}	constante d'acidité d'un ligand i
K'_i	constante de complexation d'un complexe bi-dentate avec un ligand i
K_{ij}	constante de complexation d'un complexe mixte entre un métal M et deux ligands i et j
L	ligand
L_T	concentration totale en ligands
L_{iT}	concentration totale du ligand i
MO	Matière Organique
MON	Matière Organique Naturelle
M	Métal (Cd, Pb, Cu, ...)
M_f	concentration en métal M libre (i.e. M^{n+})
M_T	concentration totale en métal M
M_{labile}	concentration en métal M labile
ML	complexe 1:1 M-L
pM	$-\log(M)$
PROSECE	PRogramme d'Optimisation et de SpEciation Chimique dans l'Environnement
QP	<i>quasi-particule</i>
$R_{a,c}$	rapport de I_a sur I_c
S_j	<i>composé</i>

AVANT-PROPOS:

Ce travail de thèse s'intègre dans une collaboration entre les laboratoires RCMO/PROTEE de l'Université du Sud Toulon Var et DEL/PC d'IFREMER, collaboration qui a été consolidée par différents programmes de recherche, dans lesquels ces deux laboratoires sont partie prenante, tels que Seine Aval 2, EcoDyn (Toulon) ou encore le GDR MONALISA.

Seine Aval est un programme d'études et de recherches interdisciplinaires appliquées à l'estuaire de La Seine. Initié en 1995, il rassemble plus d'une centaine de scientifiques, dans des disciplines diverses (biologie, chimie, écologie, géologie, océanographie, ...), en vue de comprendre et de modéliser le fonctionnement biogéochimique de l'estuaire.

Répondant à un appel d'offre national sur l'action thématique "Écotoxicologie et Écodynamique des Contaminants", le projet EcoDyn proposé par le laboratoire PROTEE, en association avec différents partenaires (DEL/PC IFREMER ; LPTC Université de Bordeaux 1 ; LCE Université de Provence, Ruđer Bošković Institute), consiste en une "étude intégrée des transferts de contaminants et de leur impact en milieu côtier méditerranéen". Ayant pour site l'aire toulonnaise, ce projet a pour principal objectif l'étude de la dynamique des contaminants métalliques depuis les bassins versants continentaux vers les eaux côtières.

L'objectif scientifique du Groupement De Recherche MONALISA (Matière Organique Naturelle en milieu Salé) est de comprendre le rôle de la matière organique naturelle (MON) dans le cycle des contaminants, de caractériser la MON d'eaux côtières (nature et structure) et de mettre en relation ses caractéristiques avec ses propriétés complexantes à l'égard des contaminants. Les données obtenues contribueront à l'évaluation et la prévision de la biodisponibilité des contaminants. Dans ce but, des équipes issues de différentes disciplines (biologistes, chimistes, géochimistes, physiciens et modélisateurs) ont été regroupées autour de cette thématique.

Au sein de ces programmes de recherche, l'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les interactions de la matière organique naturelle (MON) vis-à-vis du proton et des métaux traces, et plus spécifiquement du cadmium, afin d'obtenir des paramètres de complexation quasi-thermodynamiques, intégrables aux logiciels de spéciation chimique, et plus particulièrement au logiciel de transport de contaminant MOCO-SIAM3D développé par l'IFREMER.

Parallèlement à cette collaboration USTV-IFREMER, ce travail a été l'occasion de renforcer les échanges entre le laboratoire RCMO/PROTEE et le laboratoire dirigé par le Pr. Goran Kniewald au Ruđer Bošković Institute à Zagreb (Croatie), précédemment dirigé par le Pr. Marko Branica. Les chercheurs de ce laboratoire ont su au cours des 40 dernières années se spécialiser dans les techniques électrochimiques ainsi que dans l'étude de la spéciation chimique des métaux traces. Cette collaboration a donc été extrêmement bénéfique pour l'avancement de ce travail de thèse, notamment en ce qui concerne l'analyse des métaux traces par voltamétrie. Elle a également été à l'origine de différentes études théoriques, visant à améliorer, ou tout au moins à préciser, les limites des techniques de traitement de données couramment utilisées par la communauté scientifique pour caractériser les propriétés de complexation d'échantillons naturels.

Enfin, l'approche utilisée dans ce travail pour l'optimisation des paramètres simulant les propriétés de complexation d'échantillons naturels, n'aurait pu se faire sans l'aide de Pierre Seppecher, professeur de mathématique à l'USTV. En effet, une étude conjointe a conduit à l'élaboration d'un logiciel spécifique que nous avons nommé PROSECE: PRogramme d'Optimisation et de SpÉciation Chimique dans l'Environnement.

INTRODUCTION:

Dans les écosystèmes naturels, et plus particulièrement les eaux estuariennes ou côtières, la spéciation chimique dissoute des métaux traces est conditionnée par de nombreux paramètres physico-chimiques, voire biologiques, qui peuvent être soumis à des variations très importantes. Par exemple, les variations de salinité dans ces milieux naturels sont souvent fortes, aussi bien temporellement que spatialement, il en est donc de même de la concentration en chlorures. Or ces derniers forment avec les métaux des complexes, ils vont donc sensiblement influencer la spéciation et par conséquent la réactivité de ces éléments traces vis-à-vis du milieu. Pour autant, les associations entre les métaux et les chlorures, ou plus généralement l'ensemble des composés inorganiques, ont été caractérisées par des constantes thermodynamiques qui sont donc connues. Il n'en est pas de même des associations avec les molécules ou macro-molécules organiques constitutives de la matière organique naturelle (MON). Cette dernière est la résultante de divers processus de dégradation et d'apports d'origines allochtone, terrigène, anthropique, Elle a de ce fait un rôle particulier dans le cycle du carbone. De par ces origines variées, et les nombreuses transformations qu'elle subit au cours du temps, sa structure chimique est extrêmement complexe. Il en est donc de même des groupements fonctionnels qui caractérisent ses propriétés de complexation vis-à-vis des métaux traces et du proton. En outre, la concentration en MON étant souvent faible dans les milieux peu eutrophisés que sont les estuaires, l'étude des propriétés de la MON vis-à-vis des contaminants métalliques constitue donc un défi. De fait, de très nombreux travaux ont été réalisés sur cette thématique depuis plus de 50 ans, évoluant avec les améliorations techniques aussi bien analytiques qu'informatiques. Ainsi, diverses techniques analytiques ont été développées spécifiquement, ou tout au moins adaptées afin d'étudier les interactions de la MON avec ces éléments traces. Les concentrations naturelles de ces derniers, souvent inférieures à nmol.l^{-1} , constituent également une difficulté supplémentaire à l'étude de ces associations/dissociations. Parallèlement aux développements de techniques analytiques efficaces, différentes modélisations théoriques ont été envisagées. Elles ont abouti à l'élaboration de modèles plus ou moins complexes, permettant de représenter les différentes propriétés analysables de la MON et donc de simuler son comportement vis-à-vis des métaux. Toutefois, il n'est pas possible à l'heure actuelle de représenter par un unique modèle les propriétés de MON issues de milieux très différents, sans avoir recours à une étude plus poussée. En outre, suivant le mode de prélèvement/isolation utilisé, la ou les techniques analytiques employées, le modèle de complexation appliqué aux données expérimentales, voire même le logiciel de traitement de données utilisé, les résultats obtenus peuvent varier considérablement. Ceci constitue donc une limitation importante aux résultats acquis lors d'une étude, limitation dont il faut bien avoir conscience.

En ce sens, ce travail n'a pas pour objectif de fournir une modélisation exhaustive de la MON en général, ni même de proposer un protocole d'analyse et de modélisation utilisable dans tous les cas, objectif qui serait de toute façon beaucoup trop ambitieux. Il a donc été réalisé avec l'idée d'améliorer, ou pour le moins de faire évoluer des techniques spécifiques à l'analyse des interactions MON-métaux et MON-proton, en s'attachant à les rendre suffisamment précises et répétables pour obtenir des données expérimentales les plus fiables possible en vue de leur utilisation pour la modélisation. Parallèlement, il a semblé souhaitable de s'interroger sur le modèle chimique de complexation le plus efficace pour représenter la MON par des paramètres facilement utilisables pour la simuler. De même, en tenant compte des logiciels d'optimisation de paramètres de complexation actuellement disponibles, la question s'est posée de développer un programme spécifique, basé, pour le calcul de spéciation, sur ce qui a déjà été mis au point pour des logiciels couramment utilisés tels que MINEQL, CHESS, PHREEQC.... Ce

programme dispose en plus d'un algorithme d'optimisation spécifique à l'étude des propriétés très hétérogènes des MON, nécessitant de ce fait d'être représentées par un nombre suffisamment important de paramètres.

Ces différents objectifs ont ainsi délimité ce travail de recherche, qui s'est attaché non pas à étudier un très grand nombre d'échantillons naturels, mais plutôt à optimiser leur analyse. Il n'est donc pas étonnant que la proportion accordée à la modélisation et aux techniques d'analyse soit plus importante que celle décrivant leurs applications.

Dans un premier temps, une mise au point bibliographique a été faite, portant sur les notions de spéciation chimique des métaux traces dans l'environnement et plus spécialement dans la colonne d'eau, ainsi qu'au rôle particulier de la matière organique naturelle. Les techniques analytiques spécifiques à l'étude des interactions MON-métaux, et les modèles chimiques de complexation développés pour simuler ces interactions ont ensuite été abordés.

Après cette mise au point, la modélisation des propriétés de complexation et d'acidité de la MON a fait l'objet d'une étude plus approfondie qui a permis de mettre en place le modèle chimique choisi pour représenter la MON. Il devrait permettre de modéliser simultanément les équilibres de complexation entre la MON, les métaux traces et le proton, mais également de prendre en compte les phénomènes de compétition entre ces différents cations vis-à-vis des sites de la MON. Ce dernier point est rarement défini dans des études similaires car il complique notablement l'analyse et le traitement des données expérimentales, pour autant il semble indispensable pour interpréter correctement le comportement d'une MON. Une nouvelle technique de traitement de données non-linéaire a été développée pour paramétrer ce modèle de MON. En effet, compte tenu du modèle chimique défini, un grand nombre de paramètres de complexation et/ou d'acidité (constantes de stabilité et concentrations) doivent être déterminés. Or, peu de programmes de spéciation et d'optimisation actuellement disponibles permettent d'atteindre ce but. Cette nouvelle technique de traitement de données a été théoriquement comparée à celles couramment utilisées par la communauté scientifique, afin de préciser ces capacités.

Dans une seconde partie, des techniques analytiques potentiométriques et voltamétriques spécifiques ont été développées afin d'analyser les interactions entre la MON, le proton, le cadmium et le plomb. L'objectif principal a consisté à les adapter à l'observation de la plus large gamme de concentrations en sites acides et/ou complexants analysables sur des MON, en essayant de conserver une précision constante sur la fenêtre analytique balayée (en terme de valeurs de pH ou pM mesurées). Cette approche est nécessaire dans la mesure où l'on souhaite analyser le plus rigoureusement possible ces interactions, d'autant plus que les échantillons analysés sont issus de milieux naturels peu contaminés, i.e. à des concentrations en métaux et en MON très faibles.

Enfin, dans une dernière partie, les techniques d'analyse et de modélisation développées ont été utilisées pour caractériser les propriétés de complexation et/ou d'acidité de différents échantillons d'eaux naturelles et de MON standard. Les résultats obtenus devront permettre non seulement de tester ces techniques mais aussi de définir leurs capacités et leurs limites. La validité du modèle chimique choisi pour cette étude sera établie en comparant les valeurs des paramètres de complexation optimisées à celles obtenues dans des études similaires, et en appréciant la pertinence de la modélisation des données expérimentales.

CHAPITRE I/ LES METAUX TRACES DANS L'ENVIRONNEMENT – ROLE DE LA MATIERE ORGANIQUE NATURELLE

I.A/ Généralités:

Dans un milieu naturel, les éléments métalliques peuvent être distingués en deux catégories. La première catégorie rassemble les éléments qui, présents à l'état de trace, sont essentiels à la croissance, au développement voire à la reproduction des organismes vivants, aussi bien micro que macroscopiques (Buffle, 1981 ; Sigg *et al.*, 1992). Les métaux suivants en font partie: Cu, Zn, Co, Fe, Mn, Ni, Cr, V, Mo, Se, Sn. Lorsque la concentration de ces éléments est trop faible, un phénomène de carence est donc observable pour ces organismes. Ainsi, il a par exemple été montré qu'un manque de Fer pouvait être à l'origine d'une diminution du développement phyto-planctonique (Fiala *et al.*, 1976 ; Fischer *et al.*, 2002). Pour autant, une augmentation forte de la concentration en ces éléments métalliques peut aboutir à des phénomènes de toxicité. C'est entre autres le cas du cuivre.

La deuxième catégorie est quant à elle constituée des éléments métalliques toxiques, non nécessaires à la croissance des organismes vivants, tels que le cadmium, le plomb, le mercure. L'ensemble de ces éléments peut être d'origine naturelle mais leurs concentrations sont généralement soumises aux activités anthropiques générant d'importantes pollutions. La quantification de ces éléments traces et donc une donnée indispensable à l'estimation de leur impact dans un environnement donné.

I.B/ Spéciation des métaux traces:

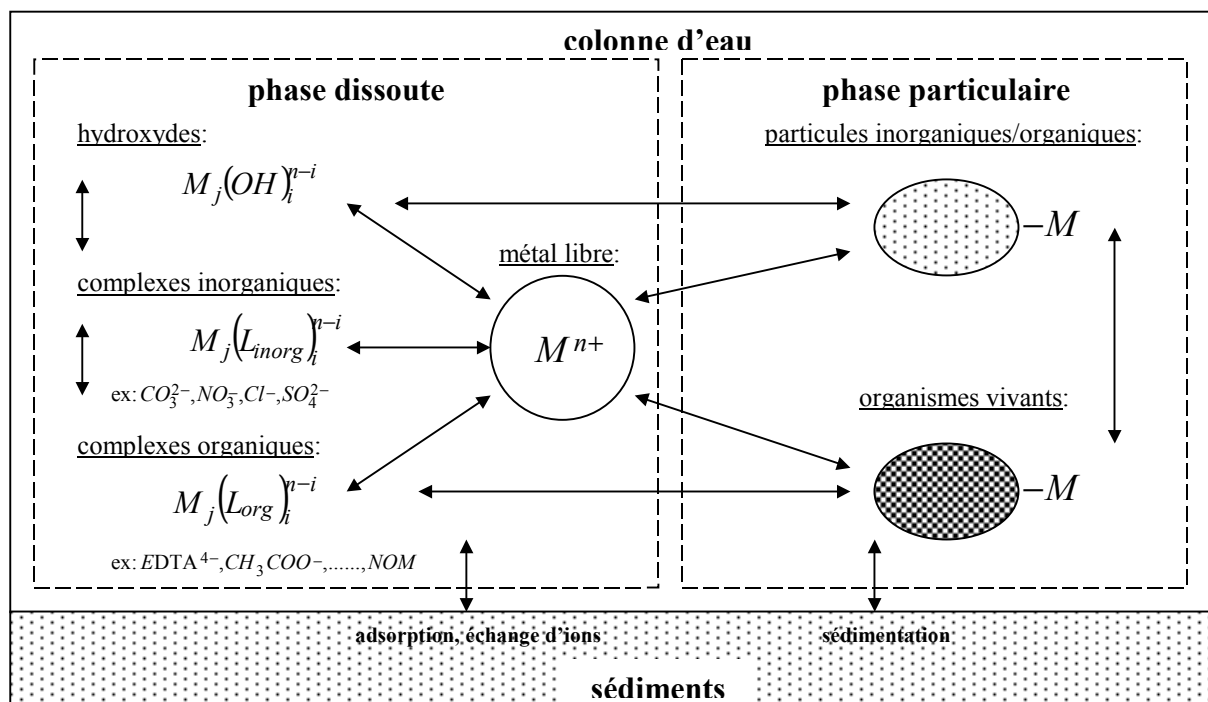


Figure I.1: réactions d'échanges du métal M avec les constituants organiques et inorganiques du milieu (d'après Buffle, 1988)

La spéciation chimique d'un élément est définie comme étant l'ensemble des formes/espèces chimiques de cet élément dans un milieu naturel donné. Un certain nombre de ligands, inorganiques ou organiques, vont conditionner la spéciation de cet élément par la formation de complexes plus ou moins stables. Il a été montré que la toxicité d'un métal trace est dépendante de cette spéciation et que le métal ionique libre (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , etc ...) est une des formes les

plus réactives, avec les espèces neutres, puisque plus facilement assimilables par les organismes vivants (Rollemberg et Gonçalves, 2000 ; Vasconcelos et Leal, 2001a ; Wildgust et Jones, 1998). La quantification de la concentration dissoute totale en un ou plusieurs de ces métaux traces ne peut donc pas suffire à l'estimation de l'indice de pollution d'un système donné. Une détermination correcte de la spéciation d'un métal est indispensable à l'estimation de son rôle et son de devenir.

La figure **I.1** schématise les réactions d'association/complexation/adsorption d'un métal vis-à-vis des constituants dissous et particuliers présents dans la colonne d'eau ainsi que les réactions d'échanges avec les sédiments. Les formes chimiques d'un métal dissous peuvent être séparées en quatre catégories suivant la nature de l'agent complexant considéré:

- (i) métal ionique libre hydraté M^{n+} ,
- (ii) métal sous forme d'hydroxydes $M_j(OH)_i^{n-i}$,
- (iii) métal complexé à des ligands inorganiques $M_j(L_{inorg})_i^{n-i}$,
- (iv) métal complexé à des ligands organiques $M_j(L_{org})_i^{n-i}$.

L'équation de conservation de la masse, pour le métal M dissout, est donc de la forme :

$$M_T = M^{n+} + \sum_i M_j(OH)_i^{n-i} + \sum_i M_j(L_{inorg})_i^{n-i} + \sum_i M_j(L_{org})_i^{n-i} \quad (\text{eq. I.1})$$

Pour chaque ligand, la complexation entre un métal M et un ligand L peut être décrite par la réaction d'équilibre suivante:



Cette réaction est caractérisée par une constante thermodynamique de complexation/stabilité, notée K , exprimée par l'équation:

$$K = \frac{[M_i L_j]}{[M]^i [L]^j} \quad (\text{eq. I.2})$$

Dans cette équation, les concentrations en M et L se réfèrent au métal et ligand libre, i.e. non complexés par d'autres espèces chimiques, seulement solvatés par l'eau.

La catégorie (ii), rassemblant l'ensemble des complexes hydroxydes, n'est dépendante que de la valeur du pH. Il convient donc de mesurer cette variable pour toute estimation de la spéciation d'un métal.

La catégorie (iii) regroupe les complexes inorganiques, i.e. les complexes du métal avec les anions du milieu comme les chlorures, sulfates, nitrates, carbonates... Ces complexes ont été caractérisés et donc les constantes de complexations thermodynamiques associés aux équilibres considérés sont a priori disponibles. Elles sont d'ailleurs généralement intégrées aux tables thermodynamiques utilisées par les logiciels de calcul de spéciation (MINEQL, CHESS, PHREEQC, MINTEQA2, ...). Pour autant, les valeurs de concentrations totales en ligands inorganiques, facilement mesurables par les techniques analytiques actuelles (chromatographie ionique, AAS, ...), ne peuvent pas être utilisées pour le calcul de la spéciation chimique de M , sans prendre en compte les complexations éventuelles de ces ligands avec d'autres cations. Par exemple, dans le cas des chlorures, il faut principalement tenir compte des équilibres avec le calcium et le magnésium pour pouvoir estimer la concentration en chlorure sous forme libre.

Enfin, la catégorie (iv), réunit les complexes formés avec des ligands de nature organique. Ces ligands peuvent être différenciés en deux sous-catégories principales:

- (iv-a) des molécules de structures simples et de réactivités connues comme l'EDTA, l'acide acétique, la cystéine, ... éventuellement présentes dans le milieu naturel,
- (iv-b) des macromolécules d'origine diverses, de structures hautement hétérogènes et de réactivité souvent difficilement quantifiables, constitutives de la Matière Organique Naturelle (MON). Cette sous-catégorie peut être sous divisée en (iv-b-1) *agents complexants polyfonctionnels* (groupes de complexants relativement petits, possédant un

nombre faible de sites, de caractéristiques communes), et en (iv-b-2) *macromolécules polyélectrolytes* (groupes de macromolécules, dans lesquels chaque molécule possède un grand nombre de sites, de propriétés très diversifiées) (Buffle, 1988).

Des trois catégories (ii, iii et iv) de ligands précédemment définies, celle qui regroupe les ligands organiques est la plus difficile à caractériser. La sous-catégorie (iv-a) est cependant assez facile à intégrer dans un calcul de spéciation, si tant est que l'on puisse déterminer la concentration de l'ensemble de ces molécules simples, ce qui est rarement le cas. Une mauvaise estimation des propriétés de ces ligands (iv) entraînerait donc systématiquement des imprécisions sur le calcul de la spéciation.

La spéciation des métaux traces dissous est donc influencée par un grand nombre de facteurs physico-chimiques qui peuvent être soumis à des variations importantes, par exemple en milieu estuarien où les variations de salinité sont fortes. Il convient donc de prendre en compte l'ensemble des équilibres entre le métal et les ligands présents dans le milieu pour pouvoir estimer correctement la répartition du métal entre ses différentes formes chimiques (Rozan et Gaboury, 1999b). Le système mathématique ainsi défini est complexe et ne peut généralement pas être résolu analytiquement (Morel, 1983). L'utilisation d'un programme spécifique de spéciation est donc indispensable pour correctement interpréter des données issues de mesures analytiques, en vue de l'étude des formes chimiques d'un métal à l'état de traces.

I.C/ Origine, nature, propriétés et rôle de la Matière Organique Naturelle (MON) dissoute:

L'expression de Matière Organique Naturelle est utilisée pour désigner l'ensemble des matières organiques d'un écosystème naturel, autres que les organismes vivants et les composés d'origines synthétiques, donc anthropiques (Buffle, 1988). La MON observable dans les eaux naturelles possède une très grande variété de propriétés et est constituée d'un mélange extrêmement complexe de composés dont au moins 80% ne sont pas structurellement identifiés à l'heure actuelle. En considérant la diversité des processus de synthèse et de dégradation, le nombre de constituants de la MON peut être considéré comme excessivement grand, il semble donc difficile voire impossible de correctement les séparer. En conséquence, une majorité d'études de la MON reposent non pas sur une caractérisation exacte par des composés définis mais sur une caractérisation par des groupes de constituants de propriétés voisines.

I.C.1/ Origine de la MON

Les propriétés de la MON sont étroitement liées à l'origine des macromolécules organiques la constituant et aux processus de dégradation. Ainsi, une MON dissoute d'origine terrestre présente des propriétés relativement différentes de celles d'une MON dissoute d'origine marine. En effet, les sources de ces MON sont nettement différentes. Dans le premier cas, la MON a pour principale origine les plantes supérieures qui contiennent une importante fraction en matériel difficile à dégrader (lignine, cellulose). Au contraire, la MON d'origine marine résulte principalement de la dégradation ou des excréments bactériennes et phyto-planctoniques, la proportion apportée par les plantes aquatiques supérieures et les animaux marins étant négligeable.

Dans les systèmes naturels, une MON peut être divisée en (i) une fraction pédogénique, issue d'un apport terrestre par ruissellement des eaux de pluies, et (ii) une fraction aquagénique, provenant de la production de MON directement dans la masse d'eau. Les conditions chimiques et biologiques des eaux douces et marines étant relativement proches comparées à celles d'un sol, on peut penser que les MON aquagéniques produites en eau douce et en milieu marin sont de structures voisines comparées à la MON d'origine pédogénique. De plus, il faut tenir compte de l'éventuelle présence de MON issues des sédiments et de l'activité humaine (fraction anthropique).

Les MON présentes dans des eaux de mer, des eaux de rivières ou des lacs auront donc des proportions variables en ces différentes fractions, proportions influencées par la présence d'activité humaine, l'importance des processus de sédimentations/floculations, l'hydrométrie, le débit de la rivière considérée, ...

I.C.2/ Composition de la MON

La composition de la MON, du fait des origines variées de ces sources, est donc a priori très hétérogène. Cependant, pour chacune de ces fractions, on distingue systématiquement des composés identifiables (biopolymères: acides aminés, protéines, lipides, sucres, ...) et des composés réfractaires difficilement identifiables (géopolymères: substances humiques, humine, ...). Les proportions en composés identifiables et réfractaires de ces fractions sont dépendantes du protocole d'extraction utilisé, mais il y a généralement entre 70 et 90% de géopolymères.

Les biopolymères sont des molécules de structures assez simples, dégradables rapidement. Elles rentrent dans des réactions de polymérisation et de condensation pour se transformer en des molécules nettement plus complexes, les géopolymères. Les biopolymères peuvent être utilisés comme des marqueurs permettant de retracer l'origine de la MON, mais étant peu concentrés dans les eaux naturelles, ils sont difficilement séparables et analysables.

Les géopolymères, ou substances humiques, ont été caractérisés initialement par un protocole d'extraction de la MON pédogénique. Ces substances humiques sont réfractaires et peuvent être opérationnellement divisées en trois groupes, fonctions de la solubilité à différents pH:

- . les humines: insolubles quel que soit le pH
- . les acides humiques: insolubles à pH acide
- . les acides fulviques: solubles à tout pH

Les principaux groupes fonctionnels présents sur les géopolymères sont : carboxyles, alcools, phénols, groupes aminés, quinones, carbonyles et méthoxyles. D'autres fonctions sont également présentes mais en des proportions plus faibles. La proportion de structures aliphatiques par rapport aux aromatiques est un paramètre important pour expliquer certaines propriétés des composés étudiés ainsi que leur genèse.

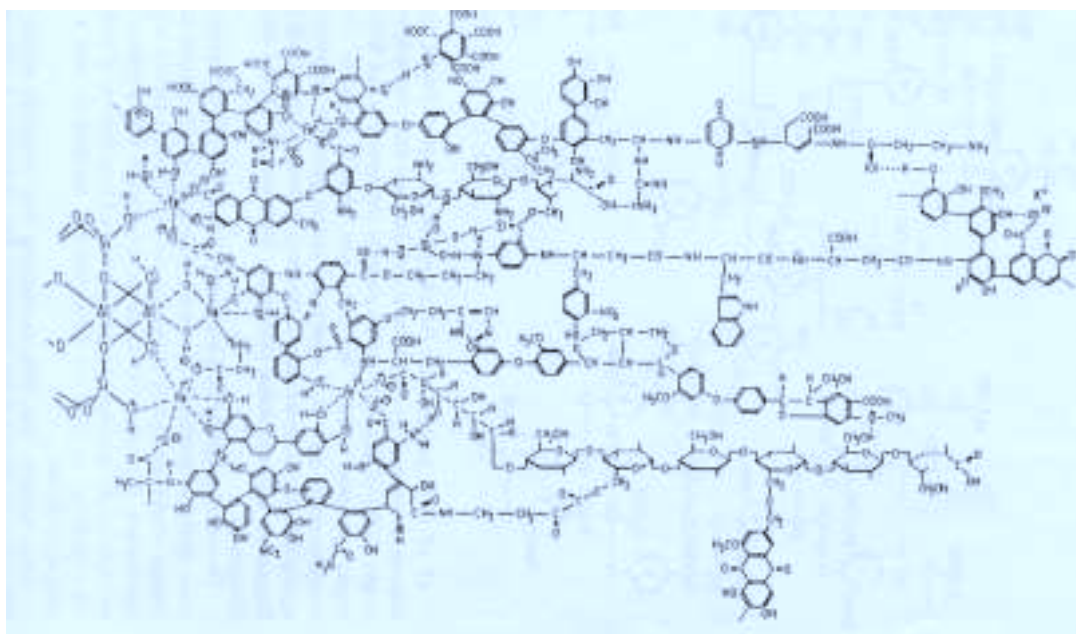


Figure I.2: Modèle de Kleinhempel

La figure I.2 représente le modèle de Kleinhempel (Kleinhempel, 1970) combinant les groupements fonctionnels analysables sur une matière organique pédogénique réfractaire. Ce modèle, bien qu'hypothétique et non-exhaustif, montre bien la complexité structurelle et fonctionnelle des MON.

I.C.3/ Etude des propriétés de la MON

De par sa composition, la MON dissoute observée dans les eaux naturelles possède une structure chimique hautement hétérogène, donc un nombre important, voire infini, de groupements fonctionnels de propriétés différentes. De ce fait, l'étude expérimentale des propriétés de la MON n'est possible qu'en la subdivisant en différents groupes de composés possédant des caractéristiques plus ou moins similaires. De plus, pour obtenir des informations qui ne soient pas limitées au seul cas d'étude, les paramètres utilisés pour représenter ces groupes doivent être, autant que faire se peut, indépendants des conditions chimiques du milieu d'origine de la MON étudiée (Buffle, 1988). Deux voies différentes peuvent être suivies pour étudier les propriétés de la MON.

a/ Analyse globale de la MON:

La première approche repose sur une étude globale de la MON, non fractionnée, éventuellement isolée globalement du milieu d'origine, par exemple par ultrafiltration. La MON ainsi analysée est ensuite subdivisée mathématiquement en groupes de propriétés voisines (par exemple la complexation vis-à-vis du plomb) qui sont utilisées pour représenter la MON (Kinniburgh *et al.*, 1999 ; Sposito, 1994 ; Tipping, 1993). Ces groupes n'ont pas forcément une réalité chimique, i.e. ils ne correspondent pas forcément à une structure chimique ou à des groupements fonctionnels caractérisés (Sposito, 1981). Ils sont seulement caractérisés par un certain nombre de propriétés, par exemple une constante d'acidité ou un rendement quantique de fluorescence. Ce type d'étude a l'avantage de ne pas modifier la MON, mais nécessite des techniques analytiques suffisamment précises pour travailler aux concentrations naturelles et s'affranchir des perturbations provoquées par le milieu (par exemple la compétition des ions chlorures vis-à-vis de la complexation du Cu par les groupements fonctionnels de la MON), surtout quand la MON n'a pas été extraite (ultrafiltration tangentielle, osmose sur nanomembranes, évaporation, ...) et donc que la concentration en carbone organique dissous (COD) est faible.

b/ Fractionnement préalable de la MON en groupes de composés:

La deuxième voie repose sur un ou plusieurs fractionnements préalables de la MON en groupes de composés chimiques de propriétés voisines, suivant des protocoles chimiques et/ou physiques. Différentes techniques existent, elles reposent principalement sur la séparation en fonction de critères utilisant les propriétés suivantes: taille, charge, hydrophobicité. Ainsi, les techniques les plus courantes utilisent des séparations par classes de taille (chromatographie par exclusion de taille, ultrafiltration), par résines hydrophobiques, ou par résines échangeuses d'ions (Brown *et al.*, 1999 ; Morelli *et al.*, 2002 ; Ndung'u *et al.*, 2003 ; Scarano et Morelli, 2002 ; Wrobel *et al.*, 2003). Les groupes ainsi séparés sont donc constitués de composés chimiques "réels", possédant au moins une propriété en commun, par exemple la taille ou la charge. Le fractionnement d'une MON et la quantification des différents groupes ainsi obtenus, constituent une première étape de sa caractérisation, étape qui peut être considérée comme une fin en soi.

Pour appréhender son comportement dans un milieu donné, notamment vis-à-vis des métaux, chaque groupe peut ensuite être analysé pour caractériser les propriétés qui lui sont associées.

Les analyses sont d'autant plus facilitées que ces séparations permettent de minimiser les phénomènes d'interactions entre les groupements fonctionnels (inévitables lorsqu'ils sont mélangés dans l'échantillon "brut"), annulent a priori les interactions générées par les autres espèces chimiques présentes (par exemple les ions majeurs), et permettent de travailler à des concentrations en composés chimiques accrues. Le regroupement de l'ensemble des propriétés (complexation, acidité, fluorescence, ...) analysées pour chaque groupe conduit à une estimation des caractéristiques globales de la MON étudiée (Buffle, 1988).

Cependant, la séparation de la MON en plusieurs groupes, en vue d'une étude de ses interactions vis-à-vis des métaux traces, peut présenter un certain nombre d'inconvénients (Zsolnay, 2003). En effet, peu de techniques de séparation permettent d'étudier l'ensemble des groupes principaux séparés tout en conservant leurs structures et leurs propriétés d'origines. En outre, les composés d'un même groupe n'ont pas toujours les mêmes propriétés. Ils rassemblent en fait souvent plusieurs types de groupements fonctionnels donc un panel de propriétés d'acidité, de complexation, d'adsorption, ...

I.C.4/ Rôle de la MON vis-à-vis de la spéciation des métaux traces

Compte tenu de la grande hétérogénéité structurelle d'une MON dissoute, due principalement aux différentes sources de matières organiques ainsi qu'aux différents processus de dégradation modifiant ses caractéristiques d'origine, les valeurs trouvées pour les différentes propriétés de la MON sont très variées (Town et Filella, 2000). Il ne semble donc pas possible de représenter l'ensemble des MON dissoutes, observables en milieux aquatiques, par un nombre restreint de propriétés. Cependant, la prise en compte du rôle de la MON est nécessaire pour correctement interpréter et prévoir le comportement d'un polluant tel qu'un métal à l'état de trace dans un environnement donné (Gustafsson *et al.*, 2003 ; Koukal *et al.*, 2003 ; Lorenzo *et al.*, 2002 ; Slaveykova *et al.*, 2003).

De plus, les sites de la MON possédant des propriétés de complexation vis-à-vis des métaux, ont généralement aussi des affinités pour le proton et les autres cations, notamment le calcium ou le magnésium. Ces éléments vont donc rentrer en compétition avec le métal considéré (Christensen et Christensen, 2000 ; Lu et Allen, 2002 ; Van Den Hoop *et al.*, 1995). Par exemple, lorsque le pH diminue, on observe généralement une décomplexation des métaux traces, caractérisée par une augmentation de la concentration en métaux non-organiques (i.e. libre et complexé avec les hydroxydes et les ligands inorganiques du milieu). Le même phénomène est observable lorsque la concentration en cations divalents alcalins-terreux augmente. Pour correctement estimer l'influence d'une MON sur la spéciation d'un métal, il faut donc aussi connaître ses affinités vis-à-vis des autres éléments, afin de pouvoir caractériser la MON par des paramètres qui ne soient pas conditionnels (i.e. dépendants des conditions analytiques, et donc non-transposables) mais "quasi-thermodynamiques". Ceci complique le processus de caractérisation de la MON, puisqu'il faut avoir recours à d'autres techniques analytiques spécifiques aux cations majeurs (utilisation d'électrodes sélectives) et à la détermination des propriétés d'acidité (titrations acido-basiques).

I.D/ Analyse et modélisation des propriétés de complexation et d'acidité de la MON:

I.D.1/ Analyse:

Différentes techniques analytiques ont été développées afin d'étudier les propriétés de complexation et d'acidité de la MON fractionnée ou non. Elles reposent principalement sur la mesure de la concentration en métal libre ou complexé en équilibre avec la MON, mais peuvent également être basées sur des mesures de la concentration en ligand libre ou complexé. Certaines

de ces techniques utilisent des protocoles d'extraction (dites techniques séparatives du métal ou de la MON) alors que d'autres peuvent s'appliquer directement à un échantillon (non séparatives).

a/ Les techniques non séparatives:

a.1/ *Les techniques électrochimiques – voltamétrie et potentiométrie:*

Les techniques voltamétriques sont souvent utilisées afin d'estimer la complexation des métaux par la MON (Buffle, 1988 ; Wang, 1985). En effet, elles permettent de mesurer les concentrations totales en métaux à l'état de traces dans un milieu naturel, et ainsi de déterminer la fraction de métal complexé par des ligands organiques, complexes qui sont le plus souvent électrochimiquement "inertes" donc non-détectés à la mesure (**III.B.3.a/**). Parmi ces méthodes, deux sont fréquemment utilisées, l'ASV (*Anodic Stripping Voltammetry*) et la CSV (*Cathodic Stripping Voltammetry*).

L'ASV permet de mesurer, grâce à la formation d'un amalgame sur une goutte ou un film de mercure lors d'une étape de préconcentration, une intensité de courant proportionnelle à la concentration en métal labile (Cu, Pb, Cd, Zn, ...) (Bard et Faulkner, 1983). On rassemble généralement sous le terme de métal labile, le métal libre et l'ensemble des complexes métalliques électrochimiquement labiles à la goutte, i.e. par approximation l'ensemble des hydroxydes et des complexes inorganiques: CdCl_2 , CdCO_3 ... (Pižeta et Branica, 1997; Wang, 1985). Cette technique permet de déterminer simultanément les concentrations en Cd, Pb et Cu labiles, elle peut donc être a priori utilisée pour étudier des phénomènes de compétition entre ces métaux traces. Par contre, le nombre de métaux analysables est relativement limité. Pratiquement, l'analyse des propriétés de complexation d'une MON consiste à ajouter à l'échantillon des aliquotes d'une ou plusieurs solutions standards de métal, et à suivre l'évolution de la concentration en métal labile en fonction de la concentration en métal total (Bruland *et al.*, 2000 ; Erk et Raspor, 2001 ; Kozelka et Bruland, 1998 ; Muller, 1996 ; Rozan et Gaboury, 1999a).

La CSV est quant à elle basée sur la formation d'un complexe entre le métal libre et un ligand spécifique prédéfini ajouté à l'échantillon, puis l'adsorption de ce complexe à la surface de la goutte. Cette technique est plus sensible que l'ASV (Donat et Van Den Berg, 1992) et elle permet de doser un grand nombre d'éléments, notamment des métaux ne formant pas d'amalgames (Co, Ni, Cr, U, V...) (Van den Berg, 1989 ; Achterberg et Braungardt, 1999). Elle peut donc être utilisée pour déterminer la concentration en un élément, si le ligand ajouté est suffisamment spécifique à l'élément considéré. La détermination des propriétés de complexation d'une MON est basée sur l'étude de la compétition entre le ligand ajouté et la MON vis-à-vis du métal. L'analyse consiste donc, comme en ASV, à suivre la concentration en complexe adsorbé en fonction des ajouts de métaux.

Une technique dérivée de l'ASV a été mise au point, reprenant le principe de la CSV (Scarano *et al.*, 1992 ; Xue et Sigg, 1998). Cette ASV "à compétition de ligand" repose sur l'ajout d'un ligand (ex. EN,1,2-diaminoethane) formant des complexes électrochimiquement labiles avec le métal (ex. Cd). Ce ligand rentre en compétition avec les ligands organiques forts, modifiant la spéciation du métal, augmentant alors la fraction de métal labile et donc la sensibilité de la mesure par DPASV. L'interprétation des données (M_{labile} , M_{T}) obtenues, nécessitant la prise en compte des propriétés de complexation et d'acidité de ce ligand ajouté, permet de caractériser les ligands organiques naturels forts, formant avec le métal des complexes inertes.

Cependant la CSV ainsi que l'ASV "à compétition de ligand" dépendent des valeurs de constantes de stabilité de la littérature (Pižeta et Branica, 1997), i.e. les propriétés de

complexation et d'adsorption des ligands ajoutés vis-à-vis des métaux, elles ne sont utilisables que dans des conditions précises (gamme de pH, tampon, type d'analyse...) et ont une fenêtre analytique plus restreinte (Scarano *et al.*, 1992) que celle de l'ASV "classique".

Dans cette thèse, l'ASV "classique" a été choisie préférentiellement aux autres techniques pour étudier les propriétés de complexation de la MON. Elle fera donc l'objet d'une étude plus détaillée par la suite.

Les électrodes sélectives sont également utilisées en potentiométrie pour étudier les interactions entre la MON et le proton, certains métaux traces ou cations majeurs (Bryan *et al.*, 2002 ; Lu et Allen, 2002 ; Masini *et al.*, 1998 ; Rozan et Gaboury, 1999a). A la différence des techniques voltamétriques, l'analyse repose sur la mesure de la concentration en espèce (proton, métal, cation majeur) libre et non en fraction labile. L'espèce libre étant a priori la plus réactive vis-à-vis du milieu, sa mesure peut sembler intéressante. Cependant, pour la caractérisation des propriétés de complexation d'un échantillon naturel, cette technique nécessite une parfaite connaissance des espèces chimiques du milieu et des équilibres correspondant, pour pouvoir estimer à l'aide d'un calcul de spéciation la proportion de métal complexé avec des ligands organiques. De plus, les électrodes sélectives sont nettement moins sensibles que l'ASV et la CSV et ne permettent donc pas d'atteindre les concentrations naturelles en métaux traces. L'utilisation de cette technique est donc a priori restreinte (1) à l'analyse d'échantillons concentrés en MON, le plus souvent extraite et/ou fractionnée, ce qui permet de travailler à des concentrations en métaux nettement plus fortes ; (2) à l'étude des interactions entre la MON et le proton ou les cations majeurs, impossible par voltamétrie ; ou (3) à être couplée à d'autres techniques plus sensibles afin d'accroître la fenêtre analytique utilisable, donc la gamme de concentrations en sites présents sur la MON.

Les interactions MON – proton ont été analysées par cette technique dans ce travail, elle fera donc l'objet d'une étude plus approfondie.

Les techniques électrochimiques sus-mentionnées ont été adaptées dans certains cas pour des mesures *in situ* (Achterberg et Braungardt, 1999 ; Pei *et al.*, 2000 ; Pižeta *et al.*, 2003 ; Van Staden et Matoetoe, 2000). L'intérêt principal est de ne pas modifier l'échantillon lors du prélèvement, de travailler dans les conditions naturelles et de minimiser les éventuelles pollutions. Par contre, la correspondance entre la mesure et les formes chimiques du métal est plus difficile à estimer. De plus, des ajouts de métaux ne sont pas possibles, il faut donc réussir à calibrer correctement la technique mise en œuvre pour pouvoir estimer la fraction de métal sous forme de complexes organiques. La détermination effective des propriétés de complexation de la MON semble donc nettement plus complexe.

a.2/ La spectroscopie de fluorescence:

Contrairement aux techniques précédemment mentionnées, la spectroscopie de fluorescence UV-visible est basée sur l'analyse directe des propriétés de la MON. En effet, parmi les groupements fonctionnels de la MON, certains d'entre eux ont des propriétés de fluorescence. Si ces groupements possèdent également des propriétés de complexation ou d'acidité, un phénomène d'exaltation ou d'atténuation de la fluorescence est observé lors d'ajouts de métaux. Cette propriété, nommée quenching de fluorescence, permet de mettre en évidence les propriétés de complexation de la MON (Cao *et al.*, 2004 ; Esteves da Silva *et al.*, 2002 ; Patel *et al.*, 2002 ; Smith et Kramer, 2000). Cependant, tous les sites fluorescents ne sont pas complexants, et réciproquement, ce qui peut entraîner un biais dans l'analyse de ces propriétés. De plus, compte tenu de la grande hétérogénéité de la MON, ces propriétés de fluorescence sont complexes et il est difficile de trouver les conditions expérimentales permettant d'obtenir une sensibilité suffisante pour l'analyse d'un échantillon peu concentré en MON à des teneurs naturelles en métaux traces.

b/ Les techniques séparatives:

Elles utilisent des procédés permettant de séparer le métal (ou la MON) libre du métal (ou de la MON) complexé(e) par co-précipitation, dialyse, chromatographie, ... Ces techniques ont été récemment reprises et modernisées, souvent par couplage à des technique d'analyse spectroscopique des métaux (GFAAS, ICP-MS, ...).

b.1/ La DGT (Diffusive Gradient in Thin film):

La technique des DGT est récente. Elle est basée sur la mesure *in situ* d'un flux de métal dissous, aussi bien dans la colonne d'eau que dans les sédiments. Contrairement aux autres techniques, le système n'est pas à l'équilibre. En effet, le métal est complexé par une résine spécifique, possédant un grand nombre de sites de complexation, après diffusion dans un gel ne laissant a priori passer que le métal libre ou complexé par des petits ligands (Davison et Zhang, 1994). Ces complexes sont donc dissociés puis complexés par la résine. Après un temps d'exposition, le système est retiré et le métal fixé sur la résine est déterminé par ICP-MS ou GFAAS. C'est donc une technique relativement facile à mettre en œuvre, qui permet une mesure directe, mais qui est sensible à de nombreux paramètres (spéciation du métal dans le milieu, propriétés des ligands organiques, caractéristiques de la résine et du gel de diffusion, temps d'exposition, ...). Une comparaison des résultats obtenus par DGT avec des mesures classiques par voltamétrie a montré qu'ils étaient semblables, attestant a priori de l'efficacité de la technique (Meylan *et al.*, 2004). Comme pour les mesures électrochimiques *in situ*, cette technique ne permet cependant pas de caractériser les propriétés de complexation de la MON, elle donne une indication sur la labilité du métal dans un milieu donné.

b.2/ Les autres techniques séparatives:

Comme la DGT, ces techniques sont basées sur l'extraction du métal ou de la MON, puis leur caractérisation. Par exemple, une chromatographie liquide couplée à des mesures par GFAAS ou ICP-MS, permettent de mesurer la concentration en métal dans chacune des fractions organiques éluées, ces fractions pouvant ensuite être caractérisées par exemple par spectrométrie de masse. L'ultrafiltration (Wrobel *et al.*, 2003), la chromatographie par exclusion de taille (Morelli *et al.*, 2002 ; Scarano et Morelli, 2002), la dialyse (Takács *et al.*, 1999) ou les résines échangeuses (Ndung'u *et al.*, 2003) peuvent également être utilisées pour séparer plusieurs fractions complexantes. Ces techniques, si elles sont utilisées pour caractériser la structure de fractions de MON complexantes, sont souvent onéreuses, relativement difficiles à mettre en œuvre et elles ne permettent pas forcément de retrouver les propriétés de complexation initiales de la MON étudiée (Buffle, 1988 ; Mackey *et al.*, 1997).

I.D.2/ Modélisation des propriétés de complexation et d'acidité de la MON:

L'interprétation des résultats obtenus par l'analyse des interactions entre la MON et les métaux traces, les cations majeurs ou le proton, en vue de la caractérisation de ses propriétés, repose généralement sur l'élaboration d'un modèle théorique de la MON. Ce dernier est indispensable pour correctement représenter le rôle de la MON vis-à-vis notamment des métaux traces, en vue d'une prévision de l'impact de ces éléments dans un milieu donné.

L'amélioration des techniques analytiques utilisées a permis d'accroître considérablement la gamme d'interactions observables, ce qui a nettement complexifié la mise au point d'un modèle unique de MON permettant de reproduire l'ensemble de ces propriétés. Différentes approches

ont été et sont encore développées afin d'appréhender les caractéristiques de la MON. Ces modèles de MON peuvent être rassemblés en deux catégories distinctes:

- (i) approche discrète, i.e. représentation de la MON par des groupes de sites, chacun caractérisé par des propriétés de complexation, d'acidité, ... (Lu et Allen, 2002 ; Masini *et al.*, 1998 ; Sposito, 1981 ; Sposito, 1994 ; Tipping et Hurley, 1992 ; Tipping, 1993)
- (ii) approche continue, i.e. représentation de la MON par un continuum de propriétés à l'aide d'une ou plusieurs fonctions de type $\log(L_T) = f(\log(K))$ (L_T : concentration totale en sites, K : constante de complexation ou d'acidité) (Benedetti *et al.*, 1996 ; Christensen et Christensen, 2000 ; Kinniburgh *et al.*, 1999)

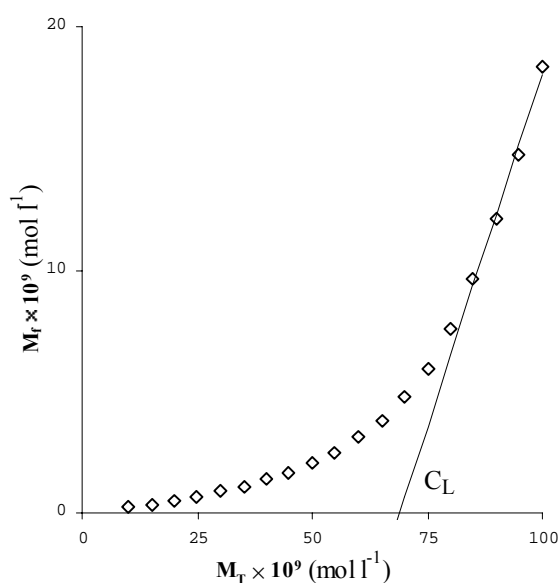
Dans ce travail de thèse, une approche discrète a été utilisée pour la modélisation de la MON, elle sera détaillée au chapitre **II.C**/.

CHAPITRE II/ MODELISATION DES INTERACTIONS MON - METAUX TRACES ET PROTON

II.A/ Problématique:

Dans les systèmes aqueux naturels, la spéciation des métaux traces (Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn...) est dépendante d'un grand nombre de paramètres physiques (température, pression, ...) et chimiques (pH, force ionique, concentrations en éléments majeurs, ligands complexants, ...). Parmi tous ces facteurs, les groupements complexants (ou sites) présents sur une MON ont un rôle prépondérant puisqu'ils peuvent complexer fortement les métaux et donc modifier leurs formes chimiques dominantes, donc leur réactivité vis-à-vis de l'écosystème. L'origine, la structure, la composition et les propriétés physiques et chimiques de la MON sont très hétérogènes et souvent évolutives. La MON complexante regroupe donc aussi bien des molécules de structures et de réactivités simples, présentant peu de groupements fonctionnels, que des macro-molécules de grande taille, possédant une densité forte en sites potentiellement complexants, de propriétés très variées. La caractérisation de la MON n'est donc a priori pas aisée. Pour autant, elle est indispensable afin de correctement quantifier l'impact des métaux traces et de bien d'autres éléments (HAP, pesticides, ...), souvent toxiques pour le milieu. Ainsi, on montre que le cuivre est complexé à hauteur d'au moins 95% par la MON dans les eaux naturelles, aussi bien marines que douces. Le cadmium quand à lui est également complexé par la MON, dans une proportion importante en milieu de faible salinité, mais il se décomplexe en milieu marin au profit de complexes $Cd(Cl)_i^{(2-i)+}$, par compétition des ions chlorures. De même, une variation de pH peut entraîner une complexation ou une décomplexation des métaux par la MON. Il convient donc, non seulement de caractériser les propriétés de complexation de ces ligands très hétérogènes, mais aussi de prendre en compte l'influence des éléments compétiteurs. En effet, si ces derniers sont des anions (Cl^- , NO_3^- , H_2EDTA^{2-} , ...), ils peuvent complexer le métal considéré, s'ils sont des cations (H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , autres métaux, ...) ils peuvent complexer la MON.

Historiquement, les premières quantifications des propriétés de complexations des eaux naturelles ont été effectuées par la technique de Chau (Chau, 1974). La méthode consistait à estimer la *capacité complexante* (C_L) des échantillons. Cette dernière représente la quantité de métal masqué à l'analyse par complexation du milieu. La technique reposait donc sur l'estimation de la fraction de métal organique pour des ajouts croissants de métal, à l'aide d'une technique analytique adéquate, souvent par polarographie ou potentiométrie. La *capacité complexante* déterminée par extrapolation de la partie linéaire de la courbe $[M_{\text{mesuré}}] = f([M_{\text{ajouté}}])$ représentait donc une estimation globale de concentration en ligands dans le milieu (figure II.1). Les valeurs ainsi obtenues ne peuvent donc pas être directement utilisées pour représenter la MON, puisque elles sont dépendantes des conditions d'analyse (pH, force ionique, présences de cations et d'anions majeurs, ...), i.e. conditionnelles.



Elles ont cependant été utiles pour comparer les caractéristiques d'échantillons, du moment qu'ils aient été analysés dans les mêmes conditions.

Cette méthode ne permet cependant pas d'estimer la constante de complexation associée aux sites analysés. Pour ce faire, d'autres techniques dites de linéarisation ont ensuite été développées (Buffle, 1981 ; Ružić, 1982 ; Scatchard, 1949 ; Van den Berg, 1982a, 1982b, 1984). Elles sont basées sur une étude théorique des équilibres (1:1) de complexation mis en jeu, permettant une transformation mathématique des courbes expérimentales suivie de leur linéarisation. Leur utilisation a conduit à la détermination des paramètres de complexation (concentration en sites, constante de complexation) de 1 ou 2 ligands à partir de la linéarisation des données expérimentales transformées mathématiquement. Ces techniques sont encore à l'heure actuelle utilisées dans de nombreuses études (Abate et Masini, 2002 ; Kozelka et Bruland, 1998 ; Muller, 1996, 1999 ; Rozan et Gaboury, 1999a ; Verweij et Ružić, 1997 ; Wells *et al.*, 1998 ; Xue et Sigg, 1998). En effet, leur principal avantage est qu'elles sont simples d'utilisation et qu'elles ne nécessitent pas d'outil informatique très élaboré.

Toutefois, elles sont moins efficaces que des approches plus récentes de fitting non-linéaire des données expérimentales, sans transformation mathématique, comme cela sera démontré ultérieurement. Elles ne permettent pas de déterminer plus de deux classes de ligands, ce qui peut être insuffisant pour représenter une MON. Elles prennent difficilement en compte l'influence des autres éléments chimiques du milieu (principalement par compétition), puisqu'elles ne sont pas basées sur un calcul rigoureux de la spéciation des espèces considérés.

Concernant les propriétés d'acidité de ligands, il existe aussi plusieurs techniques "simples". Celles-ci sont basées soit sur une linéarisation des données expérimentales (méthode de Gran (Gran, 1988)), soit sur leur analyse graphique (dérivée première, dérivée seconde, méthode des tangentes). Ces techniques sont assez adaptées aux cas simples comme par exemple l'analyse d'une titration acido-basique d'un mélange de mono-acides. Par contre, elles sont inutilisables dans le cas d'une MON, pour laquelle la courbe de titration ne présente pas de points d'inflexion suffisamment marqués.

De ce fait, les études actuelles visant à caractériser les interactions de matières organiques naturelles vis-à-vis des métaux traces, du proton et/ou de cations majeurs, sont basées sur l'utilisation de programmes spécifiques d'optimisation. Certains d'entre eux prennent en compte les conditions chimiques du milieu à l'aide d'un calcul de spéciation. Ce dernier permet, en théorie, de rendre "quasi-thermodynamiques" les paramètres de complexation déterminés, i.e. utilisables pour simuler la MON étudiée dans d'autres programmes de spéciation des métaux. Les approches sont toutefois différentes s'il s'agit d'une modélisation discrète ou continue des propriétés de la MON.

II.B/ Représentation des propriétés de la MON – les différentes approches:

De par l'hétérogénéité des macromolécules constituant la MON, ces propriétés de complexations ou d'acidité sont très variées et variables suivant les conditions physico-chimiques. De ce fait, réduire ces propriétés à seulement une ou deux classes de ligands (telles que celles caractérisables par des techniques de linéarisation) peu sembler hasardeux ou tout au moins trop restrictif pour correctement simuler le comportement d'une MON. L'amélioration des techniques aidant, un plus grand nombre d'interactions a pu être analysé. Il a donc été nécessaire de développer différents modèles de MON visant à simuler ces propriétés. Comme la structure exacte des constituants chimiques de la MON est inconnue à hauteur d'au moins 80%, il est presque impossible de la représenter par des molécules organiques simples, de caractéristiques connues. La plupart des simulations de la MON la représente donc par un ensemble de classes ou

groupes de ligands "virtuels", donc de structure chimique non définie, caractérisés par une ou plusieurs propriétés. Ces modèles peuvent être regroupés en deux catégories principales: (i) approche continue, (ii) approche discrète.

II.B.1/ Approche continue:

Ce modèle de MON repose sur une représentation continue de ses propriétés de complexation. En effet, ces dernières étant variables presque à l'infini, il semble légitime de les représenter par un continuum. L'approche la plus rigoureuse serait donc de définir pour chaque MON, vis-à-vis de chaque élément (métal, cation majeur, proton, ...), une courbe d'affinité, représentant les interactions analysées, de la forme: $\theta = f(\log(K))$, θ étant un taux d'occupation des sites de complexation ou d'acidité. La modélisation de la MON viserait alors à déterminer une fonction mathématique reproduisant les variations de cette courbe, donc simulant la distribution de ligands de la MON. Théoriquement, il n'y a pas de raison pour que cette fonction soit simple, i.e. représentable par exemple par une fonction de type gaussienne ou inverse.

Dans la pratique, les données expérimentales issues d'une ou plusieurs techniques d'analyse sont rarement assez précises pour atteindre ce but. Les études menées par Perdue et Lytle (1983), Dzombak *et al.* (1986) et Fisch *et al.* (1986) ont montré qu'une distribution normale de ligands pouvait être définie pour représenter les affinités d'une MON. Cette dernière est assimilée à une surface, les interactions vis-à-vis d'un élément étant alors définies par une isotherme de type Langmuir. Pour cela, une (métal, cation) ou deux (proton) fonctions gaussiennes sont utilisées. L'équation mathématique de cette distribution ne repose que sur un nombre assez limité de paramètres à optimiser (3 par fonctions normales) pour simuler les données expérimentales et donc les interactions analysées. L'utilisation de ce type de modèle, au niveau où il est développé ici, est assez simple et ne requiert donc pas de logiciel très élaboré. Ainsi, ces paramètres peuvent être optimisés par exemple par le solveur présent sur les tableurs tels qu'Excel.

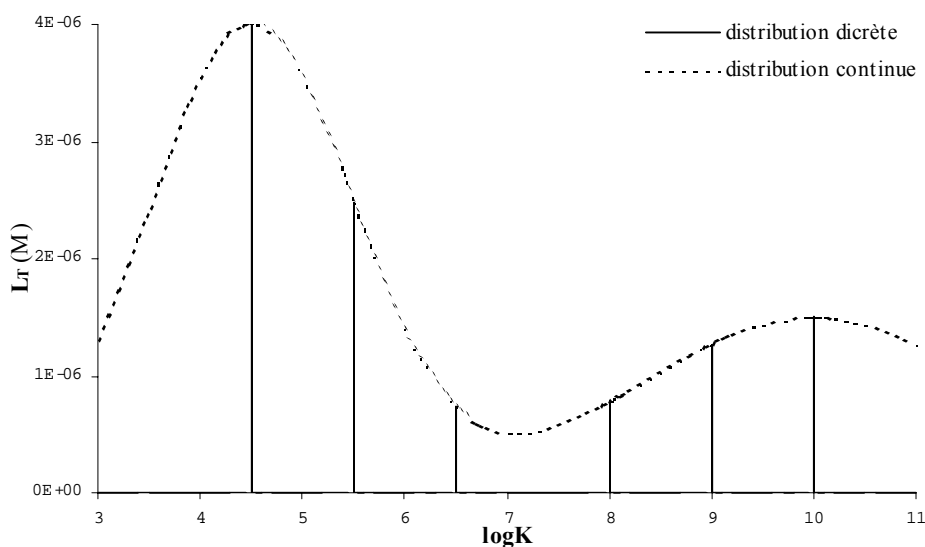


Figure II.2: Distributions discrète (6 sites) et continue (bimodales)

Une MON sera donc représentée par plusieurs fonctions, chacune étant spécifique à un élément (Benedetti *et al.*, 1996 ; Kinniburgh *et al.*, 1999 ; Milne *et al.*, 2001 ; Ritchie et Perdue, 2003). La figure II.2 présente une distribution continue simulant les interactions entre le proton et une MON hypothétique. Les deux fonctions gaussiennes sont respectivement centrées sur les sites de type carboxylique et de type phénolique, comme cela est souvent observé sur des MON. La fonction bimodale de distribution utilisée est alors de la forme:

$$L_T(K) = L_{T,1}^{max} \times \exp\left(-\frac{(\log K_1 - \log K)^2}{\sigma_1}\right) + L_{T,2}^{max} \times \exp\left(-\frac{(\log K_2 - \log K)^2}{\sigma_2}\right) \quad (\text{eq. II.1})$$

II.B.2/ Approche discrète:

L'approche discrète de la complexation d'une MON repose sur la modélisation de ses propriétés par une distribution discrète de ligands. Cette approche peut donc être utilisée pour caractériser la complexation d'un mélange de molécules simples (EDTA, cystéine, phénol, ...), ce qui est difficile avec un modèle continu. Elle permet en plus de prendre en compte des ligands mono- ou poly-dentates, i.e. la formation de complexes métaux-ligands 1:1 et 1:i. La probabilité qu'il y ait sur une MON des groupements fonctionnels capables de telles complexations n'est en effet pas nulle, mais il conviendra cependant d'étudier la possibilité de distinguer ces différentes formes de complexation à partir d'un nombre nécessairement restreint de points expérimentaux. Ces ligands sont caractérisés à l'aide de paramètres de complexations: concentration, constante de stabilité et/ou d'acidité. Plus les propriétés de complexation (ou d'acidité) d'une MON seront complexes, plus le nombre de ligands nécessaires à une modélisation correcte des données sera élevé. Cependant, ce nombre dépend de la précision et du nombre des données expérimentales, de la fenêtre analytique balayée, des capacités d'optimisation du programme utilisé (souvent limité à un nombre restreint de paramètres), ainsi que des interactions analysées (métaux traces, proton, cations majeurs, ...).

En général, le nombre de ligands utilisés est donc assez limité: 2 à 4 pour les propriétés de complexation vis-à-vis des métaux traces (Lu et Allen, 2002 ; Muller, 1996 ; Vasconcelos et Leal, 2001b), jusqu'à 6 pour la modélisation des sites acides (Masini *et al.*, 1998). La figure II.2 présente une distribution discrète de 6 ligands acides, de constantes réparties entre 4.5 et 10, donc proche des distributions discrètes utilisées pour simuler les propriétés d'acidité des MON.

Différentes techniques de traitements mathématiques sont utilisées pour calculer les valeurs des paramètres de complexations de ces ligands, à partir du fitting des données expérimentales. Ces techniques peuvent être:

- (i) relativement simples comme les linéarisations (Ružić, 1982 ; Scatchard, 1949), elles sont alors limitées à 1 ou 2 ligands,
- (ii) plus complexes, utilisant alors des programmes de fitting non-linéaires tels que FITEQL (Westall *et al.*, 1982). S'ils tiennent compte des interactions avec les autres éléments chimiques, ces programmes nécessitent un sous-programme de calcul de spéciation.

Bien que les ligands déterminés ne correspondent pas à une structure chimique précise, leurs caractéristiques peuvent être facilement intégrés dans les bases de données des programmes de spéciation tels que MINEQL (Westall *et al.*, 1976), MINTEQA2 (Eary et Jenne, 1992 ; Felmy *et al.*, 1984), CHESS, PHREEQC (Parkhurst *et al.*, 1980). Cette compatibilité entre le modèle discret et ces programmes de spéciation est en partie responsable de sa popularité.

Quelques études ont utilisé, pour la modélisation des propriétés de MON, un jeu de molécules réelles (phénol, acides salicylique, phtalique, benzoïque, ...). Applicables à certains échantillons (Cathalifaud *et al.*, 1996), cette modélisation ne semble toutefois pas assez flexible pour représenter un grand nombre de propriétés, par rapport à des sites virtuels ne possédant pas une contrainte entre le pK_H et les valeurs de pK_M . Ainsi, au cours de ce travail, une étude préliminaire a montré que même si un mélange d'EDTA, d'acide acétique, de phénol et d'acide salicylique peut à peu près simuler les interactions de l'Acide Fulvique Suwannee River (AFSR) vis-à-vis du proton, il n'en est rien concernant les interactions AFSR-cadmium par exemple.

Ce travail a donc été basé sur une modélisation discrète des propriétés de complexation et d'acidité des MON analysées, afin d'obtenir des données de complexation facilement intégrables dans des logiciels de spéciation et de transport des contaminants métalliques (MOCO-SIAM3D).

II.C/ Modélisation discrète des propriétés de la MON – concept des *quasi-particules*:

De nombreux modèles discrets ont été développés afin de simuler les propriétés de complexation des matières organiques naturelles vis-à-vis des métaux traces et/ou du proton. Leur complexité est dépendante du nombre d'interactions qu'ils sont susceptibles de modéliser. Elle se traduit par un nombre plus ou moins important de paramètres de complexations et/ou d'acidité, une des principales limitations étant la qualité et la quantité de données expérimentales, mais aussi les capacités d'optimisation du programme de fitting utilisé.

Un des problèmes principaux de l'étude des propriétés complexantes et/ou d'acidité de matières organiques naturelles est l'obtention de paramètres quasi-thermodynamiques, i.e. indépendants entre autres de la force ionique, des effets de compétition des cations et anions du milieu, du proton (aussi bien en terme de formation d'hydroxydes que de protonation des sites de complexation de la MON), de la compétition des autres métaux traces. En effet, ces paramètres doivent être, autant que faire se peut, indépendants des conditions d'analyses s'ils sont destinés à être utilisés dans des bases de données comme celles des principaux programmes de spéciation, ou plus simplement comparés à ceux obtenus par d'autres techniques, dans d'autres conditions ou sur d'autres MON.

D'un point de vue analytique, ceci nécessite l'utilisation d'un grand nombre de techniques, spécifiques au proton, métaux traces, cations, ... permettant l'analyse de l'ensemble de ces interactions. Les expériences doivent de plus être menées dans des conditions physico-chimiques connues et stables: cellules de mesure thermostatées, force ionique constante, concentrations en ions majeurs connues, pH mesuré,

Puis, d'un point de vue modélisation, un calcul de spéciation est requis pour correctement tenir compte des formes chimiques (inorganiques et organiques) des métaux analysés. Idéalement, le modèle de complexation choisi pour simuler la MON doit pouvoir prendre en compte simultanément l'ensemble de ces interactions. Ainsi, il faut éviter d'étudier les propriétés de complexation vis-à-vis du cuivre puis du plomb sans faire le lien entre elles pour, par exemple, expliquer la compétition de ces deux métaux vis-à-vis des sites de la MON. De même, il faut pouvoir intégrer les modifications d'intensité de complexation d'une MON observables quand le pH varie, en affectant par exemple une constante d'acidité aux ligands complexants définis pour représenter les sites de cette MON.

Cette vue d'ensemble des propriétés de complexation des MON requiert donc un grand nombre de données analytiques et demande beaucoup de temps. C'est pourquoi, une majorité d'études sont basées sur la comparaison des résultats obtenus par des modèles plus simples (deux ligands) pour différents échantillons, sans prendre en compte toutes les interactions précédemment énumérées (Abate et Masini, 2002 ; Kozelka et Bruland, 1998 ; Muller, 1996, 1999 ; Rozan et Gaboury, 1999a ; Wells *et al.*, 1998). Peu d'études s'attachent à caractériser des échantillons de manière exhaustive, il faut tout même citer les travaux récents tels que ceux réalisés par Bryan *et al.* (2002), Lu *et al.* (2002), Tipping (2002), Xue *et al.* (1999).

II.C.1/ Concept de *quasi-particules*:

L'étude présentée est basée sur l'utilisation de *quasi-particules*. Ce concept a été initié par Sposito (1981). Une *quasi-particule* est une construction théorique et non une molécule ou un groupement complexant réel. L'utilisation d'entités mathématiques (sites, *quasi-particules*, ...) pour représenter une MON dans un modèle est justifiée car elle permet de décrire le système par des réactions d'équilibres, ce qui est nettement plus simple que de déterminer expérimentalement

les interactions des groupements fonctionnels de la MON au niveau moléculaire de manière exhaustive (Sposito, 1994). Au contraire des sites (ou ligands) habituellement utilisés pour modéliser les propriétés de complexation d'une MON (Kozelka et Bruland, 1998 ; Lu et Allen, 2002 ; Muller, 1996 ; Wells *et al.*, 1998), définis seulement par une concentration et une constante de stabilité vis-à-vis d'un seul élément, une *quasi-particule* est définie par un ensemble de propriétés, par exemple: concentration, constantes de complexation, constante d'acidité, Remarquons qu'une *quasi-particule* seulement définie par une concentration et une constante (d'acidité par exemple) s'apparente à un site "classique".

Pouvant être caractérisée par un nombre non limité de paramètres, une *quasi-particule* peut donc représenter différentes interactions, comme par exemple la complexation d'un métal vis-à-vis d'un groupement complexant d'une MON, tout en tenant compte des phénomènes de compétition vis-à-vis du proton. En effet, dans ce cas, il suffit de caractériser cette *quasi-particule* à l'aide d'une constante de complexation vis-à-vis du métal et d'une constante d'acidité. Sachant que les sites de complexation de la MON ne sont généralement pas spécifiques (i.e. ils agissent différemment vis-à-vis de nombreux cations), leur représentation par des *quasi-particules* caractérisées par une constante vis-à-vis de chaque cation étudié est plus efficace. Nonobstant le nombre important de paramètres nécessaires à cette caractérisation, ce type d'approche discrète semble adéquate à la modélisation simultanément des phénomènes de complexations MON-métaux ou proton et de compétition métal/métal, métal/proton, métal/cation, proton/cation. En effet, sans l'utilisation de ces *quasi-particules*, il faudrait définir un site par interaction analysée. Il n'y aurait alors pas de lien mathématique entre les différents sites définis, au contraire de la *quasi-particule*.

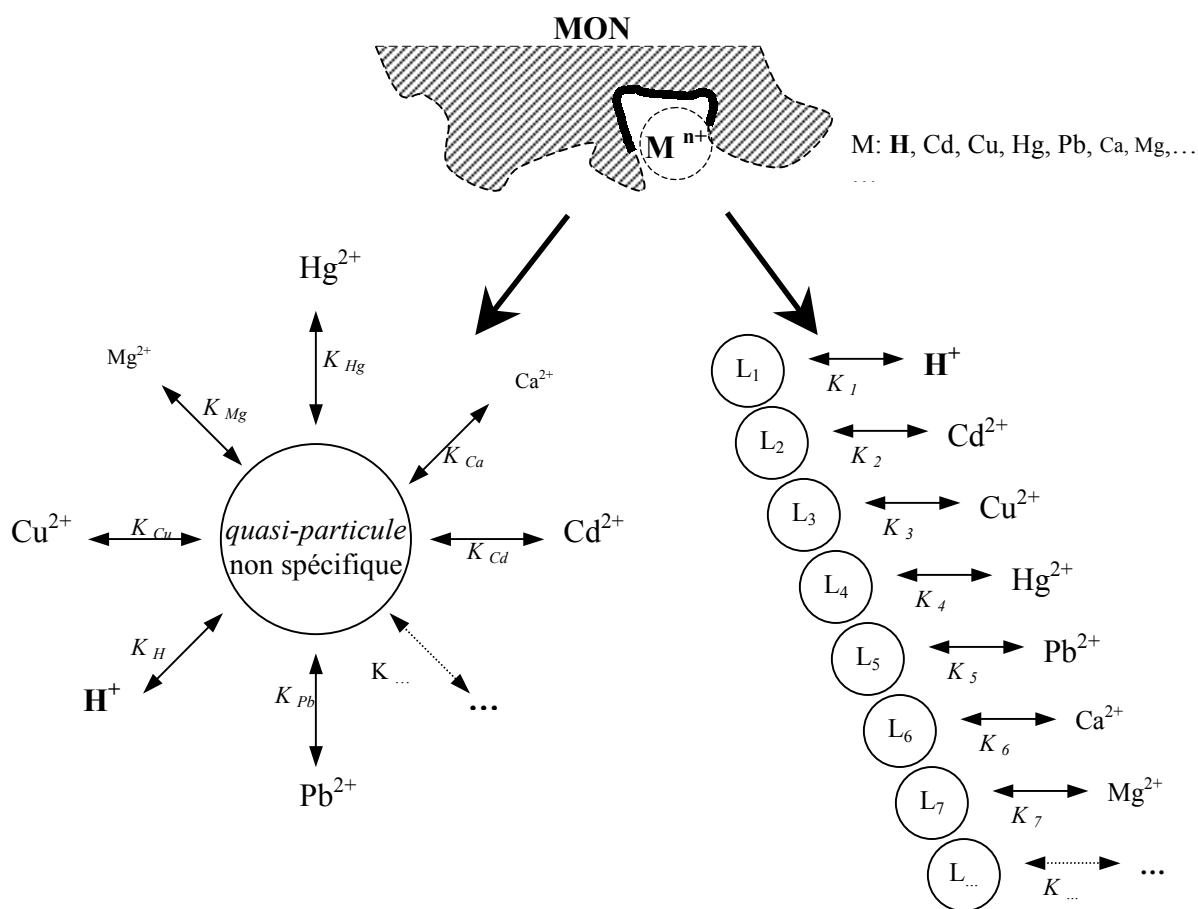


Figure II.3: représentation schématique des interactions d'un groupement fonctionnel d'une MON avec différents cations, modélisées par N ligands "classiques" et une seule *quasi-particule* non-spécifique à N paramètres

Par exemple, si l'on cherche à représenter les propriétés d'une molécule simple telle que l'EDTA, dans le cas des ligands "classiques", il faut définir un ligand par interaction analysée, i.e. un pour le proton (L_1), un pour le cadmium (L_2), un pour le cuivre (L_3), ... A l'inverse une seule *quasi-particule* (Q) suffit, caractérisée par une constante vis-à-vis du proton, une pour le cadmium, une pour le cuivre ... Dans le premier cas, il n'y a pas de lien entre le ligand (L_1) utilisé pour représenter l'acidité et le ligand (L_2) utilisé pour représenter la complexation vis-à-vis du Cd. Ceci signifie que la complexation de L_2 par Cd^{2+} n'est affectée par la complexation de L_1 par H^+ . La compétition réelle d' $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$ vis-à-vis de l'EDTA n'est donc pas prise en compte. Avec la *quasi-particule* Q , la prise en compte de ces interactions est automatique, puisqu'il n'y a qu'un seul "ligand" défini, qui se distribue bien, comme l'EDTA, en Q libre, $Q\text{-Cd}$, $Q\text{-Pb}$, $Q\text{-H}$, ... Cette différence entre les *quasi-particules* et les ligands (ou sites) "classiques" est schématisée dans la figure II.3.

II.C.2/ Utilisation des *quasi-particules* – définition du *chimio-type*:

Dans cette étude, les interactions vis-à-vis du proton et de deux métaux traces: le cadmium et le plomb, ont été analysées pour différentes MON. Les sites de complexation et/ou d'acidité mis en jeu peuvent être classés en différentes catégories. En effet, il a été montré qu'environ 1% des sites acides sont effectivement complexants vis-à-vis des métaux traces ou de cations majeurs, i.e. que les constantes de complexation associées à ces sites sont suffisamment élevées pour être détectées (Buffle, 1988). Par ailleurs, seule une minorité de ces sites complexants sont spécifiques à un seul métal, i.e. la constante associée à ce métal est nettement plus forte que celles associées aux autres éléments. Les métaux ainsi complexés ne peuvent être décomplexés par compétition avec un autre élément, même si ce dernier est 1000 fois plus concentré, sauf éventuellement par le proton. Ces sites sont donc prépondérants dans la spéciation des métaux aux concentrations naturelles. Pour autant, la majorité des sites complexants les métaux ne sont pas spécifiques, i.e. ils complexent l'ensemble des métaux traces, mais avec des affinités qui peuvent varier d'un métal à un autre.

Trois catégories de *quasi-particules* ont donc été définies pour prendre en compte ces différents types de sites analysables sur des échantillons naturels:

- type I: les sites spécifiques au proton. Ces sites sont définis par une constante d'acidité (K_{H}^{I} , L_{IT}^{I}),
- type II: les sites échangeables/non-spécifiques vis-à-vis des métaux, prenant en compte les compétitions métal/métal et métal/proton, définis par des constantes de stabilité vis-à-vis des métaux et du proton (K_{H}^{II} , $K_{\text{M},i}^{\text{II}}$, $L_{\text{IT}}^{\text{II}}$ pour i métaux),
- type III: les sites spécifiques de la MON, hautement spécifiques à un seul métal, sans compétition quantifiable avec les autres métaux, mais seulement avec le proton ($K_{\text{H}}^{\text{III}}$, $K_{\text{M}}^{\text{III}}$, $L_{\text{IT}}^{\text{III}}$).

Ces 3 types de *quasi-particules* sont représentées dans la figure II.4. La possibilité de détecter analytiquement les sites complexants spécifiques éventuellement présents sur une MON, qui ont nécessité la définition des *quasi-particules* de type III, sera explicitée par la suite.

L'ensemble des *quasi-particules* définies pour modéliser les propriétés d'une matière organique naturelle a été nommé *chimio-type*. Les paramètres de complexations (concentrations, constantes d'acidité et de complexation) qui le constituent sont utilisés pour simuler les interactions de la MON analysée et donc peuvent être intégrés à un modèle de spéciation chimique pour la représenter.

La définition des paramètres des *quasi-particules* utilisées pour modéliser une MON nécessite un programme d'optimisation basé sur le fitting des données expérimentales. Suivant le type d'analyse réalisée (titrations acido-basiques, potentiométriques, voltamétriques, ...), le nombre de paramètres à optimiser peut être important. De plus, un calcul de la spéciation chimique est

indispensable pour prendre en compte les interactions entre les anions majeurs (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , ...) et les métaux analysés, interactions qui modifient les équilibres MON-métaux. Ceci nécessite donc l'utilisation d'un logiciel qui allie un calcul de spéciation et une optimisation de constantes et/ou de concentrations.

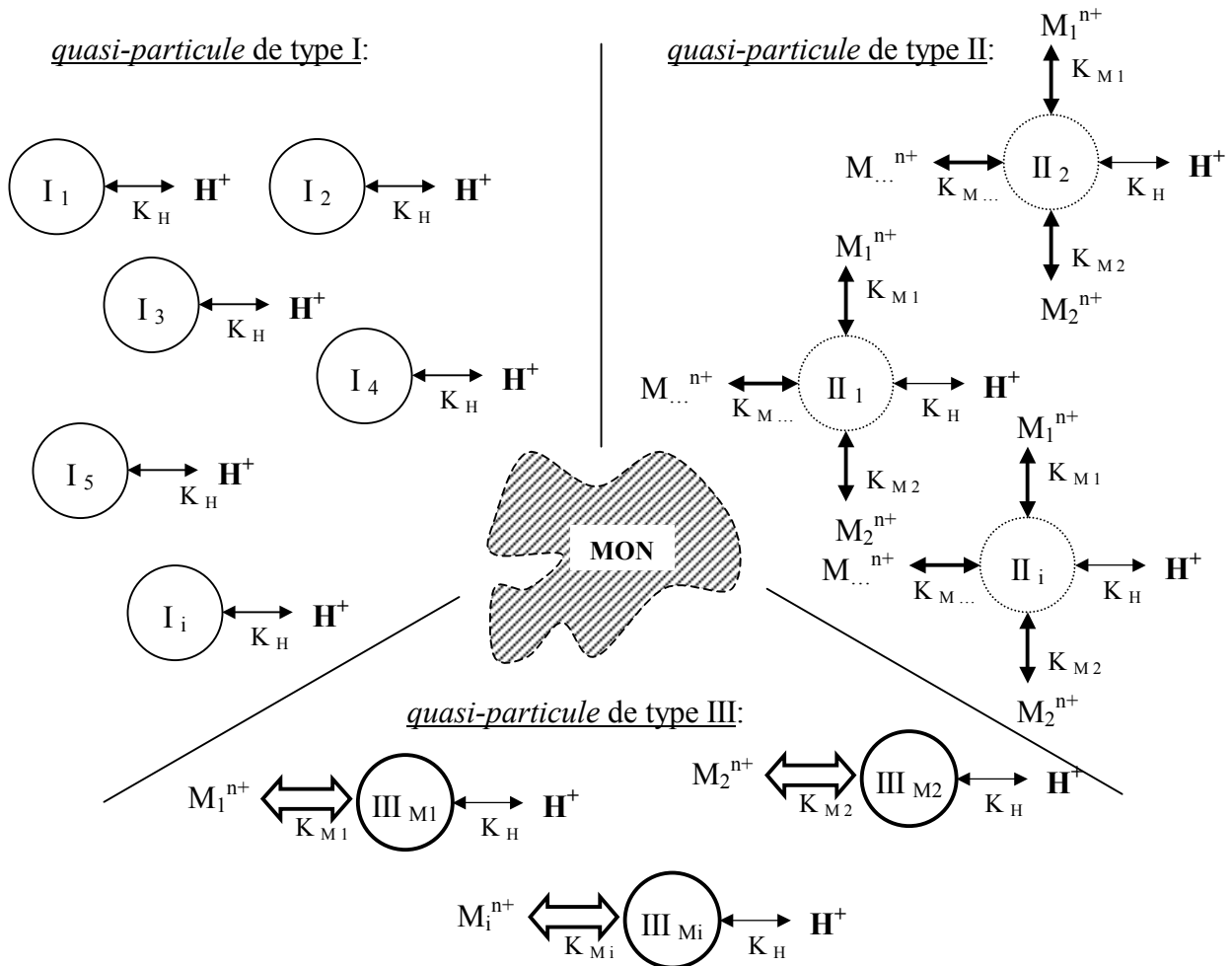


Figure II.4: les 3 types de *quasi-particules* utilisées pour modéliser les propriétés d'une MON vis-à-vis du proton et des métaux traces

II.D/ Optimisation de paramètres de complexation et d'acidité:

De par la complexité des propriétés complexantes de la MON, elle ne peut être simulée par un modèle discret qu'à l'aide d'un nombre assez important de ligands ou de *quasi-particules*, donc de paramètres. De plus, pour tenir compte de toutes ces interactions, il est préférable d'optimiser simultanément l'intégralité des paramètres inconnus (concentrations, constantes, ...) à partir de toutes les données expérimentales obtenues, plutôt que de segmenter le problème pour chaque type d'interaction. Par exemple, si les interactions MON-cadmium sont décorrélées des interactions MON-plomb en modélisant séparément les analyses entre la MON et ces deux métaux traces, alors il n'y a pas de lien entre les propriétés des ligands ainsi caractérisés. Dans ce cas, les phénomènes de compétition entre ces deux métaux vis-à-vis des sites de la MON ne sont pas pris en compte.

Le problème est que les logiciels utilisés dans des études similaires sont soit spécifiques au calcul de spéciation chimique (MINEQL, MINTEQA2, CHESS, PHREEQC, MOCO...), et ne possèdent pas de module d'optimisation de paramètres, soit capables d'optimiser un nombre restreint de paramètres de complexations (FITEQL) sans pour autant calculer la spéciation chimique du métal. De plus, les logiciels de spéciation susmentionnés ne peuvent pas être facilement intégrés dans un algorithme d'optimisation.

II.D.1/ Calcul couplé MINEQL-MultiSimplex:

La première approche utilisée pour traiter les données expérimentales obtenues lors de ce travail a consisté à coupler des logiciels de spéciation et d'optimisation déjà existant. Pour cela, le logiciel MINEQL a été associé à un logiciel d'optimisation MultiSimplex 2.1. Ce dernier repose sur un algorithme d'optimisation utilisant un simplexe modulé, développé principalement pour optimiser certains paramètres (nombre limité à 15) afin d'améliorer, par exemple, le rendement de réactions de synthèse organique.

La modélisation des propriétés de différentes MON vis-à-vis de métaux traces, à un pH donné, a été réalisée à partir de cette procédure. Les paramètres de N *quasi-particules* non-spécifiques définies pour représenter ces propriétés ont ainsi été optimisés à l'aide du processus suivant:

- initialisation des valeurs de chaque paramètre de complexation (K_i^{M1} , K_i^{M2} , L_{iT} , $i = 1$ à N) et définition de leurs domaines de variation,
- définition par le simplexe de $3N+1$ combinaisons de K_i^M et L_{iT} différentes,
- calcul de la spéciation pour chaque combinaison à l'aide de MINEQL,
- calcul des valeurs de *bias* pour ces $3N+1$ combinaisons (*bias*: erreur entre les valeurs mesurées expérimentalement et calculées par MINEQL)
- détermination d'une nouvelle combinaison de valeurs pour les $3N$ paramètres à l'aide du simplexe.
- ce processus est itéré jusqu'à ce qu'un optimum soit atteint. Les valeurs de K_i^M et L_{iT} optimisées sont alors celles qui permettent de reproduire au mieux les données expérimentales.

Cette technique d'optimisation présente cependant un certain nombre d'inconvénients. Ainsi, il n'a pas été possible de coupler MINEQL automatiquement au simplexe utilisé. La "connexion" entre ces deux logiciels a donc été manuelle, ce qui a beaucoup limité la capacité d'optimisation de cette procédure. De plus, le logiciel MultiSimplex est limité en nombre de paramètres optimisables.

II.D.2/ Développement de PROSECE: PROgramme d'Optimisation et de SpEciation Chimique dans l'Environnement:

Je tiens à remercier tout particulièrement Mr. Pierre Seppecher, Professeur de Mathématique (Laboratoire ANLA) à l'Université du Sud Toulon Var, sans qui le développement de ce logiciel n'aurait pas été possible.

a/ Objectifs:

Comme cela a été montré, l'étude des propriétés (complexation, acidité, fluorescence...) de la MON est difficile d'un point de vue analytique mais aussi de modélisation. Quelque soit le modèle choisi pour la représenter, il faut tenir compte de la spéciation chimique des espèces présentes dans le milieu d'étude, et un nombre important de paramètres inconnus sont à déterminer pour caractériser ces interactions.

Les objectifs étaient donc de créer un logiciel spécifique, couplant:

- (i) un calcul de spéciation suffisamment performant pour résoudre les équilibres chimiques de systèmes complexes tels que ceux rencontrés lors de l'analyse de MON,
- (ii) un module d'optimisation permettant le fitting de données expérimentales en ajustant les valeurs des paramètres de complexations et/ou d'acidité, voire de fluorescence, nécessaires à la modélisation des propriétés d'une MON.

De plus, une des conditions importantes que nous nous sommes fixées lors de son élaboration était de développer ce programme sous un logiciel open source GNU-GPL, afin de le diffuser librement. Pour cela, il a été développé à partir d'Octave (<http://www.octave.org/>), sous Linux.

Ainsi, ce logiciel sera facilement modifiable pour d'autres applications et utilisable "en ligne", i.e. sans fenêtre graphique, afin de diminuer le temps de calcul. Le code de *PROSECE* est disponible en annexe (Annexe **II.1**)

b/ Fonctionnement général:

Compte tenu de ces critères, un nouveau logiciel nommé *PROSECE* (*PRogramme d'Optimisation et de Spéciation chimique dans l'Environnement*) a été développé. Il repose sur deux modules distincts:

- (i) un calcul de spéciation,
- (ii) une optimisation des paramètres de complexation.

Le premier module résout l'équilibre en calculant la spéciation chimique d'un système défini. Ce système chimique est représenté mathématiquement à l'aide des tableaux d'équilibres. Ce calcul utilise un algorithme de *Newton-Raphson* afin de minimiser l'écart au bilan de masse.

Le second module permet l'optimisation des paramètres de complexation inconnus (concentrations, constantes d'acidité et/ou de complexation, rendement quantique, ...) par le biais d'un simplexe modifié. Ce dernier ajuste les valeurs des paramètres pour minimiser l'écart entre les données mesurées (ex. concentrations en cadmium électrochimiquement labile mesurées par DPASV) et calculées (ex. concentrations en cadmium libre et inorganique déterminées par le module de spéciation).

c/ Module de calcul de la spéciation chimique:

Le calcul de la spéciation des éléments chimiques dans les milieux naturels a fait et fait encore l'objet de nombreux travaux (Eary et Jenne, 1992 ; Felmy *et al.*, 1984 ; Parkhurst *et al.*, 1980 ; Westall *et al.*, 1976). De nombreux logiciels ont ainsi été créés, plus ou moins spécialisés et faciles d'utilisation. Les plus avancés tiennent non seulement compte des formes dissoutes des espèces chimiques définies mais aussi de la formation de précipités, de l'adsorption sur des particules, voire même des échanges avec l'atmosphère. C'est entre autre le cas de CHESS ou PHREEQC. MINEQL et MINTEQA2 sont des programmes plus anciens mais encore souvent utilisés (Christensen *et al.*, 2002 ; Rijstebil et Gerringa, 2002 ; Serkiz *et al.*, 1996) car ils sont assez simples d'utilisation et ils permettent de calculer correctement la spéciation chimique des espèces dissoutes.

Le module de calcul de spéciation qui a été développé pour *PROSECE* a donc été notablement inspiré par ces programmes.

D'un point de vue mathématique, la majorité des logiciels de spéciation sont basés sur la résolution des équilibres chimiques entre les différentes espèces, en minimisant l'écart au bilan de masse (ex. CHESS) et/ou l'écart à l'électro-neutralité (ex. MINEQL). Cette résolution passe généralement par une représentation matricielle des équilibres chimiques et des espèces mises en jeu dans le système défini. La représentation la plus couramment utilisée est celle des tableaux d'équilibres de Morel (1983).

c.1/ Composants, composés et réactions d'équilibres:

Toute résolution d'un système chimique à l'équilibre doit passer par une systématisation de sa représentation. L'idée première est de représenter l'ensemble des espèces chimiques par un minimum d'espèces indépendantes, qui vont former la *base* du système. Ces espèces chimiques sont nommées *composants principaux*. Pour ce faire, il y a deux règles principales à respecter:

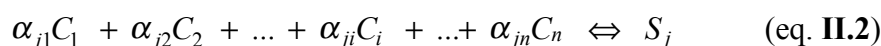
- (i) par combinaison linéaire ils doivent représenter l'ensemble des espèces du système,
- (ii) aucun d'entre eux ne doit être une combinaison linéaire des autres.

Plusieurs set de *composants principaux* peuvent être utilisés, un choix intuitif devant être fait entre toutes les possibilités. D'une manière générale, les ions libres sont choisis. Par exemple, il est plus pratique de prendre H^+ comme *composant principal* plutôt qu' OH^- , car l'expression des équilibres sont généralement formulées en terme d' H^+ (sauf pour les hydroxydes).

Les espèces qui ne sont pas considérées comme des *composants principaux* sont nommées *composés*. Elles sont alors obligatoirement décrites par une combinaison linéaire des *composants principaux*, et caractérisées par une constante de stabilité K . Cette dernière représente la constante d'équilibre thermodynamique de la réaction d'équilibre entre le *composé* et les *composants principaux*. Par définition, il y a donc autant de *composés* que de *réactions indépendantes* et de *constantes de stabilité*. Usuellement, ces réactions sont formulées en terme d'association. Ceci signifie par exemple que lorsqu'elles se réfèrent à un acide et à sa base conjuguée, la constante utilisée est inverse à la constante d'acidité habituellement définie ($K_H = K_a^{-1}$).

c.2/ Tableau des équilibres:

Ces *composants principaux*, *composés* et *constantes* de stabilité seront notés dans la suite du travail respectivement C_i , S_j , K_j . L'expression généralisée d'une réaction d'équilibre entre un *composé* S_j et n *composants* C_i est de la forme:



où : α_{ji} est le coefficient stœchiométrique de la $j^{\text{ème}}$ équation d'équilibre vis-à-vis du $i^{\text{ème}}$ *composant principal*.

Cet équilibre est caractérisé par la constante K_j , de la forme:

$$K_j = \frac{S_j}{\prod_{i=1}^n C_i^{\alpha_{ji}}} \quad (\text{eq. II.3})$$

On peut alors définir le *tableau d'équilibre* (Morel, 1983) représentant les équilibres entre n *composants principaux* et m *composés*:

	C_1	C_2	...	C_i	...	C_n	
C_1	1	0	...	0	...	0	
C_2	0	1	...	0	...	0	
...	
C_i	0	0	...	1	...	0	
...	
C_n	0	0	...	0	...	1	
S_1	α_{11}	α_{12}	...	α_{1i}	...	α_{1n}	K_1
...
S_j	α_{j1}	α_{j2}	...	α_{ji}	...	α_{jn}	K_j
...
S_m	α_{m1}	α_{m2}	...	α_{mi}	...	α_{mn}	K_m
	$C_{1,tot}$	$C_{2,tot}$...	$C_{i,tot}$...	$C_{n,tot}$	

c.3/ Equations:

Le tableau d'équilibre ainsi défini regroupe l'ensemble des équations permettant de représenter le système chimique. Ces équations sont distinguables en équations de bilan de masse et en équations d'équilibre, respectivement sous la forme:

$$C_{i,tot} = C_i + \sum_{j=1}^m \alpha_{ji} \cdot S_j \quad (\text{eq. II.4})$$

$$S_j = K_j \cdot \prod_{i=1}^n C_i^{\alpha_{ji}} \quad (\text{eq. II.5})$$

On peut rassembler pour chaque *constituant principal* les équations (II.4) et (II.5) en une équation globale:

$$C_{i,tot} = C_i + \sum_{j=1}^m \alpha_{ji} \cdot K_j \cdot \prod_{i=1}^n C_i^{\alpha_{ji}} \quad (\text{eq. II.6})$$

c.4/ Résolution du système chimique:

Le principe de résolution du système chimique de *PROSECE* est basé sur la minimisation de l'écart au bilan de masse. Cette méthode a semblé préférable à une minimisation de l'écart à l'électro-neutralité. En effet, dans l'état actuel du modèle de MON utilisé, il semble difficile d'attribuer une charge aux *quasi-particules* définies pour modéliser les propriétés de la MON (dont on ne peut pas non plus estimer la charge globale), ce qui aurait pour conséquence de ne pas les prendre en compte dans le calcul itératif, et donc risquerait de biaiser le calcul. En outre, compte tenu des concentrations généralement très faibles en métaux traces et en ligands considérés, leur poids dans l'électro-neutralité est très faible.

L'écart au bilan de masse est défini, à partir de l'équation (II.6) par:

$$E_i = C_{i,tot} - \left(C_i + \sum_{j=1}^m \alpha_{ji} \cdot K_j \cdot \prod_{i=1}^n C_i^{\alpha_{ji}} \right) \quad (\text{eq. II.7})$$

Pour un système donné, le tableau des équilibres peut être représenté sous forme matricielle à partir de:

- (i) une matrice des coefficients stœchiométriques (α_{ji}), notée A
- (ii) un vecteur des constantes de stabilité (K_j), noté K (valeurs en logarithme)
- (iii) un vecteur des concentrations totales en composants principaux ($C_{i,tot}$), noté C_{tot} .

Soit C le vecteur des concentrations libres en *constituants principaux*.

L'équation (II.7) est donc elle aussi représentable sous forme matricielle:

$$E(C) = C_{tot} - \exp(K + \ln(C) \times A') \times A \quad (\text{eq. II.8})$$

où: les fonctions exp et ln s'appliquent terme à terme, \times désigne le produit matriciel et ' la transposition matricielle (notation compatible avec Octave et Matlab).

L'algorithme mathématique utilisé est basé sur la méthode de *Newton-Raphson*. Son principe repose sur la minimisation de la norme d' $E(C)$.

Une fois le système chimique défini, le processus de calcul de spéciation est le suivant:

- initialisation des valeurs des concentrations libres en *composants principaux*,

- calcul de $E(C)$ à partir de ces valeurs,
- calcul du gradient (i.e. la dérivée) de $E(C)$, noté $\nabla E(C)$, suivant l'équation:

$$\nabla E(C) = ((\exp(K + \ln(C) \times A)^{1/C}) \times A) \times A \quad (\text{eq. II.9})$$
où: \times désigne la multiplication terme à terme et $1/C$ le vecteur ligne des inverses de C
- le vecteur C est modifié par: $C = C - \beta \times E(C) / \nabla E(C)$ (eq. II.10)
où: β est un coefficient d'amortissement

Ce processus est itéré jusqu'à ce que $E(C)$ soit inférieur à une valeur limite, définie dans notre cas comme étant 10^{-13} . La figure II.5 schématise le fonctionnement de ce module de calcul de spéciation.

Des précautions supplémentaires ont été prises pour éviter que les concentrations libres en *composant principal* (C) convergent vers des valeurs négatives. De plus, il faut noter que cette méthode converge d'autant moins bien que l'initialisation de C est mauvaise. Les concentrations en *composés* (notées S) peuvent ensuite être calculées à partir des concentrations optimisées en *composant principal*, suivant l'équation (c.3.2).

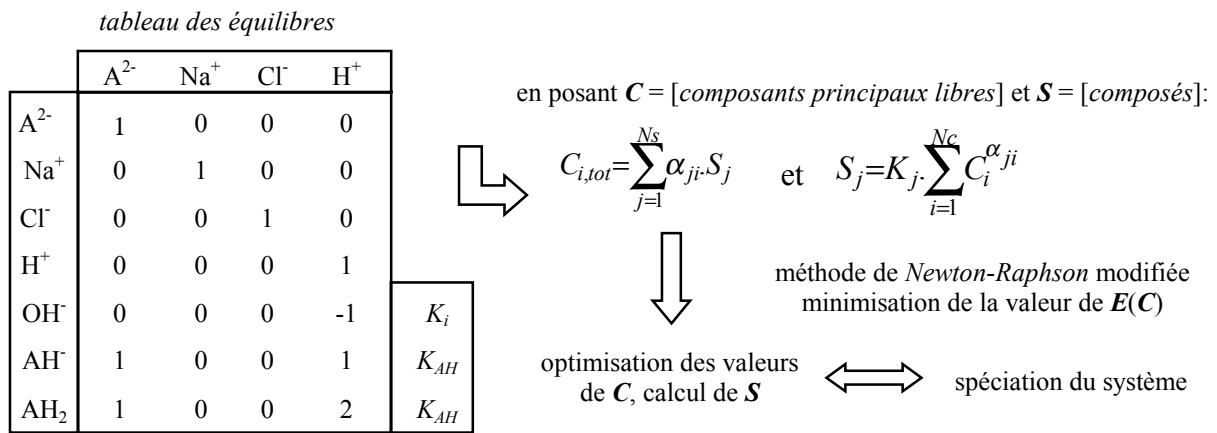


Figure II.5: fonctionnement du module de spéciation utilisé par PROSECE

c.5/ Autres algorithmes de calcul de spéciation:

D'autres algorithmes ont été testés pour calculer la spéciation chimique d'un système à l'aide de PROSECE. Contrairement à celui qui a été exposé précédemment, le calcul a été basé sur une minimisation de l'enthalpie du système $G(S)$ et non de l'écart au bilan de masse $E(C)$. L'expression de l'enthalpie, pour un système constitué d'espèces chimiques s distinguées en *composants principaux* C et en *composés* S , s'écrit matriciellement sous la forme:

$$G(s) = (-K-1+\log(s)) \times s' = (-K-1+\log(S)) \times S' + (-1+\log(C)) \times C' \quad (\text{eq. II.11})$$

En prenant en compte les relations entre *composés* et *composants principaux*, cette expression se transforme en:

$$G(S) = (-K-1+\log(S)) \times S' + (-1+\log(S_{tot} \cdot S \times A)) \times (S_{tot} \cdot S \times A)' \quad (\text{eq. II.12})$$

Les algorithmes développés reposent sur une minimisation de cette fonction. Pour cela, on définit le gradient de $G(S)$, noté $\nabla G(S)$:

$$\nabla G(S) = -K + \log(S) - (S_{tot} \cdot S \times A) \quad (\text{eq. II.13})$$

et le gradient second de $G(\mathbf{S})$, noté $\nabla^2 G(\mathbf{S})$:

$$\nabla^2 G(\mathbf{S}) = \text{diag}(1./\mathbf{S}) + \mathbf{A} \times \text{diag}(1./(\mathbf{S}_{\text{tot}} - \mathbf{S} \times \mathbf{A})) \times \mathbf{A}' \quad (\text{eq. II.14})$$

où: $\text{diag}(X)$ représente la matrice carré dont les valeurs de la diagonale sont égales à X , les autres à 0.

Deux techniques ont alors été utilisées, la méthode de descente et la méthode de *Newton-Raphson*, optimisant les concentrations en *composés* (et non en *composants principaux* comme précédemment) pour minimiser l'enthalpie du système.

Méthode de descente:

Le processus de calcul de spéciation est le suivant:

- initialisation des valeurs des concentrations libres en *composés* \mathbf{S} ,

- calcul de $\nabla G(\mathbf{S})$ à partir de ces valeurs,

- modification du vecteur \mathbf{S} suivant: $\mathbf{S} = \mathbf{S} - \beta \times \nabla G(\mathbf{S})$ (eq. II.15)

β représente le pas de la méthode (un module a été ajouté pour accélérer l'optimisation en augmentant β en fonction de l'avancement du calcul)

Ce processus est itéré jusqu'à minimiser la norme du vecteur $\nabla G(\mathbf{S})/K$. Cette méthode de descente est plus robuste qu'une méthode de *Newton-Raphson* mais nettement moins rapide.

Méthode de Newton Raphson:

Le processus de calcul de spéciation est le suivant:

- initialisation des valeurs des concentrations libres en *composés* \mathbf{S} ,

- calcul de $\nabla G(\mathbf{S})$ et $\nabla^2 G(\mathbf{S})$ à partir de ces valeurs,

- le vecteur \mathbf{S} est modifié par: $\mathbf{S} = \mathbf{S} - \delta \times \nabla G(\mathbf{S}) / \nabla^2 G(\mathbf{S})$ (eq. II.16)

où: δ est un coefficient d'amortissement

Ce processus est itéré jusqu'à minimiser la norme du vecteur $\nabla G(\mathbf{S})$.

Après différents tests sur des systèmes chimiques plus ou moins complexes, ces algorithmes ne se sont pas montrés plus efficaces que le premier, voire même inférieurs en terme de précision du calcul et de rapidité.

d/ Module d'optimisation des paramètres de complexation, d'acidité, ...:

Le deuxième module de *PROSECE* consiste en une optimisation de paramètres tels que des concentrations en sites, des constantes de stabilité, ... Pour des systèmes chimiques simples (un ou deux ligands et un métal), ne prenant pas en compte la spéciation exacte des éléments considérés, un algorithme d'optimisation tel que celui disponible sur le solveur d'Excel est suffisant. Il permet par exemple l'optimisation des paramètres de complexation de deux ligands, par fitting non-linéaire de données expérimentales.

Pour des systèmes plus complexes, il est indispensable d'avoir recours à un programme d'optimisation plus performant. Ainsi, un des objectifs de *PROSECE* a été de développer un module d'optimisation suffisamment fiable pour pouvoir optimiser un nombre important de paramètres, tout en ayant la capacité de traiter des systèmes plus simples.

d.1/ Méthode du simplex:

Il existe de nombreuses méthodes permettant l'optimisation de paramètres. Parmi celles-ci, la méthode du simplex est couramment utilisée. Un simplex est une figure géométrique convexe définie par $N+1$ sommets, N étant le nombre de paramètres à optimiser. Il a autant de dimensions qu'il y a de paramètres (Massart *et al.*, 1997). Par exemple, pour 2 paramètres, le simplex sera un

triangle, donc dans un plan ; pour 3 paramètres, se sera un tétraèdre, donc dans un espace à 3 dimensions.

Supposons le cas simple de deux paramètres à optimiser, notés A et B, afin de minimiser (ou maximiser) une réponse R. La première étape consiste à définir trois expériences, définies par des valeurs différentes pour A et B. Les points de ces trois expériences sont réparties dans le plan $A \times B$ de telle sorte qu'ils forment un triangle équilatéral. Pour ces trois expériences, trois réponses sont obtenues, R_1 , R_2 et R_3 . Supposons que la réponse R_3 soit la plus mauvaise, un nouveau simplex est généré à partir des points 1 et 2 et du symétrique du point 3 par rapport points 1 et 2. Mathématiquement cette opération revient à calculer les coordonnées du point symétrique au point le plus mauvais, par rapport au barycentre formé par les autres points. Le processus d'optimisation consiste ensuite au déplacement du simplex jusqu'à minimiser (ou maximiser) les réponses. Le simplex tourne alors autour d'un point centroïde. Ce point peut être considéré comme l'optimum, ou, si l'on souhaite améliorer le résultat, un nouveau simplex de taille inférieure peut être généré pour atteindre le meilleur résultat (R optimum). L'évolution de ce simplex est représenté sur la figure II.6. Le centroïde est matérialisé par le point 8, l'optimum par le point X.

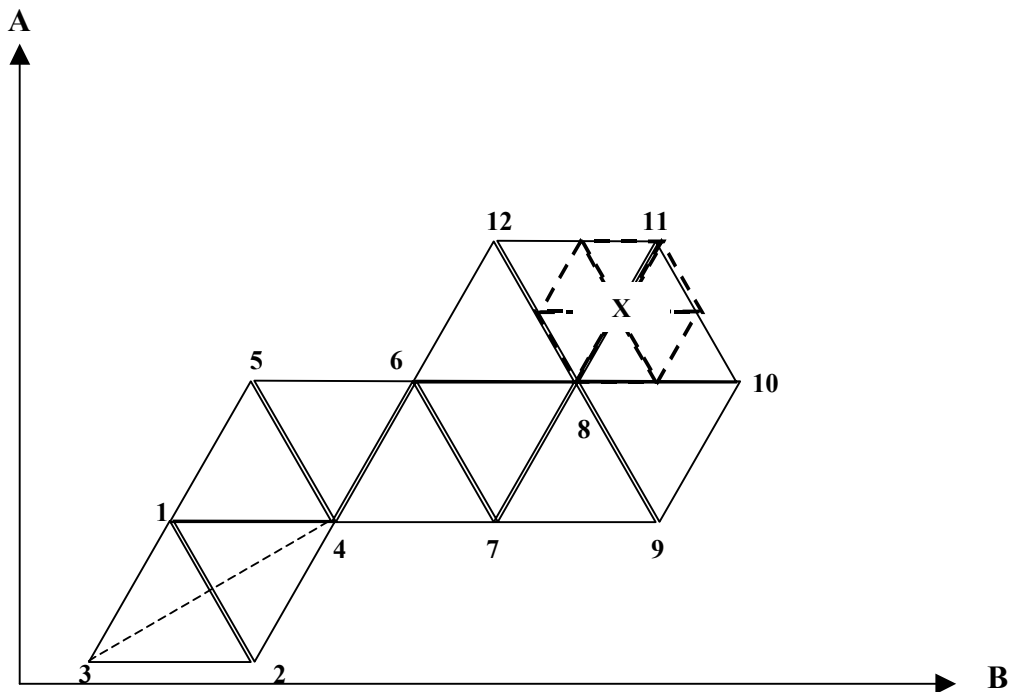


Figure II.6: évolution d'un simplex à taille fixe

Evidemment, lorsque le nombre de paramètres à optimiser s'accroît, il n'est plus possible de représenter l'évolution du simplex sur un graphique. Cependant, le principe de fonctionnement et le calcul du nouveau point pris par le simplex reste le même.

d.2/ Algorithme d'optimisation utilisé par PROSECE:

Le simplex représenté sur la figure II.6 appartient à la catégorie des simplex à *taille fixe*. Ces simplex ne permettent pas d'arriver directement à l'optimum, il faut en effet utiliser un simplex plus petit une fois le point centroïde atteint. Une deuxième catégorie de simplex existe, dite à *taille variable* ou *modulé*. La forme du simplex n'est alors plus constante, puisqu'un coefficient d'élongation ou de rétrécissement est ajouté pour accélérer le processus d'optimisation. Cette deuxième catégorie de simplex est donc plus efficace mais peut présenter des problèmes de convergence. En effet, aucun point centroïde n'est défini, donc le calcul peut ne pas s'arrêter. Il faut alors définir des conditions d'arrêt, portant notamment sur la taille minimale du simplex. La

rapidité de l'optimisation étant une contrainte non négligeable dans la problématique de la caractérisation de paramètres de complexation à partir d'un set de données expérimentales, c'est ce dernier type de simplex qui a été utilisé pour *PROSECE*.

Les remarques formulées précédemment, concernant l'éventuelle difficulté de trouver des conditions d'arrêt fiables, seront à prendre en compte dans la suite du travail et donc dans les valeurs optimisées par *PROSECE*.

e/ Synopsis du fonctionnement de *PROSECE*:

PROSECE est basé sur l'imbrication de ces deux modules de calcul de spéciation et d'optimisation. Supposons que *PROSECE* soit utilisé pour l'optimisation des propriétés d'acidité d'une MON à l'aide d'un modèle à q *quasi-particules* (chacune caractérisée par une concentration L_{iT} et une constante $K_{HL,i}$), à partir de N_{exp} valeurs de pH (i.e. concentration en H^+ libre) issues d'une titration acido-basique. Le processus d'optimisation est alors le suivant:

étape 1: initialisation

- définition arbitraire d'une distribution de q (par exemple 6) *quasi-particules* de type I (notées L_i), chacune caractérisée par une concentration L_{iT} et une constante d'acidité $K_{HL,i}$.
- initialisation des q valeurs de L_{iT} et $K_{HL,i}$ (la technique d'initialisation sera explicitée par la suite)
- mise en forme du *tableau d'équilibre* représentant le système chimique par N_c *composants principaux* (H^+ , Na^+ , L_i , NO_3^- , ...), N_s *composés* (OH^- , HL_i , ...) et N_r *réactions d'équilibres* ($H + L_i \Leftrightarrow HL_i$)
- définition des matrices: A (N_s+N_c lignes, N_c colonnes), K (dont q sont à optimiser)
- initialisation des concentrations totales (C_{tot} , dont q sont à optimiser) et libres (C) en *composants principaux* pour les N_{exp} points d'expérience.

étape 2: définition du simplex

- q concentrations et q constantes d'acidité sont à optimiser
- le simplex utilisé est donc constitué de $2 \times q + 1$ points dans un espace à $2 \times q$ dimensions
- il est représenté par une matrice notée **Sim**: $2 \times q + 1$ lignes et $N_c + N_s$ colonnes (la genèse de cette matrice sera explicitée plus loin)

étape 3: calcul de la spéciation chimique pour chaque point du simplex

- optimisation par la méthode de *Newton-Raphson* des concentrations libres en *composants principaux* (C) pour les N_{exp} points d'expérience.
- calcul des concentrations en *composés* (S)

étape 4: calcul de la valeur de *bias* pour chaque point du simplex

calcul du *bias*, par comparaison des valeurs de concentrations mesurées et calculées (H^+ libre), suivant la formule:

$$bias = \sum_{i=1}^{N_{exp}} abs \left(\ln [H^+]_{mes} \Big|_i - \ln [H^+]_{calc} \Big|_i \right) \quad (\text{eq. II.17})$$

étape 5: calcul du nouveau point de simplex

- détermination des coordonnées du nouveau point du simplex (symétrique du plus mauvais point par rapport au barycentre de tous les autres points du simplex)
- modification des q valeurs de concentrations et constantes d'acidité inconnues à partir des valeurs de la ligne du nouveau point du simplex
- retour à l'étape 3 sauf si le *bias* (eq. II.17) a atteint la valeur limite

Le calcul de *PROSECE* consiste donc à répéter les étapes 3 à 5 jusqu'à atteindre une valeur de *bias* suffisamment faible, en ajustant les q valeurs de concentrations et constantes d'acidité. Ce processus d'optimisation est schématisé par la figure II.7. Une fois l'optimum atteint, les propriétés d'acidité de la MON étudiée peuvent être représentées à l'aide d'un *chimio-type* caractérisé par les paramètres optimisés des q *quasi-particules* définies.

Remarquons que la valeur de *bias* limite qui doit être atteinte par *PROSECE*, permettant de dire que le fitting des données est correct, dépend principalement de la qualité des données, i.e. du bruit sur la ou les mesures (ici le pH). Cette valeur limite n'est donc pas toujours facile à estimer avant le calcul d'optimisation. Si la valeur de *bias* limite fixée est trop petite, l'optimisation ne peut pas converger, si elle est trop grande, l'optimisation est incorrecte. En ce sens, un second paramètre a été ajouté, permettant d'arrêter automatiquement l'optimisation. Il repose sur le calcul de la déviation standard de la matrice *Sim*. En début d'optimisation, cette valeur est très grande, elle diminue ensuite et, lorsque le simplex est stabilisé (i.e. à un point centroïde, figure II.6 II.D.2.d.1/), elle est très faible (de l'ordre de 10^{-10}). De ce fait, une valeur limite de la déviation standard sur *Sim* a été fixée à 10^{-5} . L'optimisation par *PROSECE* consiste donc à modifier les valeurs des paramètres inconnus jusqu'à atteindre soit le *bias* limite, soit la déviation standard de *Sim* limite.

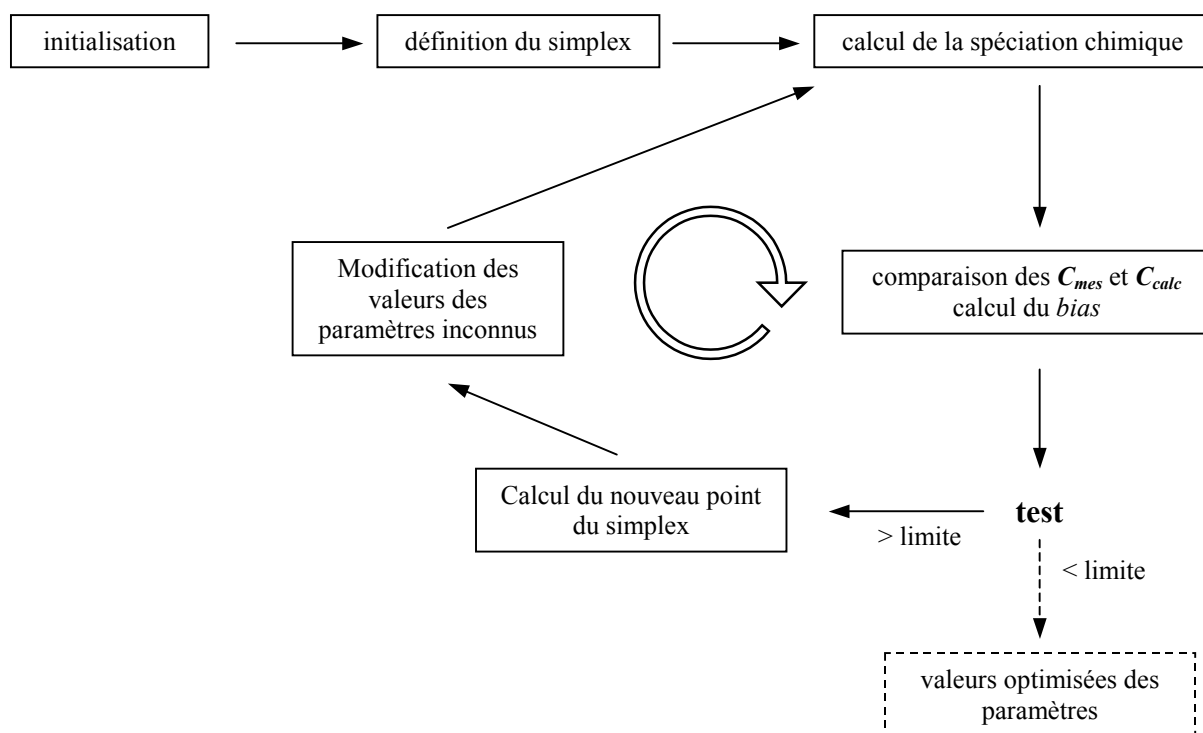


Figure II.7: Principe de fonctionnement du logiciel *PROSECE*

Généralement, la première étape d'une modélisation de propriétés d'une MON à l'aide de *PROSECE*, consiste à optimiser le nombre de *quasi-particules* (q) permettant d'obtenir la meilleure simulation des données expérimentales.

Des conditions ont été ajoutées au module d'optimisation pour que les concentrations totales optimisées (par exemple en site complexant le Cd) ne puissent pas converger vers des valeurs négatives, sauf dans le cas particulier du proton. En effet, compte tenu des relations entre le proton et les hydroxydes (i.e. coefficients stœchiométriques α_{ji} négatifs), la concentration totale en proton tend vers une valeur négative lorsque le pH est basique.

Pour simplifier les calculs, le module d'optimisation de *PROSECE* fonctionne à partir du nombre de moles et non à partir des concentrations. En effet, au cours d'une titration acido-basique par exemple, les concentrations totales en sites acides (L_{iT}) varient par dilution, ce qui n'est pas le cas de leurs nombre de moles (n_{LiT}). Ces dernières sont donc constantes pour tout point d'une même titration. La "modification des valeurs des paramètres inconnus" (figure II.7) consiste donc à modifier les valeurs initiales de n_{LiT} par l'ajout d'une valeur identique δn_{LiT} pour l'ensemble des points expérimentaux.

Dans ce travail de thèse, *PROSECE* a été utilisé pour déterminer les propriétés de complexation et/ou d'acidité, voire de fluorescence, de ligands à partir du fitting d'expériences

simulées (II.E/ et II.F/), qui ont permis de le comparer à d'autres techniques de traitement de données, ou d'expériences réalisées sur des échantillons naturels (IV.B/, IV.C/, IV.D/ et IV.E/) en utilisant les techniques analytiques spécifiques détaillées au chapitre III/.

II.E/ Comparaison théorique de PROSECE à d'autres traitements mathématiques de données de complexation:

Cette étude a fait l'objet de la rédaction d'une publication, parue en 2004 dans la revue *Analytica Chimica Acta*, sous le titre: "The influence of the type of titration and of data treatment methods on metal complexing parameters determination of single and multi ligand systems measured by stripping voltammetry", Cédric Garnier, Ivanka Pižeta, Stéphane Mounier, Jean Yves Benaïm, Marko Branica, volume 505, pages 263-275. (Annexe II.2)

II.E.1/ Problématique - objectifs:

Afin de caractériser les propriétés de complexation d'eaux naturelles, différentes méthodes de traitement de données ont été développées. Elles reposent sur le fitting de données issues d'expériences voltamétriques ou potentiométriques (ASV-CSV, ISE, ...). Les premières méthodes sont basées sur une transformation mathématique de ces données (Buffle, 1981 ; Chau et Lum-Shue-Chan, 1974 ; Ružić, 1982 ; Scatchard, 1949 ; Turoczy et Sherwood, 1997 ; Van den Berg, 1982a, 1982b, 1984), visant à les linéariser. Elles sont donc facilement applicables, principalement pour des systèmes 1-métal – 1-ligand. L'amélioration de la précision analytique des techniques et leur automatisation, a conduit à la définition de modèles à deux ligands. Dans ce cas, la transformation mathématique des données expérimentales (linéarisation de Ružić et Scatchard à deux ligands, (Ružić, 1982 ; Scatchard, 1949)), suivie d'une linéarisation partielle de ces données, permet le calcul des paramètres de complexation des ligands. Ces techniques de linéarisation sont encore actuellement utilisées pour définir les propriétés de complexation d'échantillons naturels vis-à-vis de Cd, Pb, Cu, ... (Abate et Masini, 2002 ; Kozelka et Bruland, 1998 ; Muller, 1996 ; Muller, 1999 ; Rozan et Gaboury, 1999a ; Verweij et Ružić, 1997 ; Wells *et al.*, 1998 ; Xue et Sigg, 1998). Cependant, des techniques plus modernes de traitement de données, basées sur un calcul d'optimisation des paramètres de complexation à partir du fitting des données expérimentales, ont été développées. Elles permettent l'élaboration de modèles plus complexes prenant en compte de nombreuses interactions chimiques (Dzombak *et al.*, 1986 ; Hirose, 1994 ; Huber *et al.*, 2002 ; Kinniburgh *et al.*, 1996 ; Perdue et Lytle, 1983 ; Sposito, 1981 ; Tipping et Hurley, 1992 ; Tipping, 1993 ; Van Den Hoop *et al.*, 2002), rendus possibles par le développement d'outils informatiques performants. Utilisant l'ensemble des points expérimentaux, ces techniques éliminent la division arbitraire de la courbe en sous-sections quasi-linéaires, obligatoire pour les techniques de linéarisations (Fish *et al.*, 1986). Ces techniques utilisent soit des données expérimentales brutes, soit des données transformées suivant les approches de Ružić ou Scatchard (Gerringa *et al.*, 1995 ; Pižeta et Branica, 1997). De plus, elle permettent la détermination de plus de deux groupes de ligands (Lu et Allen, 2002), ce qui semble plus adapté pour l'étude des propriétés de ligands dans les eaux naturelles.

Les travaux portant sur l'étude des propriétés de complexation d'échantillons naturels sont basés sur des données expérimentales obtenues par titration (i.e. ajouts de métal) des échantillons, couplée à des mesures par ASV, CSV, ISE, fluorescence, (Bruland *et al.*, 2000 ; Kinniburgh *et al.*, 1996 ; Lu et Allen, 2002 ; Tipping et Hurley, 1992 ; Vasconcelos et Leal, 2001b). Le nombre d'ajouts, leur répartition et la gamme de concentration couverte, qui caractérisent ces titrations, sont généralement assez arbitraires. Cependant, pour l'analyse de systèmes multi-ligands, ces caractéristiques sont certainement importantes pour déterminer correctement les paramètres de complexation, en particulier car ils sont dépendants de la technique analytique utilisée (i.e. détection limite, fenêtre analytique, ...).

Une première étude ayant pour but d'analyser l'influence de la répartition des ajouts de métaux (modes linéaire, décade et logarithmique) sur les résultats du fitting de données simulées a été envisagée. Les points "expérimentaux" simulés seront traités par trois techniques de linéarisation: Chau-Buffle (Buffle, 1981 ; Chau et Lum-Shue-Chan, 1974), Scatchard (Scatchard, 1949), et Ružić – van den Berg (Ružić, 1982); et deux techniques d'optimisation: fitting non-linéaire (Pižeta et Branica, 1997) et *PROSECE*. L'objectif est d'optimiser les conditions pour obtenir les résultats les plus fiables possibles, i.e. déterminer (i) l'imprécision de chaque méthode sur le calcul des paramètres de complexations, et (ii) quelle méthode est la plus rigoureuse pour chaque exemple de K_i , L_{iT} simulé.

II.E.2/ Simulation des points "expérimentaux":

La simulation des points expérimentaux, i.e. leur génération numérique, est pratique pour une analyse comparative comme celle qui va être faite dans cette étude. Cette dernière a été limitée à l'analyse de systèmes simples métal-ligand 1:1, dans le cas d'un ou de deux ligands avec un seul métal. Afin de calculer chaque point, en accord avec le type de titration, le programme MINEQL a été utilisé. Quand le nombre de ligands est supérieur à 1, le calcul de spéciation n'est plus trivial, et donc nécessite l'utilisation d'un logiciel adéquat pour déterminer la concentration exacte en métal libre pour chaque ajout de métal (Pižeta et Branica, 1997).

En vue d'une systématisation, les gammes de concentrations balayées et le nombre d'ajouts en métal titré ont été déterminées en fonction du nombre de ligands analysés. Les limites de concentrations ont été basées sur la fenêtre analytique des méthodes électrochimiques (ASV et CSV) utilisées pour la détermination des interactions d'échantillons naturels avec les métaux traces. Il a été montré qu'il était difficile de déterminer plus de quatre différentes catégories de ligands (Lu et Allen, 2002 ; Rozan et Gaboury, 1999a ; Verweij et Ružić, 1997). En pratique, la fenêtre analytique couvre rarement plus de 4 décades (par exemple, $pM_T = -\log(M_T)$ de 10 à 6), M_T étant la concentration totale en métal M. L'utilisation de burettes automatiques contrôlées par ordinateur, permet de faire un grand nombre d'ajouts, ce nombre étant tout de même limité par la durée totale de la titration (**III.B**). En accord avec ces restrictions, les conditions suivantes ont été appliquées:

- pour un ligand, la gamme de concentration balayée par les ajouts de métaux a été fixée à 2 décades (1 nM à 100 nM), définie par 20 points,
- pour 4 ligands, la gamme de concentration balayée par les ajouts de métaux a été fixée à 4 décades (1 nM à 10000 nM), définie par 35 points.

Elles sont a priori réalistes et suffisantes comparées aux expériences similaires menées sur des échantillons naturels (Kozelka et Bruland, 1998 ; Muller, 1996 ; Vasconcelos et Leal, 2001b ; Wells *et al.*, 1998). Par interpolation, un simple calcul conduit à 2.66 décades pour 2 ligands, i.e. 1 nM à 457 nM, définis par 25 points d'ajouts.

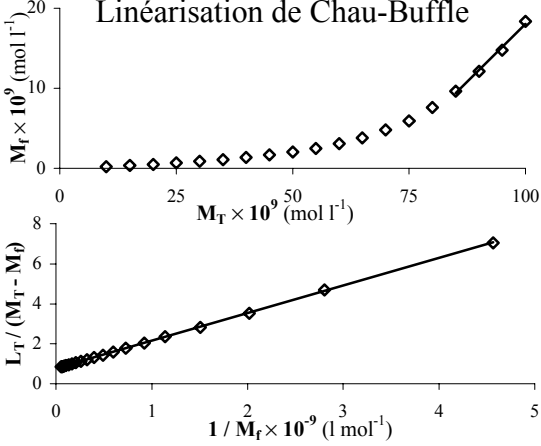
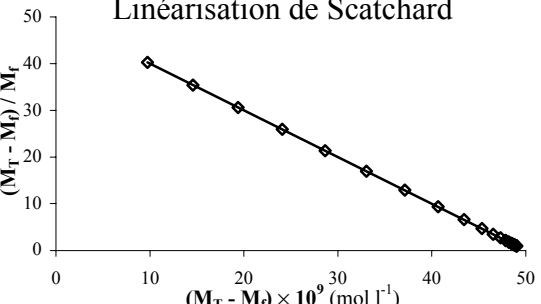
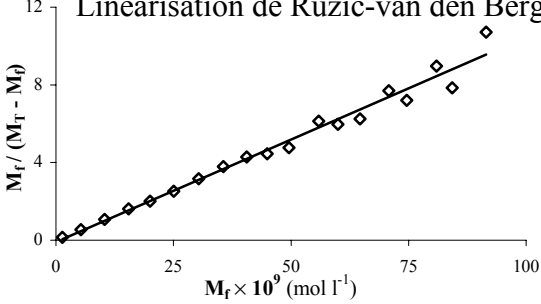
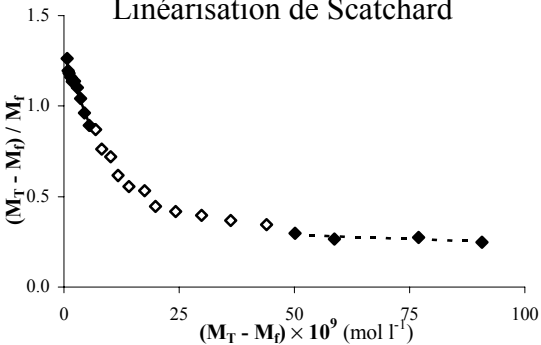
Afin d'analyser l'effet du mode de titration sur la modélisation, trois stratégies différentes d'ajouts non-arbitraires de métaux ont été simulées: ajouts linéaire, décade, logarithmique ; en considérant qu'ils étaient envisageables par l'utilisation de burettes automatiques dans une expérience réelle.

Ces trois méthode consistent respectivement, pour $i = 1$ à n ajouts:

- incréments constants de M_T , i.e. $M_{T,i} = \frac{M_{T,n}}{n}$
- incréments constants de M_T sur une décade de concentration, i.e. pour 1 nM à 10 nM: $M_{T,i} = i \times 10^{-9}$, pour 10 nM à 100 nM: $M_{T,i} = (i-10) \times 10^{-8}$, ...
- incréments constants de pM_T , i.e. $M_{T,i} = 10^{-\left(pM_{T,0} + (pM_{T,0} - pM_{T,n}) \frac{i}{n}\right)}$

où: n est le nombre total de points d'une titration,

$M_{T,0}$, $M_{T,n}$, $M_{T,i}$ sont les concentrations en métal total initiale, finale et du $i^{\text{ème}}$ point.

Présentation graphique	Traitement mathématique
Systèmes à 1 ligand: linéarisations	
<p style="text-align: center;">Linéarisation de Chau-Buffle</p> 	<p>Régression linéaire des derniers points de la courbe</p> $M_f = a.M_T + b$ <p>L_T est déterminé par extrapolation: $L_T = -\frac{b}{a}$</p> <p>Linéarisation des points expérimentaux suivant $\frac{L_T}{M_T - M_f} = \frac{c}{M_f} + d$, où L_T est déterminé par la méthode de Chau.</p> $K = \frac{1}{c} \quad (d=1)$
<p style="text-align: center;">Linéarisation de Scatchard</p> 	<p>Transformation mathématique des points expérimentaux suivant:</p> $\frac{M_T - M_f}{M_f} = f(M_T - M_f)$ <p>Régression linéaire: $\frac{M_T - M_f}{M_f} = a(M_T - M_f) + b$</p> $K = -a \quad L_T = -\frac{b}{a}$
<p style="text-align: center;">Linéarisation de Ružić-van den Berg</p> 	<p>Transformation mathématique des points expérimentaux suivant:</p> $\frac{M_f}{M_T - M_f} = f(M_f)$ <p>Régression linéaire: $\frac{M_f}{M_T - M_f} = a.M_f + b$</p> $K = \frac{a}{b} \quad L_T = \frac{1}{a}$
Systèmes à 2 ligands: linéarisations	
<p style="text-align: center;">Linéarisation de Scatchard</p> 	<p>Transformation mathématique des points expérimentaux suivant:</p> $\frac{M_T - M_f}{M_f} = f(M_T - M_f)$ <p>Régression linéaire des premiers points et des derniers points:</p> $Y_1 = a(M_T - M_f) + b \quad \text{et} \quad Y_2 = c(M_T - M_f) + d$ <p>Calcul de $L_{1T}, L_{2T}, K_1, K_2 = f(a, b, c, d)$</p>

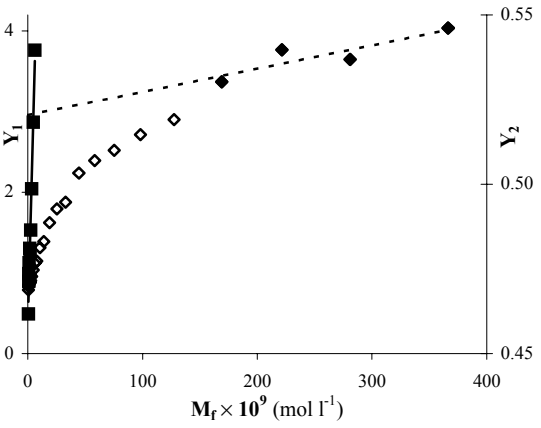
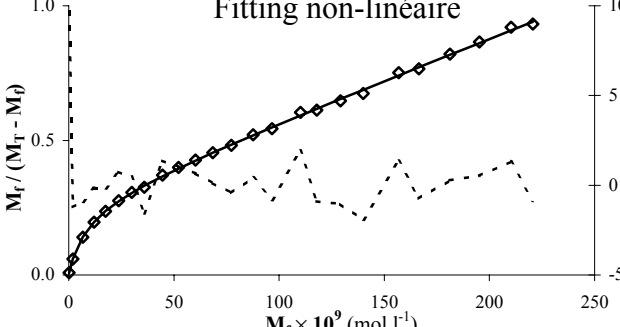
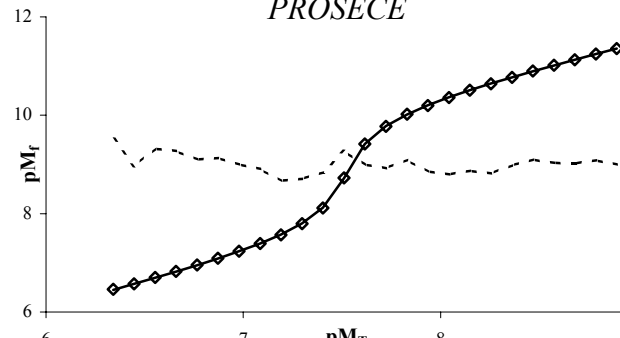
<p style="text-align: center;">Linéarisation de Ružić</p> 	<p>Transformation mathématique des points expérimentaux suivant:</p> $\frac{M_f}{M_T - M_f} = f(M_f)$ <p>Régression linéaire:</p> <ul style="list-style-type: none"> - $Y_1 = \left(\frac{M_f}{M_T - M_f} \right)_{M_f \rightarrow \infty} = a.M_f + b$ - $Y_2 = \frac{1}{a.M_f + b - \left(\frac{M_f}{M_T - M_f} \right)_{M_f \rightarrow \infty}} = c.M_f + d$ <p>Calcul de $L_{1T}, L_{2T}, K_1, K_2 = f(a, b, c, d)$</p>
<p>Systèmes à 1 ou 2 ligands: fitting</p>	
<p style="text-align: center;">Fitting non-linéaire</p> 	<p>Après linéarisation de Ružić – van den Berg, pour plus d'1 ligand (N>1), fitting non-linéaire basé sur la méthode de Levenberg-Marquardt:</p> $\frac{M_f}{(M_T - M_f)} = 1 / \sum_{i=1}^N \left(\frac{L_{iT}}{M_f + \frac{1}{K_i}} \right)$
<p style="text-align: center;">PROSECE</p> 	<p>cf. partie II.D.2/</p>

Tableau **II.1**: principe des méthodes de traitement de données utilisées pour la détermination des propriétés de complexation de métaux

Après définition des concentrations totales en métal d'une titration, et du modèle chimique (un ou deux ligands), les concentrations en métal libre M_f sont simulées par MINEQL. Pour rendre réalistes ces données simulées, un bruit aléatoire compris entre -2% et $+2\%$ a été ajouté avant le fitting, ceci en considérant les travaux réalisés par Pižeta et Branica (1997) sur l'influence du bruit (0 à 10 %) et en tenant compte de l'amélioration en termes de sensibilité et de reproductibilité des appareils électrochimiques. Le set de valeurs de bruit aléatoire varie d'une expérience simulée à une autre mais reste inchangé pour la même expérience traitée par les trois modes de titrations.

II.E.3/ Techniques de traitement de données:

Les techniques de traitement de données retenues pour cette étude comprennent trois méthodes de linéarisation: a) régression linéaire proposée par Chau, combinée avec la linéarisation proposée par Buffle, b) linéarisation après transformation mathématique de Scatchard, c) linéarisation après transformation mathématique de Ružić-van den Berg ; et deux méthodes d'optimisation: (i) fitting non-linéaire des données transformées par la méthode de Ružić-van den Berg quand elles ne sont pas linéaires, (ii) *PROSECE*.

Les principes de fonctionnement de ces différentes techniques sont résumés dans le tableau **II.1**. M_T est la somme du métal initialement présent dans l'échantillon (M_0) et du métal ajouté (M_a) lors de la titration. M_f représente le métal non-organique, i.e. le métal qui ne forme pas de complexes inertes avec le ligand, mesuré par voltamétrie.

Théoriquement, les méthodes basées sur la transformation mathématique des données (la linéarisation dans notre cas) sont plus sensibles au bruit sur M_f que les méthodes utilisant des données non-modifiées (*PROSECE*). En effet, les transformations induisent une propagation du bruit qui influence les deux axes $y, x = f(M_f, M_T)$.

II.E.4/ Résultats obtenus:

Pour les systèmes à 1 ou 2 ligands étudiés, les données (M_f, M_T) ont été générées en fixant les valeurs des paramètres de complexations (K_i, L_{iT}). Ces valeurs seront désignées dans la suite de l'étude comme "théoriques" ou encore "prévues". Elles seront donc comparées aux valeurs "calculées" ou "optimisées", obtenues pour les différentes techniques de traitement de données définies. Les écarts entre les valeurs "théoriques" et "calculées" des paramètres de complexation seront qualifié d'"erreurs". Ces "erreurs" seront à distinguer des "intervalles de confiance" pondérant les valeurs "calculées" des paramètres (techniques de linéarisation).

a/ Systèmes à un ligand:

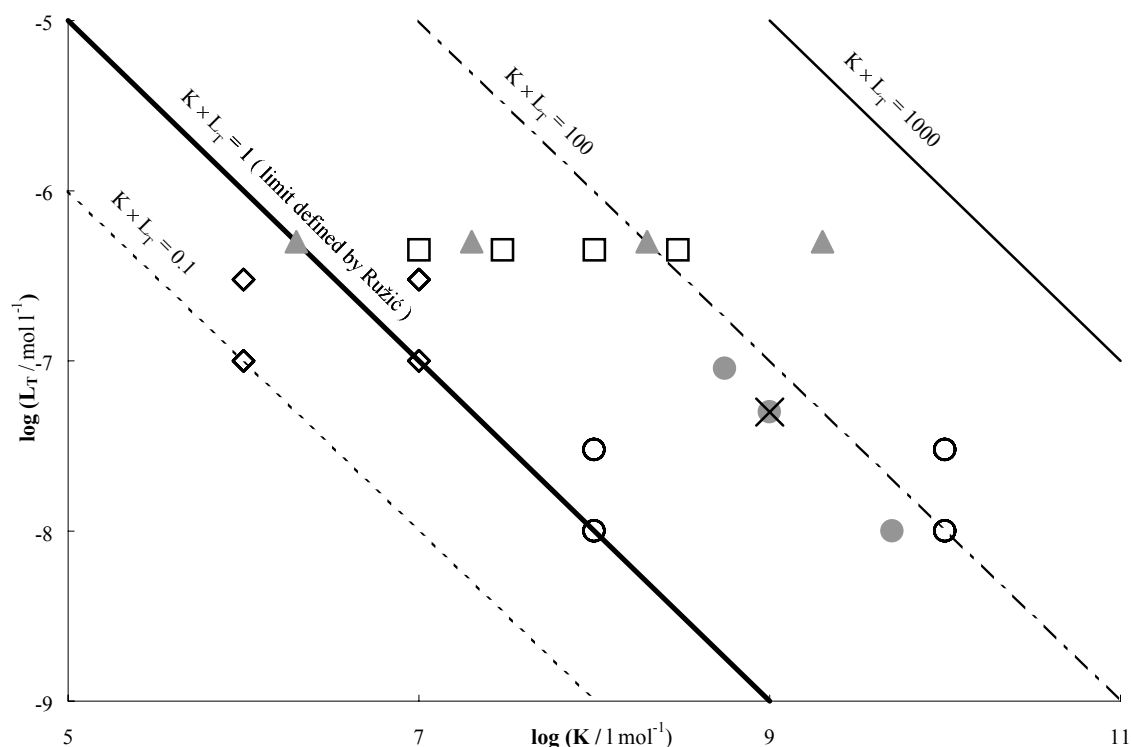


Figure **II.8**: Répartition des propriétés de complexation des ligands utilisés dans cette étude (●: système à 1 ligand, ○: 1^{er} ligand du système à 2 ligands, ◇: 2nd ligand du système à 2 ligands) ainsi que celles de Pižeta et Branica (1997) (▲: système à 1 ligand, ×: 1^{er} ligand du système à 2 ligands, □: 2nd du système à 2 ligands)

Il a été montré que le produit $K \times L_T$ devait être supérieur à 1 pour que les paramètres de complexations soient correctement déterminés (Ružić, 1982). Trois expériences ont donc été simulées avec un produit $K \times L_T$ de 50, et respectivement des valeurs de L_T : 10, 50 et 90 nmol.l^{-1} et K : 5×10^9 , 1×10^9 et $5.56 \times 10^8 \text{ l.mol}^{-1}$. Les positions de ces couples (K , L_T) sont présentés dans la figure II.8, ce qui permet de montrer qu'ils sont dans des zones de valeurs réalistes.

Les données (M_f , M_T) simulées de titrations en modes linéaire, décade et logarithmique sont représentées sur le graphique II.9.

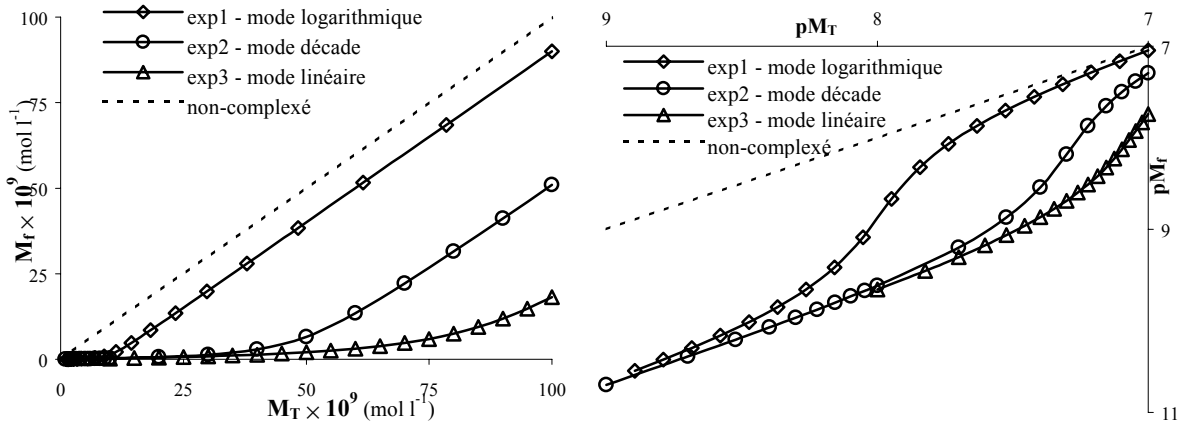


Figure II.9: titrations non-bruitées pour le modèle à 1 ligand (les valeurs des paramètres correspondant sont signalés par (*) dans le tableau II.2a)

Tous les résultats obtenus pour le système à un ligand sont résumés dans le tableau II.2a. Les valeurs obtenues par les différents traitements de données utilisés y sont présentées en comparaison aux valeurs prévues (K_{th} , L_{th}). Les valeurs d'intervalle de confiance (notées e_1) des paramètres calculés sont données en % ($\Delta K\%$ et $\Delta L_T\%$) lorsqu'elles ont pu être calculées. Les erreurs entre les valeurs calculées et les valeurs prévues ont été notées e_2 . Ces valeurs ne sont pas mentionnées dans le tableau II.2a mais sont représentées graphiquement sur la figure II.10, qui a été générée à partir du logiciel *Surfer 6*.

		Linéaire			Logarithmique			Décade		
		exp 1	exp 2	exp 3 (*)	exp 1 (*)	exp 2	exp 3	exp 1	exp 2 (*)	exp 3
Linéarisation de Chau-Buffle	K_{th}	5.00 E+09	1.00 E+09	5.56 E+08	5.00E+09	1.00 E+09	5.56 E+08	5.00E+09	1.00 E+09	5.56 E+08
	L_{Tth}	1.00 E-08	5.00 E-08	9.00 E-08	1.00E-08	5.00 E-08	9.00 E-08	1.00E-08	5.00 E-08	9.00 E-08
	K	3.95 E+09	1.05 E+09	7.25 E+08	4.50 E+09	1.02 E+09	7.62 E+08	4.01 E+09	1.06 E+09	6.94 E+08
Linéarisation de Ružić-van den Berg	$\Delta K\%$	110.7	0.5	0.6	1.3	0.6	0.7	1.3	0.5	0.5
	L_T	1.54 E-08	4.75 E-08	6.88 E-08	1.10 E-08	4.87 E-08	6.54 E-08	1.23 E-08	4.70 E-08	7.19 E-08
	$\Delta L_T\%$	121.4	18.7	23.5	33.4	ND	ND	0.0	0.0	ND
Linéarisation de Scatchard	K	-1.15 E+09	1.03 E+09	5.58 E+08	-2.54 E+09	1.02 E+09	5.56 E+08	-3.55 E+09	1.01 E+09	5.56 E+08
	$\Delta K\%$	-466.8	11.9	1.0	-427.5	5.8	0.6	-779.4	7.7	0.7
	L_T	9.48 E-09	4.96 E-08	8.97 E-08	9.25 E-09	4.95 E-08	8.96 E-08	9.45 E-09	4.96 E-08	8.97 E-08
PROSECE	$\Delta L_T\%$	7.7	0.5	0.2	5.4	0.4	0.2	5.6	0.4	0.2
	K	9.52 E+08	1.00 E+09	5.55 E+08	5.00 E+09	9.97 E+08	5.57 E+08	4.98 E+09	9.99 E+08	5.56 E+08
	$\Delta K\%$	67.2	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
PROSECE	L_T	1.04 E-08	4.97 E-08	8.99 E-08	9.90 E-09	4.98 E-08	8.96 E-08	9.90 E-09	4.98 E-08	8.97 E-08
	$\Delta L_T\%$	162.4	1.5	1.3	7.6	1.3	1.5	9.7	1.2	1.3
	K	4.81 E+09	1.01 E+09	5.62 E+08	4.92 E+09	9.90 E+08	5.59 E+08	4.94 E+09	1.00 E+09	5.59 E+08
PROSECE	$\Delta K\%$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	L_T	1.00 E-08	4.97 E-08	8.95 E-08	1.00 E-08	4.98 E-08	8.96 E-08	1.00 E-08	4.97 E-08	8.96 E-08
	$\Delta L_T\%$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(*) données simulées représentées sur la figure II.9

Tableau II.2a: Résultats obtenus pour le système à un ligand

Les corrélations entre e_1 et e_2 sont compilées dans le tableau II.2b. Elles montrent qu'il y a une corrélation évidente entre ces deux types de valeurs pour les techniques de linéarisation, les

intervalles de confiance peuvent donc être utilisés pour prédire l'efficacité de la détermination d'un paramètre pour une méthode de traitement.

	Linéarisation de Chau-Buffle	Linéarisation de Ružić-van den Berg	Linéarisation de Scatchard	PROSECE
K_1	0.231	0.993	0.864	ND
L_{IT}	0.560	0.980	0.919	ND

Tableau II.2b: Coefficients de corrélation (R) entre les valeurs de $\log(e_1)$ et $\log(e_2)$

Compte tenu des résultats obtenus, leur analyse a été séparée en fonction du mode de titration utilisé: (i) linéaire, (ii) logarithmique et décade.

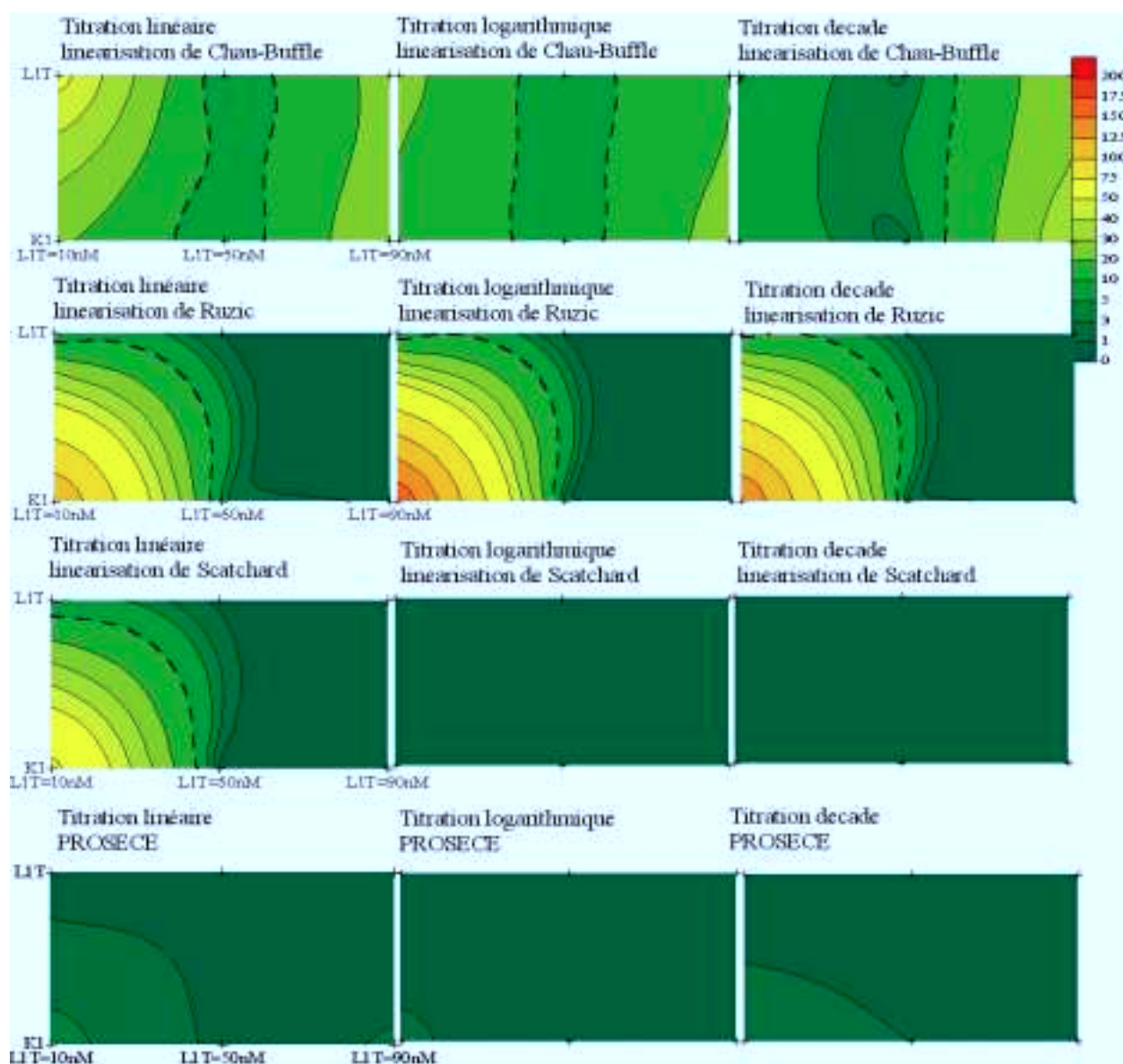


Figure II.10: Représentation des erreurs e_2 (en %) sur la détermination de K et L_T pour les trois expériences (différenciées par les valeurs théoriques de L_T) traitées par les différents modes de titration et les techniques de traitement de données.

a.1/ Titration linéaire:

Les résultats obtenus pour le mode linéaire ont permis de distinguer nettement les différentes techniques de traitement de données. Ainsi, les erreurs sur les paramètres K et L_T varient respectivement de 0.1% à 122.9% et 0.0% à 54.5%, en fonction de l'expérience et de la technique.

PROSECE est la seule technique qui permette une détermination correcte des valeurs de ces deux paramètres de complexation, quelque soit la valeur de L_T dans la fenêtre analytique étudiée (erreurs comprises entre 0.6% et 3.9% pour K , et entre 0.0% et 0.6% pour L_T), malgré le bruit aléatoire ajouté aux données simulées.

Les techniques de linéarisation de Ružić-van den Berg et Scatchard conduisent à des résultats corrects seulement lorsque la concentration en ligand est suffisamment forte (erreurs inférieures à 3% pour K et L_T). Au contraire, l'expérience 1 représentant des ligands peu concentrés, conduit à une valeur négative de K pour Ružić-van den Berg, et une erreur très forte pour Scatchard. Ceci montre l'inadéquation du mode linéaire couplé à des techniques de linéarisation pour la détermination des propriétés de complexation de ligands faiblement concentrés. Ce phénomène est clairement visible sur la figure **II.10**.

La linéarisation de Chau-Buffle conduit à des résultats corrects pour le cas intermédiaire, i.e. L_T centrée sur la fenêtre analytique utilisée (forme de la courbe de l'expérience 2 sur la figure **II.9**), mais des résultats plus mauvais pour les cas extrêmes. Pour ces deux configurations, la méthode d'extrapolation de L_T est en cause mais les raisons sont différentes. Dans le cas des L_T faibles, les derniers points utilisés pour la linéarisation de Chau sont trop éloignés de la courbure, la méthode est alors trop sensible à l'erreur sur la concentration en M_f . Dans le cas de concentrations fortes en ligand, la valeur maximale de la concentration en M_T n'est pas assez élevée pour dépasser largement L_T , il y a alors sous-estimation de la valeur de L_T puisque les points (M_f , M_T) sont dans la courbure (forme de la courbe de l'expérience 3 sur la figure **II.9**). Ces deux phénomènes entraînent une mauvaise définition de K par la linéarisation de Buffle, utilisant pour valeur de L_T celle déterminée par Chau.

D'une manière générale, ce mode titration ne semble adapté à la détermination de K et L_T que pour de fortes concentrations en ligands, i.e. lorsqu'il y a suffisamment de points avant la courbure. Dans ce cas, les linéarisations de Ružić-van den Berg et Scatchard donnent des résultats fiables. Toutefois, *PROSECE* utilisant l'ensemble des données sans modifications par une transformation mathématique, conduit à des résultats corrects même pour des valeurs faibles de L_T .

a.2/ Titrations logarithmique et décade:

En général, les résultats obtenus par les ajouts en modes décade et logarithmique sont améliorés par rapport à ceux obtenus pour le mode linéaire (erreurs sur K et L_T globalement faible sur la figure **II.10**), mais ils ne permettent pas de distinguer ces deux techniques de titration.

La linéarisation de Scatchard et le programme d'optimisation *PROSECE* permettent la détermination de K et L_T avec des valeurs d'erreurs très faibles (inférieures à 1.7%), quelque soit la position de L_T sur la gamme de concentrations scannées. Ainsi, ces modes de titrations accroissent clairement la sensibilité sur l'optimisation des paramètres de complexation, particulièrement pour des valeurs faibles de L_T .

Au contraire, elles n'améliorent pas la capacité de la linéarisation de Ružić-van den Berg à déterminer la constante de stabilité, qui est toujours négative lorsque la valeur de L_T est faible.

Les erreurs sur les valeurs de K et L_T obtenues par la linéarisation de Chau-Buffle sont faiblement diminuées, notamment pour l'expérience 1.

a.3/ Conclusions:

Dans le cas d'un système métal-ligand 1:1, ces expériences réalisées avec une valeur constante de $K \times L_T$, ont montré qu'un processus de fitting utilisant des données non-modifiées, tel

que *PROSECE*, est la technique la plus efficace, ceci malgré l'apparente simplicité du système chimique étudié. En effet, les résultats obtenus sont proches des valeurs prévues, indépendamment du mode de titration ou de la concentration en ligand (figure II.10).

En augmentant la définition pour les concentrations faibles en métal, les titrations logarithmique et décade accroissent fortement la sensibilité de la linéarisation de Scatchard, permettant dans ce cas de modéliser correctement les deux paramètres de complexation, quelque soit la concentration en ligand.

Au contraire, la linéarisation de Ružić-van den Berg, dépendante des concentrations fortes en M (à cause de la transformation mathématique utilisée), semble peu adaptée à la détermination des propriétés de complexation de ligands peu concentrés, ce qui est fréquent dans des échantillons naturels. Les erreurs obtenues ne sont pas minimisées par l'utilisation de titrations non-linéaires.

La méthode de Chau-Buffle, utilisant deux linéarisations successives, conduit à des résultats globalement moins fiables que ceux obtenus par les autres techniques de traitement de données.

b/ Systèmes à deux ligands:

Au contraire du système à un ligand, où seulement trois expériences simulées ont été réalisées avec une valeur de $K \times L_T$ fixée, pour les systèmes à deux ligands le nombre et le type d'expériences n'ont pas été déterminés arbitrairement mais à l'aide d'une matrice factorielle (Massart *et al.*, 1997). Considérant deux ligands, définis par quatre paramètres de complexation (K_i et L_{iT}), $2^4 = 16$ expériences sont à simuler en utilisant des valeurs hautes (+) et basses (-) pour chacun de ces paramètres. Les résultats précédemment obtenus, montrant l'influence des valeurs des paramètres de complexation et de l'intensité du bruit aléatoire ajouté sur l'extraction des données simulées (Gerringa *et al.*, 1995 ; Pižeta et Branica, 1997; Ružić, 1982; Turoczy et Sherwood, 1997; Verweij et Ružić, 1997), ainsi que l'utilisation de différentes techniques analytiques et de différents modèles pour la détermination de ces paramètres sur des échantillons naturels (Abate et Masini, 2002; Dzombak *et al.*, 1986 ; Hirose, 1994 ; Huber *et al.*, 2002 ; Kinniburgh *et al.*, 1996 ; Kozelka et Bruland, 1998 ; Muller, 1996 ; Muller, 1999 ; Perdue et Lytle, 1983 ; Rozan et Gaboury, 1999a ; Sposito, 1981 ; Tipping et Hurley, 1992 ; Van Den Hoop *et al.*, 2002 ; Verweij et Ružić, 1997 ; Wells *et al.*, 1998 ; Xue et Sigg, 1998), ont conditionné le choix des valeurs de K_i et L_{iT} pour cette étude. Ainsi, les valeurs (+) et (-) de K_1 , K_2 , L_{1T} , L_{2T} sont respectivement de: 10^{10} et 10^8 , 30 nM et 10 nM, 10^7 et 10^6 , et 300 nM et 100 nM (i.e. $K_1 \times L_{1T}$: 1 à 300, $K_2 \times L_{2T}$: 0.1 à 3, K_1/K_2 : 10^4). Le tableau II.3 représente les valeurs utilisées pour les 16 expériences simulées, en se basant sur la représentation matricielle de Yates (Massart *et al.*, 1997).

Les deux ligands ainsi définis visent à représenter deux catégories de sites de complexation analysables sur des échantillons naturels: (1) les ligands forts, peu concentrés : (2) les ligands faibles, concentrés.

	+	-
L_{1T}	30nM	10nM
K_1	10^{10}	10^8
L_{2T}	300nM	100nM
K_2	10^7	10^6

n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
L_{1T}	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
K_1	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
L_{2T}	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
K_2	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+

Tableau II.3: Systèmes à 2 ligands, valeurs des paramètres de complexations utilisées pour simuler les expériences

Trois expériences (n°3, 5 et 7), parmi les 16 simulées à l'aide de MINEQL, ont été représentés en utilisant des échelles $M_f = f(M_T)$ et $pM_f = f(pM_T)$ pour les trois modes de titration définis (figure II.11). Les expériences 3 et 5 ne peuvent pas être distinguées en mode linéaire, quelque soit l'échelle considérée, alors qu'elles sont significativement différentes dans les modes de titration logarithmique et décade en utilisant l'échelle $pM_f = f(pM_T)$.

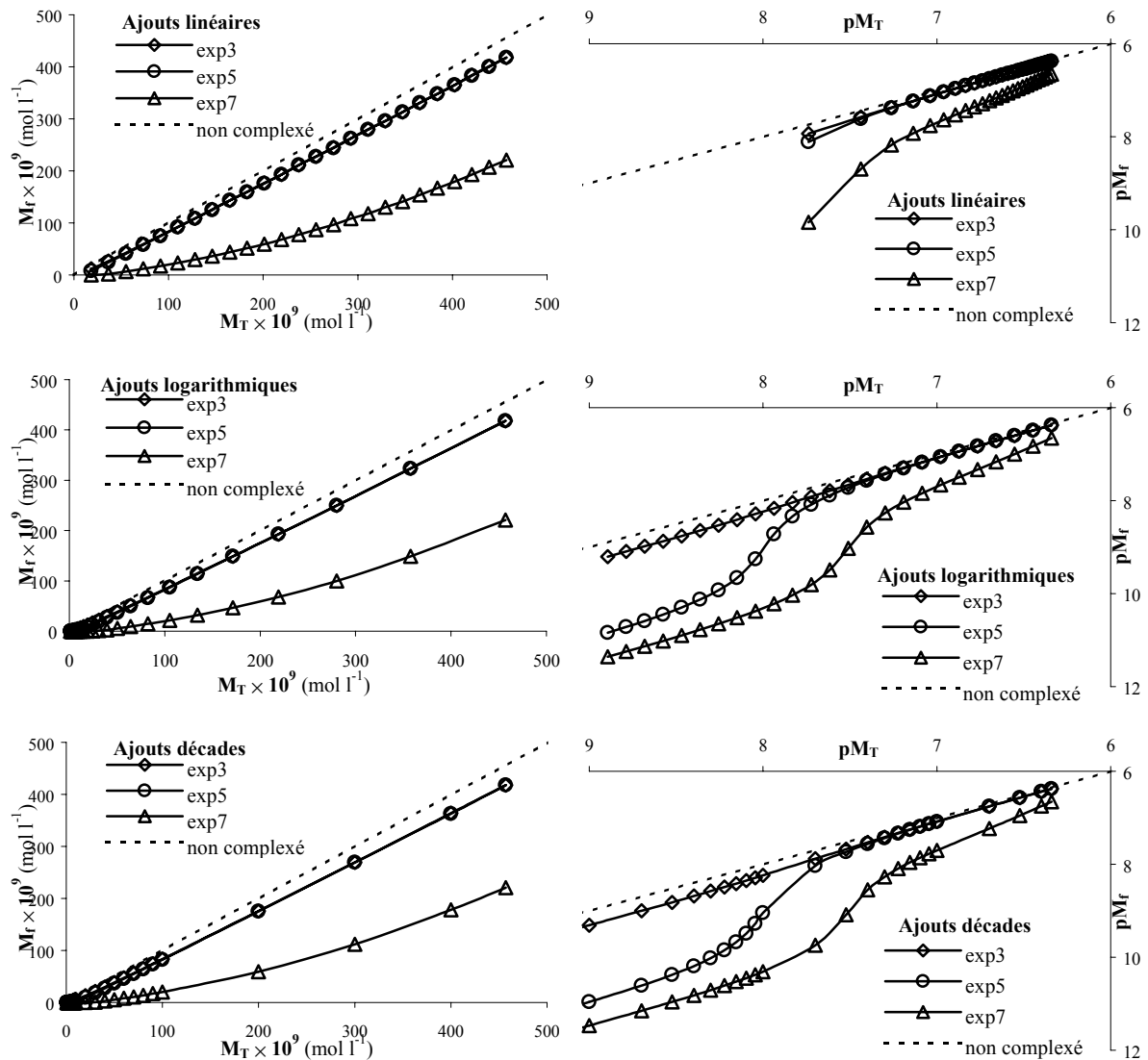


Figure II.11: titrations simulées non-bruitées pour les expériences n°3, 5 et 7

Rappels sur la méthode de Yates (Massart et al., 1997):

Supposons le cas simple de deux paramètres A et B dont on souhaite estimer l'influence sur une réponse R . A chaque paramètre, il faut attribuer une valeur (+) et une (-). Le nombre total d'expérience à réaliser est donc de $2^2 = 4$. Alors, la matrice factorielle est:

n°	A	B	expérience
1	-	-	T
2	+	-	A
3	-	+	B
4	+	+	AB

Différentes méthodes existent pour déterminer l'effet (t, a, b, ab) de chacun des facteurs (T, A, B, AB) sur la réponse R . En fait, on cherche à exprimer la réponse R par l'équation:

$$R = t + a \times A + b \times B + ab \times A \times B$$

La méthode de Yates est l'une des plus simple puisqu'elle repose sur un calcul en colonne. Elle permet donc de calculer t, a, b et ab (a étant la valeur de l'effet du paramètre A sur la réponse R). Une valeur faible obtenue pour a signifie que le paramètre A n'a pas beaucoup d'influence sur l'erreur R . ab est la valeur de l'effet du facteur combiné AB , permettant par exemple de savoir si $K_I \times L_{IT}$ a plus d'effet que K_I seul.

Ainsi, pour une expérience "virtuelle" ayant pour valeurs de paramètres: A' et B' , on peut estimer l'erreur R' par:

$$R' = t + a \times A' + b \times B' + ab \times A' \times B'$$

Imaginons que l'on souhaite minimiser l'erreur R . On peut ainsi, après avoir calculé t , a , b et ab (par la méthode de Yates), chercher la combinaison A' et B' qui nous donne l'erreur R' proche de 0 (en utilisant le solveur d'Excel par exemple).

Remarques:

- (i) cette méthode n'est applicable que dans le cas où la réponse R a une variation linéaire lorsqu'un paramètre (par exemple A) passe de la valeur (-) à la valeur (+).
- (ii) pour ce qui est de la chimie, on utilise le plus souvent cette méthode pour estimer l'effet de certains paramètres (par exemple la température) sur le rendement d'une réaction en chimie organique. Il est alors possible d'optimiser la valeur de ces paramètres pour avoir la meilleure réponse, i.e. le meilleur rendement.

Les paramètres de complexation de ces 16 expériences simulées ont été déterminés à l'aide de quatre types de traitement de données: linéarisation de Ružić à deux ligands, linéarisation de Scatchard à deux ligands, *PROSECE* et un fitting non-linéaire (les principes de fonctionnement dans le tableau **II.1**).

Afin d'être définies de manière systématique et de ne pas être biaisées par la connaissance des valeurs exactes, les méthodes d'optimisation (*PROSECE*, fitting non-linéaire) ont toujours employé les mêmes valeurs initiales pour les paramètres de complexations ($K_1 = 10^9$, $L_{1T} = 20$ nM, $K_2 = 3.16 \times 10^6$, $L_{2T} = 200$ nM). Ces valeurs ne sont donc pas nécessairement optimales, i.e. dans le cas du traitement de données d'expériences réelles, il est fréquent de modifier ces paramètres initiaux en fonction des résultats obtenus, notamment lorsqu'ils convergent vers des valeurs négatives. Toutefois, cette possibilité de modification soulignerait une défaillance du programme, incapable d'optimiser correctement les valeurs des paramètres inconnus.

Pour correctement comparer l'efficacité des modes de titrations (linéaire, logarithmique, décade) et les méthodes de traitement de données (linéarisations de Ružić et Scatchard, fitting non-linéaire, *PROSECE*), les erreurs sur les quatre paramètres ont été calculées. Elles sont basées sur la différence entre la valeur théorique du paramètre de complexation (X^{th}) et la valeur calculée (X^{calc}), suivant l'équation:

$$X_{erreur} = \sqrt{\frac{(X^{th} - X^{calc})^2}{X^{th2}}} \times 100 \quad (\text{eq. II.18})$$

Théoriquement, d'après la méthode de Yates, il est possible de quantifier les effets des différents facteurs (expériences 1 à 16) sur la réponse (les valeurs d'erreurs). En effet, l'exploitation des valeurs d'erreurs obtenues pour un paramètre X de complexation (ex. K_1) permet d'attribuer à chacune des 16 expériences simulées un effet (noté C_i^X) spécifique à ce même paramètre. Ces effets sont ensuite utilisés pour modéliser l'erreur sur X , et donc prévoir la valeur de l'erreur sur ce paramètre pour une expérience non modélisée (par exemple, $K_1^{th} = 10^9$, $L_{1T}^{th} = 20$ nM, $K_2^{th} = 3.16 \times 10^6$, $L_{2T}^{th} = 200$ nM) en utilisant l'équation généralisée suivante:

$$X_{erreur} = \sum_{i=1}^{16} C_i^X \times \prod_{j=1}^4 (X_j^{th})^{\beta_{i,j}} \quad (\text{eq. II.19})$$

avec:

- X_{erreur} , l'erreur sur le paramètre X prévue par la méthode de Yates,
- X_j^{th} , valeur théorique du paramètre X_j ($K_1^{th} = 10^9$, $L_{1T}^{th} = 20$ nM, $K_2^{th} = 3.16 \times 10^6$, $L_{2T}^{th} = 200$ nM)
- C_i^X , valeur de l'effet calculé par la méthode de Yates pour la $i^{\text{ème}}$ expérience concernant le paramètre X (ex. K_1),
- $\beta_{i,j}$, égal à 1 lorsque la valeur de X_j^{th} est (+) pour la $i^{\text{ème}}$ expérience (tableau **II.3**), 0 sinon.

Lorsque cette méthode est appliquée aux résultats obtenus et que les différences entre les valeurs d'erreurs prévues et effectivement calculées sont analysées, ils apparaissent aberrants. Par exemple, le calcul à partir des valeurs des effets déterminées par la méthode de Yates de l'erreur

totale (somme des erreurs sur les 4 paramètres) pour l'expérience 3 (tableau II.3), en mode linéaire traitée par la linéarisation de Ružić donne -9.025 , ce qui est très différent de la valeur calculée après modélisation des données (M_f, M_T) par Ružić: 3.006 .

Cela montre que cette méthode d'estimation de l'erreur par le calcul des effets des différents facteurs n'est pas applicable à cette étude.

Afin d'estimer les corrélations éventuelles entre ces différents paramètres, les erreurs obtenues ont été représentées suivant: $K_{1 \text{ error}} = f(L_{1T \text{ error}})$, $K_{2 \text{ error}} = f(L_{2T \text{ error}})$, $L_{2T \text{ error}} = f(L_{1T \text{ error}})$, $K_{2 \text{ error}} = f(L_{1T \text{ error}})$, $K_{1 \text{ error}} = f(L_{2T \text{ error}})$ et $K_{2 \text{ error}} = f(K_{1 \text{ error}})$. Les graphiques ainsi obtenus pour la titration décade traitée par la linéarisation de Ružić sont présentées sur la figure II.12.

Ainsi, l'erreur sur le paramètre K_1 semble être assez bien corrélée ($R^2 = 0.92$) avec celle sur L_{1T} , ce qui souligne l'influence réciproque entre les paramètres de complexation des ligands forts. Le même phénomène est aussi observable, bien que moins prononcé, entre les erreurs obtenues pour K_2 et L_{2T} . Au contraire, K_2 fonction de L_{1T} et K_1 fonction de L_{2T} montre des corrélations inverses, i.e. une mauvaise détermination d'un des paramètres est souvent lié à une détermination correcte de l'autre, et réciproquement.

Cependant, exceptées ces tendances, peu de corrélations ont été observées, ce qui prouve la complexité des dépendances entre tous ces paramètres.

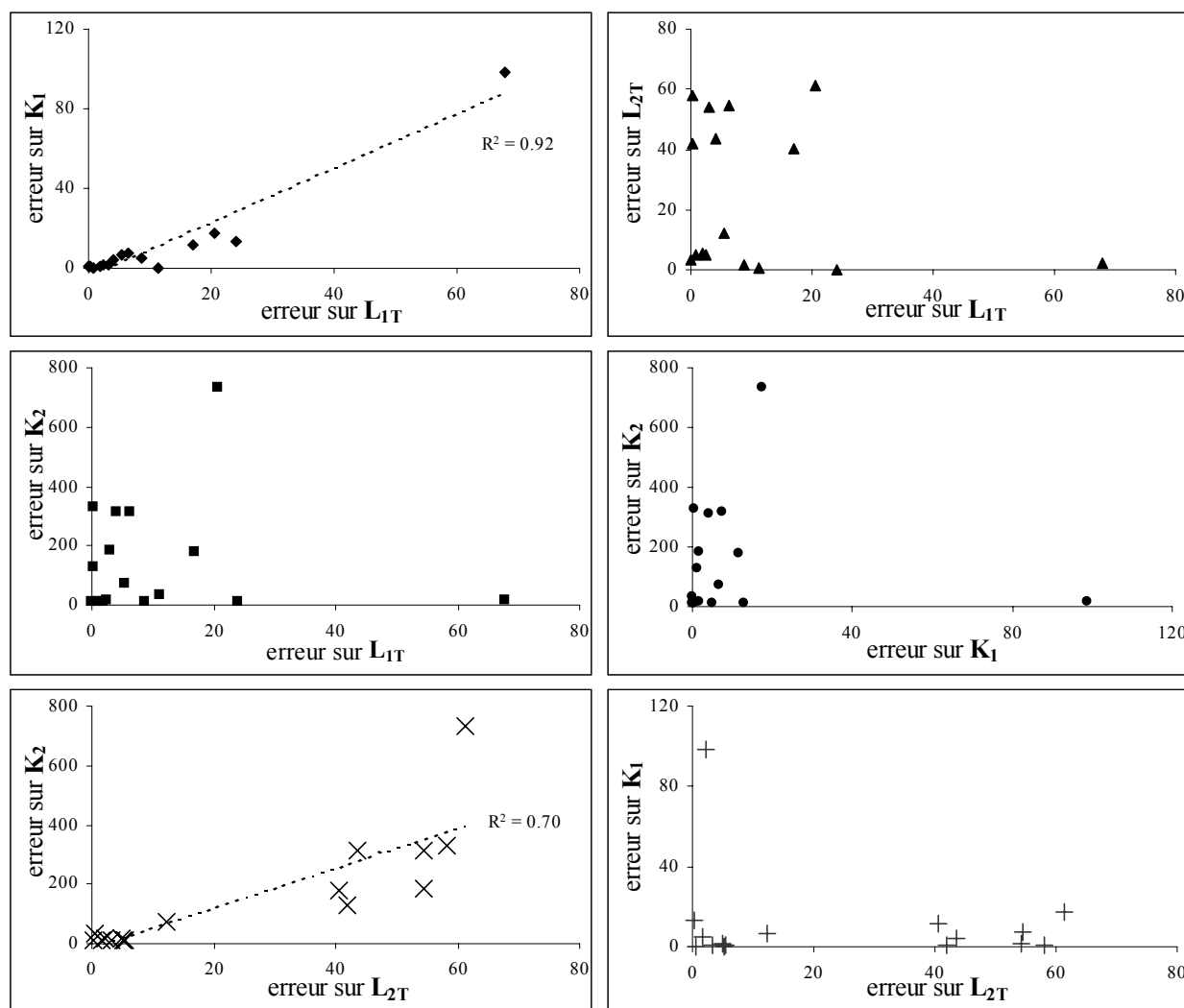


Figure II.12: Représentation des erreurs sur la détermination des K_i et L_{Ti} pour les expériences en mode décade traitées par la linéarisation de Ružić

Contrairement au système à un ligand, les résultats obtenus pour le système à deux ligands n'ont pas pu être rassemblés sous la forme d'un unique tableau compte tenu de leur nombre important.

b.1/ Titration linéaire:

Indéniablement, le fitting des données par *PROSECE* permet d'obtenir les résultats les plus fiables, indépendamment de l'expérience modélisée. Seul un nombre faible d'expériences conduit à des erreurs importantes, principalement sur les concentrations en ligands. Elles correspondent à des expériences où les valeurs théoriques des concentrations sont faibles (- dans le tableau II.3).

Au contraire, la linéarisation de Ružić, dans ce mode de titration, ne permet pas de déterminer correctement la valeur de K_1 et ce pour l'ensemble des expériences. En effet, pour 10 expériences, la valeur de K_1 obtenue est négative. La détermination des concentrations en ligands est correcte, moins précise qu'avec *PROSECE* (surtout pour L_{1T}), mais relativement indépendante des conditions, la variation des erreurs sur L_{1T} et L_{2T} étant faible sur l'ensemble des expériences. La détermination de K_2 est toujours meilleure que celle de K_1 d'autant plus que le produit $K_2 \times L_{2T}$ est élevé.

Pour le calcul de K_1 , la linéarisation de Scatchard semble nettement plus appropriée que la méthode de Ružić. Cependant, les résultats obtenus n'atteignent pas la fiabilité de ceux obtenus par *PROSECE*. A l'inverse, avec des valeurs négatives de L_{2T} optimisées pour deux expériences, la linéarisation de Scatchard semble moins adéquate que celle de Ružić pour ce paramètre. Ceci montre clairement l'importance et l'influence de la transformation mathématique des données sur le résultat final, i.e. sur les valeurs des paramètres de complexation.

Nonobstant l'utilisation de données linéarisées suivant la transformation de Ružić, le fitting non-linéaire apparaît moins sensible que cette linéarisation en ce qui concerne la détermination de K_1 . Cependant, avec 5 valeurs négatives pour K_1 et 2 valeurs négatives pour L_{1T} , les résultats obtenus restent éloignés des valeurs prévues. Les valeurs de K_2 et L_{2T} sont moins bonnes qu'avec les linéarisations, pourtant déjà assez mauvaises.

Les ajouts en mode linéaire ne semblent donc pas être adaptés à la détermination de propriétés de complexation de ligands forts peu concentrés, configuration fréquente dans les eaux naturelles, sauf si *PROSECE* est utilisé. Avec ce type de traitement de données, les erreurs sont en moyenne de 30%, comparé aux autres techniques qui conduisent à des erreurs comprises entre 50% et 500%. Ceci peu sans doute s'expliquer par une définition insuffisante de la zone de concentration comprise entre 0 et 50nM (3 points).

Cependant, en ce qui concerne les propriétés de complexation de ligands faibles concentrés, malgré le grand nombre de points les définissant (20 points de 100 à 457nM), les linéarisations et le fitting ne permettent pas d'obtenir une valeur correcte de la constante de stabilité K_2 , sans doute à cause des faibles valeurs de $K_2 \times L_{2T}$. Seule la concentration de ce type de ligands est correctement modélisée, avec une erreur moyenne de 20%.

b.2/ Titration logarithmique:

Les résultats obtenus pour la détermination des valeurs de K_1 et L_{1T} sont clairement améliorés par l'utilisation de ce mode de titration, comparés à ceux obtenus par le mode linéaire, ceci quelque soit le type de traitement de données utilisé.

Ce mode de titration permet d'éliminer complètement les résultats aberrants obtenus précédemment par la linéarisation de Ružić, i.e. les valeurs négatives de K_1 . Excepté pour une expérience, la même chose est observable pour le fitting non-linéaire.

Ainsi, les erreurs moyennes sur K_1 décroissent de 1457% (linéaire) à 8.5% (logarithmique) pour la linéarisation de Ružić et de 96.6% à 52.6% pour le fitting non-linéaire. De plus, les erreurs moyennes sur L_{1T} , pour ces deux méthodes de traitement de données, passent respectivement de 43.9% à 11.9% et de 512.4% à 15.6%.

Malgré une expérience où l'erreur sur L_{1T} atteint 220%, *PROSECE* permet de déterminer les deux paramètres de complexations du premier ligand avec une erreur moyenne inférieure à 9%, la résolution sur plus de la moitié des expériences étant inférieure à 3% d'erreur. Cette méthode semble donc être la plus adaptée à la caractérisation des propriétés de complexation de ligands peu concentrés très complexants.

Bien que nettement améliorés, les résultats obtenus par la linéarisation de Scatchard ne sont pas aussi précis (erreur moyenne: 20%).

Concernant la détermination de L_{2T} , les techniques de linéarisation et le fitting non-linéaire donnent des résultats légèrement meilleurs que *PROSECE*, qui est surtout influencé par les valeurs de K_1/K_2 et L_{1T}/L_{2T} . Pour ce même paramètre, la titration logarithmique n'est bénéfique qu'à la linéarisation de Scatchard puisqu'elle permet d'éliminer les valeurs aberrantes.

Le paramètre K_2 reste mieux modélisé par *PROSECE* que par les linéarisations, pour lesquelles les erreurs sont très fortes. Le fitting non-linéaire ainsi que les 2 linéarisations, trop sensibles aux valeurs de K_2 et L_{2T} comparées aux valeurs de K_1 et L_{1T} , conduisent à des erreurs élevées pour de nombreuses expériences.

D'une manière générale, le fitting non-linéaire et les linéarisations permettent d'estimer correctement la concentration d'un ligand faiblement complexant, alors que seul *PROSECE* conduit à des valeurs fiables pour les constantes de complexation de ce type de ligands, malgré les faibles valeurs de $K_2 \times L_{2T}$ (compris entre 3 et 0.1).

Les ajouts en mode logarithmique, augmentant nettement la précision de la titration pour les faibles concentrations (16 points de 0 à 50nM, comparés aux 3 points pour le mode linéaire), amplifient la résolution des propriétés de complexation de ligands forts peu concentrés, quelque soit le type de traitement de données utilisé. Ce phénomène est évident pour la détermination de K_1 par la linéarisation de Ružić et le fitting non-linéaire.

Nonobstant la diminution du nombre de points définissant les concentrations élevées en métal (7 points de 100 à 457nM, comparés aux 20 points pour le mode linéaire), les déterminations des propriétés de complexation de ligands faibles concentrés sont similaires à celles obtenues en mode linéaire pour la linéarisation de Ružić et *PROSECE*, voire améliorées en ce qui concerne la constante de complexation K_2 calculée par le fitting non-linéaire et la concentration L_{2T} calculée par la linéarisation de Scatchard.

b.3/ Titration décade:

D'une manière générale, les résultats obtenus pour ce mode de titration sont très proches de ceux obtenus pour la titration logarithmique. Donc, ce mode améliore la détermination des propriétés de complexation des ligands forts peu concentrés, par rapport à des ajouts linéaires.

La résolution obtenue pour la linéarisation de Ružić semble légèrement meilleure que celle obtenue en mode logarithmique. Cette technique de traitement de données semble donc assez adaptée à la détermination de K_1 et L_{1T} , dès que la précision de la fenêtre analytique est suffisante pour les concentrations faibles en métal total.

Bien que moins précise, la linéarisation de Scatchard conduit à erreurs sur K_1 et L_{1T} inférieures à 15%.

Avec une expérience donnant une K_1 négative et une erreur moyenne supérieure à 25%, le fitting non-linéaire semble être la moins adaptée des quatre techniques de traitements de données étudiés.

Malgré une expérience conduisant à une erreur élevée sur K_1 par *PROSECE*, les résultats de cette technique sont sensiblement améliorés (erreur moyenne: 5%, en enlevant l'erreur maximale).

Comme pour les deux autres modes de titrations, *PROSECE* semble être la technique la plus adaptée à la détermination des propriétés de complexation des ligands forts.

Au contraire de K_1 et L_{1T} , la détermination de K_2 et L_{2T} n'est pas améliorée par ce mode de titration comparé au mode linéaire.

Les linéarisations définissent correctement L_{2T} mais nettement moins bien K_2 . Le fitting non-linéaire accroît tout de même un peu la détermination de la constante. Comme pour le mode logarithmique, *PROSECE* ne semble pas être la technique la plus appropriée pour correctement définir L_{2T} , mais elle est la seule permettant un calcul presque correct de K_2 .

Comme en mode logarithmique, ce mode de titration, augmentant nettement la précision du dosage pour les faibles concentrations (16 points de 0 à 50nM au lieu de 3 pour le mode linéaire) amplifie la résolution des propriétés de complexation de ligands forts peu concentrés pour l'ensemble des modélisations.

D'un autre côté, le nombre de points définissant les concentrations fortes devenant plus faible qu'avec les autres modes de titrations (seulement 5 points de 100 à 457nM), il conduit à une détermination plus mauvaise des ligands faibles.

b.4/ Influence de la distribution aléatoire du bruit:

Afin de s'approcher de valeurs de M_f réalistes, un bruit aléatoire compris entre -2% et $+2\%$ a été ajouté aux valeurs exactes simulées par MINEQL. De ce fait, il convient d'appréhender l'effet de cette erreur sur la détermination des paramètres de complexation pour les deux ligands. Pour cela, les données de deux expériences (n°5 en mode linéaire, n°7 en mode logarithmique, tableaux **II.3** et **II.4**) ont été traitées par chaque technique, après modification par dix distributions différentes de bruits.

Les résultats obtenus précédemment ont montrés que la première expérience simulée (n°5) correspond à une expérience pour laquelle il est difficile de retrouver les valeurs exactes des paramètres de complexation, surtout pour les linéarisations et le fitting qui conduisent à des valeurs négatives pour K_1 et L_{1T} et L_{2T} . Au contraire, la deuxième expérience (n°7) a été correctement modélisée, quelque soit le paramètre.

Théoriquement, les linéarisations devraient être plus sensibles à la répartition du bruit aléatoire que les fitting (en particulier pour la première expérience), car, au contraire des fitting, elles prennent seulement en compte une partie des points de la titration, et non l'intégralité des points, augmentant potentiellement l'effet du bruit ajouté. De plus, les transformations mathématiques par linéarisation des données affectent les valeurs de X et Y ($X, Y = f([M_f])$) alors que, dans le cas de *PROSECE*, le bruit n'affecte que les valeurs de $Y = [M_f]$.

exp5 - linéaire théorie		Linéarisation de Ružić			Linéarisation de Scatchard			<i>PROSECE</i>			Fitting non-linéaire		
		valeur moy.	std %	N < 0	valeur moy.	std %	N < 0	valeur moy.	std %	N < 0	valeur moy.	std %	N < 0
L_{1T}	1.00 E-08	5.65 E-09	27.6	0	1.44 E-08	3.9	0	1.06 E-08	5.3	0	5.66 E-09	100.6	4
K_1	1.00 E+10	-2.94 E+08	109.9	10	3.08 E+08	18.5	0	5.01 E+09	138.1	0	5.83 E+08	215.9	5
L_{2T}	1.00 E-07	8.71 E-08	51.2	0	-1.51 E-07	294.4	7	2.43 E-07	20.0	0	5.05 E-07	285.0	1
K_2	1.00 E+06	2.32 E+06	45.1	0	-2.33 E+05	327.1	7	3.71 E+05	31.5	0	4.25 E+06	93.4	1

exp7 - logarithmique théorie		Linéarisation de Ružić			Linéarisation de Scatchard			<i>PROSECE</i>			Fitting non-linéaire		
		valeur moy.	std %	N < 0	valeur moy.	std %	N < 0	valeur moy.	std %	N < 0	valeur moy.	std %	N < 0
L_{1T}	3.00 E-08	2.99 E-08	2.4	0	3.06 E-08	2.2	0	3.00 E-08	0.4	0	3.00 E-08	3.0	0
K_1	1.00 E+10	1.00 E+10	2.9	0	9.77 E+09	2.6	0	9.99 E+09	0.7	0	1.01 E+10	7.6	0
L_{2T}	3.00 E-07	2.83 E-07	3.1	0	2.80 E-07	3.1	0	2.95 E-07	2.4	0	2.97 E-07	2.6	0
K_2	1.00 E+07	1.22 E+07	6.6	0	1.38 E+07	6.8	0	1.03 E+07	3.8	0	1.02 E+07	6.0	0

Tableau **II.4**: Influence de la distribution aléatoire du bruit sur la détermination des paramètres de complexation pour différentes techniques de traitement de données (valeurs moyennes, déviations standards et nombre de valeurs négatives calculées pour 10 set différents de bruits ajoutés aux expériences simulées n°5 et 7)

Tous les résultats obtenus sont résumés dans le tableau **II.4**. Comme prévu, les techniques basées sur la transformation des données (avec linéarisation ou optimisation) apparaissent plus

sensibles au bruit que ne l'est *PROSECE*, qui travaille sur des données non modifiées. Ainsi, les modélisations peuvent aboutir à des valeurs aberrantes (valeurs négatives par exemple) sur les paramètres du premier et/ou du deuxième ligand, en fonction de la distribution du bruit, d'autant plus que le facteur $K_2 \times L_{2T}$ ou que L_1 diminuent, situations qui sont tout à fait envisageables sur des échantillons naturels. Lorsque $K_1 \times L_{1T}$ et $K_2 \times L_{2T}$ sont tous deux élevés (expérience 7), i.e. largement supérieurs à 1, les quatre techniques conduisent à des résultats similaires, donc sont assez peu sensibles à la distribution de bruit ajouté.

b.5/ Possibilité de prédire l'erreur sur un paramètre – utilité des graphiques contours:

En prenant en compte les résultats obtenus pour les 16 expériences simulées, à partir de différentes valeurs de $K_1 \times L_{1T}$ et $K_2 \times L_{2T}$, la question se pose de la possibilité de prédire les erreurs de paramètres de complexation pour des expériences simulées avec d'autres valeurs théoriques, et donc par là même d'estimer la fiabilité de résultats obtenus lors du traitement de données issues de l'analyse d'échantillons naturels (i.e. pour lesquels il n'est pas possible de connaître les valeurs "vraies").

Dans cette optique, le logiciel *Surfer 6* a été utilisé pour tracer les *graphiques contours* représentant les erreurs sur les paramètres en fonction des valeurs de $K_1 \times L_{1T}$ et $K_2 \times L_{2T}$ en échelle logarithmique, pour chaque couple "mode de titration - technique de traitement de données" (figures **II.13a**, **II.13b** et **II.13c**).

Afin de tester la capacité de prédiction de ces graphiques, 5 nouvelles expériences ont été simulées en modes linéaire et logarithmique, avec des valeurs de $K_i \times L_{iT}$ différentes de celles déjà étudiées. Une sixième expérience a été ajoutée pour estimer la variabilité de l'erreur pour une même valeur de $K_i \times L_{iT}$. Cette expérience a donc été définie avec des valeurs différentes pour les paramètres de complexation, mais les mêmes valeurs de $K_i \times L_{iT}$ que celles de la troisième expérience. Les nouveaux points correspondant à ces 6 expériences sont indiquées à l'aide de (×) sur la figure **II.14** et leurs paramètres sont résumés dans le tableau **II.5**.

n°	L_{1T} (nM)	K_1	L_{2T} (nM)	K_2	$L_{1T} \times K_1$	$L_{2T} \times K_2$	$K_{1 \text{ error linear}}$	$K_{1 \text{ error logarithmic}}$
1	20	10^{10}	200	10^7	200	2	<i>111.8 %</i>	1.4 %
2	20	10^8	200	10^6	2	0.2	103.2 %	5.5 %
3	10	5×10^9	100	5×10^6	50	0.5	<i>101.7 %</i>	7.4 %
4	20	10^{10}	200	10^6	200	0.2	<i>102.7 %</i>	1.2 %
5	20	10^8	200	10^7	2	2	<i>641.8 %</i>	39.5 %
6	30	1.67×10^9	300	1.67×10^6	50	0.5	<i>116.6 %</i>	0.0 %

Tableau **II.5**: Valeurs des paramètres des 6 expériences simulées, ajoutées pour tester la capacité de prédiction des *graphiques contours*, et valeurs de K_1 obtenues par la linéarisation de Ružić pour les titrations linéaire et logarithmique (les erreurs en *italique* correspondent à des valeurs négatives de K_1), Figure **II.14** (×)

Théoriquement, trois cas de figures peuvent se présenter, suivant que les erreurs estimées sont:

- (i) proches des valeurs calculées: les graphiques sont adaptés à prévoir la fiabilité d'un couple mode de titration – traitement de données sur la détermination des paramètres de complexation,
- (ii) supérieures aux valeurs calculées: la prévision est "pessimiste", ce qui n'est pas un désavantage puisque ces graphiques pourront alors permettre d'estimer les valeurs de limites supérieures d'erreur,
- (iii) inférieures aux valeurs calculées: les graphiques proposés ne sont pas adaptés à l'estimation des erreurs sur les paramètres de complexation d'une expérience non simulée.

En traçant les erreurs estimées en fonction des erreurs calculées obtenues avec les techniques de linéarisation, une corrélation est obtenue. Ceci confirme que les *graphiques contours* permettent une estimation correcte de l'erreur, sauf quand les valeurs de paramètres obtenues

sont aberrantes (comme les valeurs négatives de K_I obtenues par la linéarisation de Ružić en mode linéaire: figure II.14A).

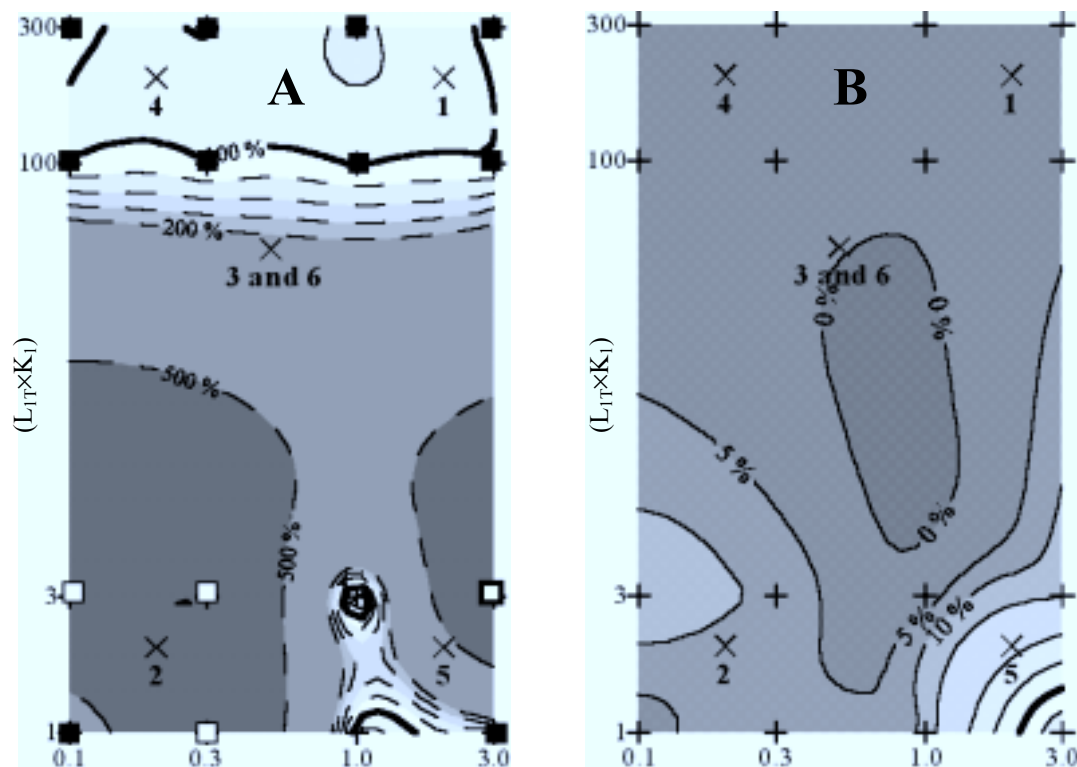


Figure II.14: graphiques contours de “ $K_I \text{ erreur} = f((L_{1T} \times K_1), (L_{2T} \times K_2))$ ” obtenue pour la linéarisation de Ružić en mode linéaire (A) et logarithmique (B) (+: $K_I \text{ erreur}$ calculée, ■: $K_I \text{ erreur}$ calculée mais valeur de K_I négative, □: $K_I \text{ erreur}$ calculée supérieure à 1000).

Au contraire, les prédictions des valeurs pour les techniques d’optimisation sont moins correctes. Dans la plupart des cas, les valeurs prédites surestiment les valeurs réelles. Malgré cet écart souvent important, ces erreurs prédites à l’aide des *graphiques contours* peuvent être utilisées comme limites supérieures pour estimer la fiabilité des résultats d’une détermination des paramètres de complexations pour un échantillon naturel.

Concernant la variabilité des erreurs pour les expériences où les valeurs des paramètres sont différents mais les valeurs de $K_I \times L_{1T}$ sont identiques, i.e. les différences obtenues entre les résultats des expériences 3 et 6 montrent que:

- (i) l’écartype sur l’erreur entre ces deux expériences est globalement supérieure à 50%, quel que soit le paramètre étudié et le couple mode de titration – traitement de données considéré,
- (ii) dans la majorité des cas, la différence entre l’estimation et la moyenne des deux valeurs obtenues est inférieure à l’écartype entre ces deux valeurs.

Ceci signifie que, même si les variations d’erreurs sur la détermination des paramètres sont importantes pour des combinaisons de paramètres différentes mais à $K_I \times L_{1T}$ et $K_2 \times L_{2T}$ constants, les valeurs d’erreurs estimées à l’aide des *graphiques contours* sont dans le domaine de variation des erreurs vraies, donc sont utilisables pour prévoir ces dernières.

Titrations linéaires

Erreur sur $L_{1T}, K_1, L_{2T}, K_2 = f(\log(K_1 \times L_{1T}), \log(K_2 \times L_{2T}))$

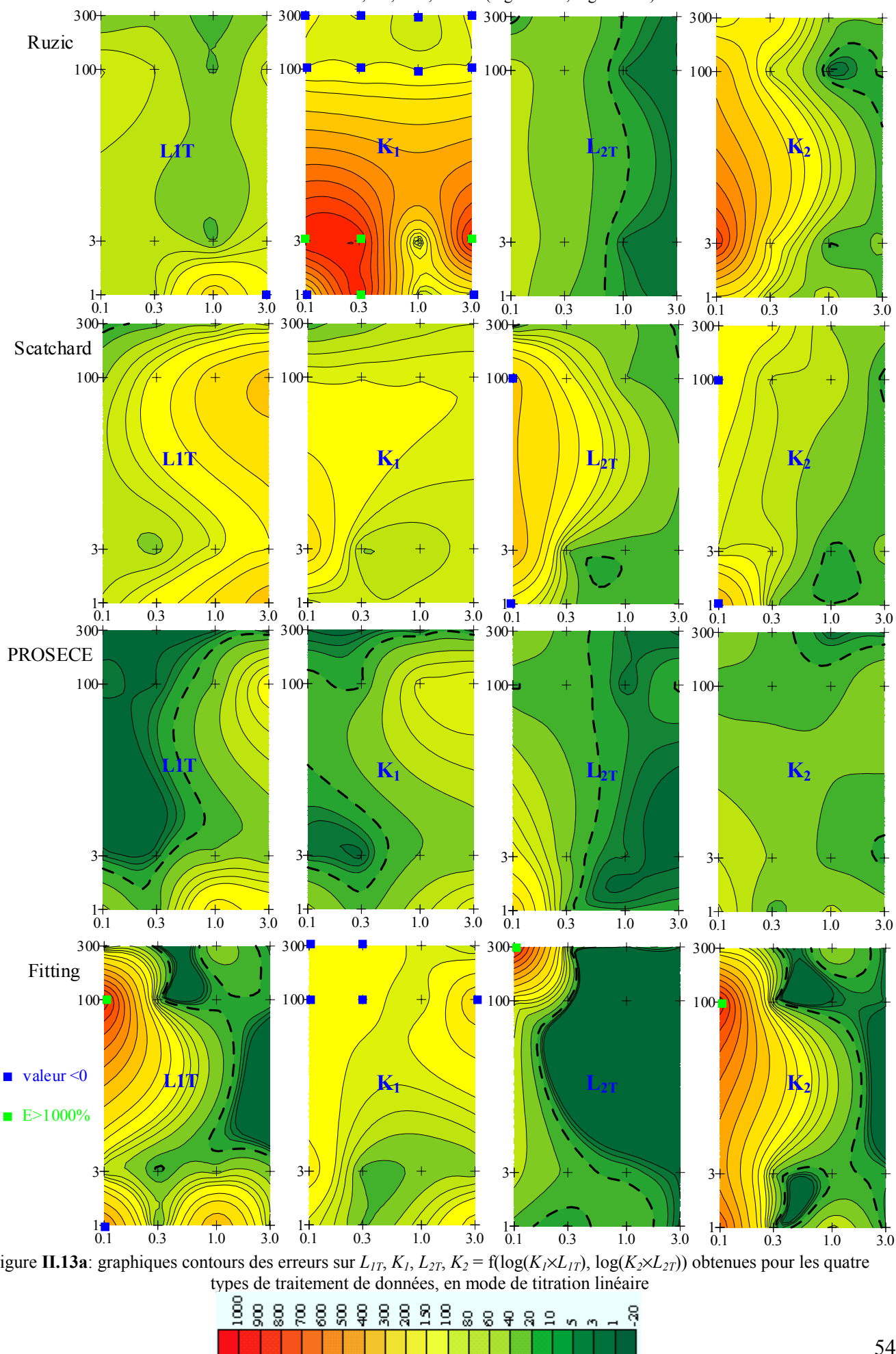


Figure II.13a: graphiques contours des erreurs sur $L_{1T}, K_1, L_{2T}, K_2 = f(\log(K_1 \times L_{1T}), \log(K_2 \times L_{2T}))$ obtenues pour les quatre types de traitement de données, en mode de titration linéaire

Titration logarithmique

Erreur sur $L_{1T}, K_1, L_{2T}, K_2 = f(\log(K_2 \times L_{2T}), \log(K_1 \times L_{1T}))$

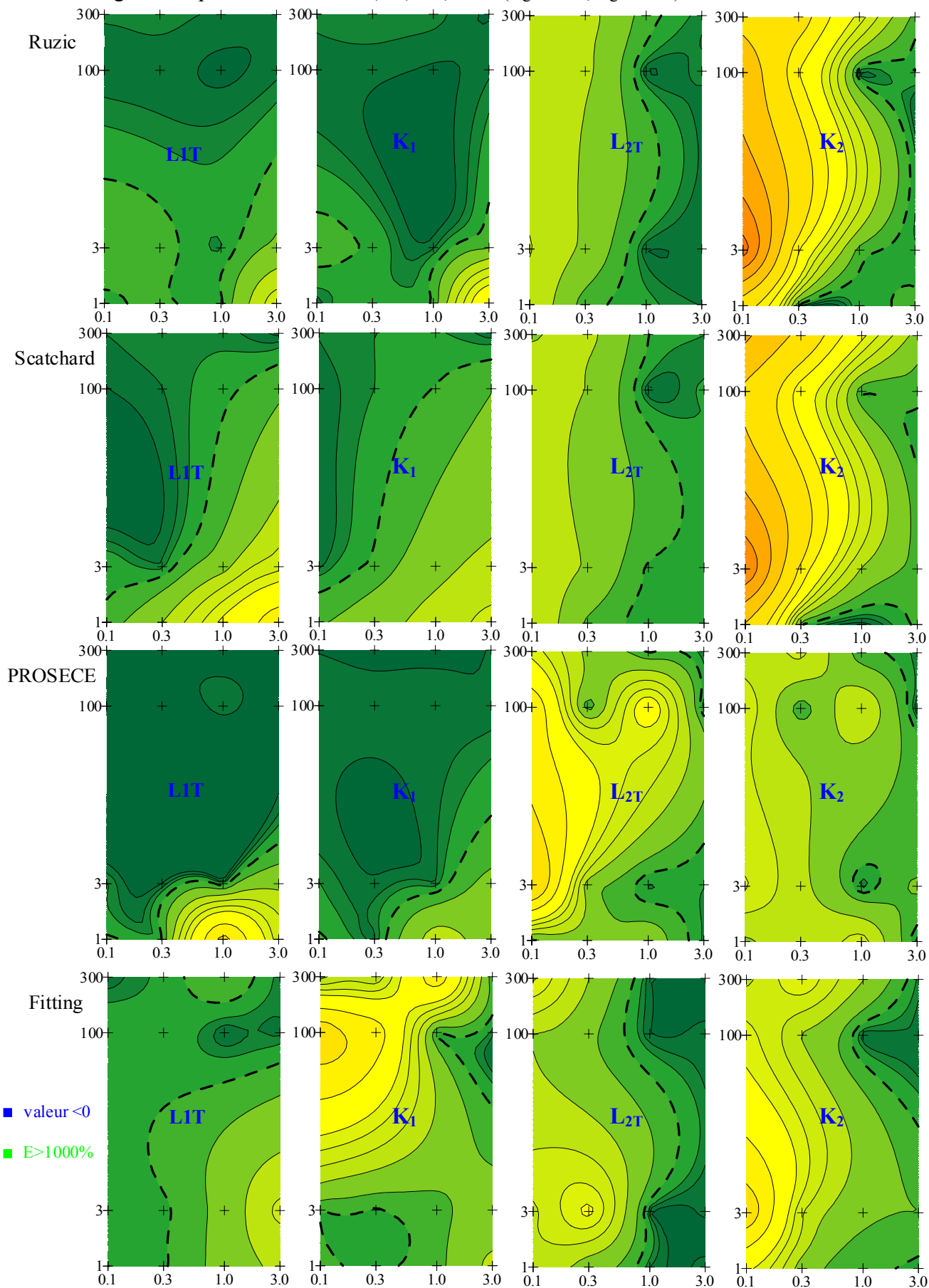
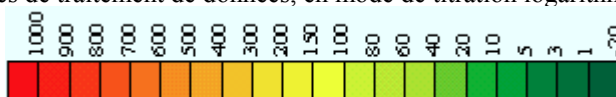


Figure II.13b: graphiques contours des erreurs sur $L_{1T}, K_1, L_{2T}, K_2 = f(\log(K_1 \times L_{1T}), \log(K_2 \times L_{2T}))$ obtenues pour les quatre types de traitement de données, en mode de titration logarithmique



Titration decade

Erreur sur $L_{1T}, K_1, L_{2T}, K_2 = f(\log(K_2 \times L_{2T}), \log(K_1 \times L_{1T}))$

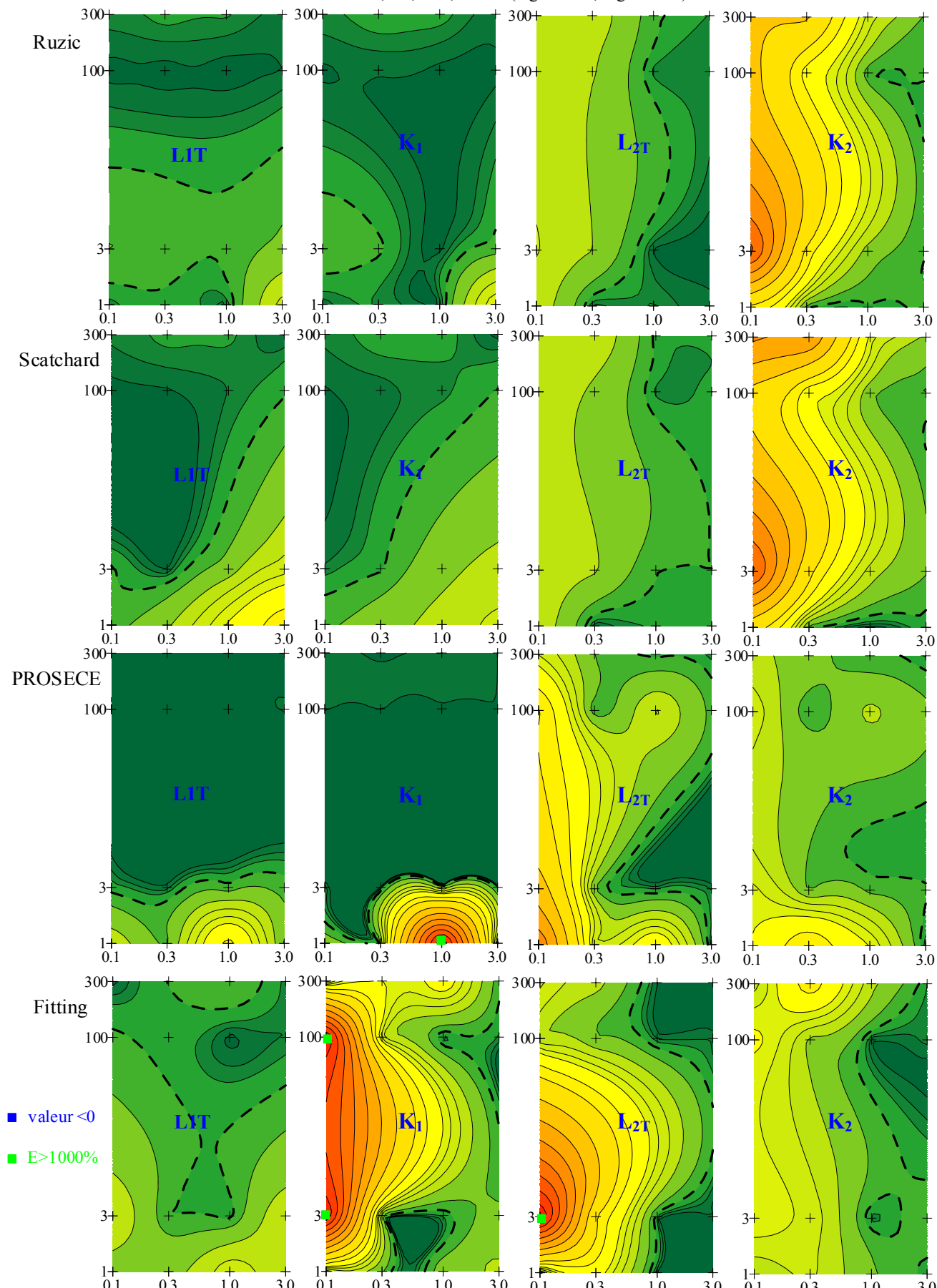
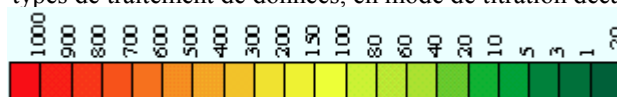


Figure II.13c: graphiques contours des erreurs sur $L_{1T}, K_1, L_{2T}, K_2 = f(\log(K_1 \times L_{1T}), \log(K_2 \times L_{2T}))$ obtenues pour les quatre types de traitement de données, en mode de titration decade



b.6/ Etude de la variation de l'écartype sur la mesure de M_f au cours d'une titration logarithmique - modélisation de la variation du bruit aléatoire à ajouter à des expériences simulées:

Tout au long de cette étude, le bruit aléatoire ajouté aux données simulées par MINEQL a été borné entre -2% et $+2\%$, pour toute la gamme de concentrations balayées, qu'en est-il du réalisme de cet hypothèse ?

Pour ce faire, les variations d'écartype sur la mesure de la concentration en Cd électrochimiquement labile, par DPASV, au cours d'une expérience de titration logarithmique réalisée sur une eau ultra-pure ($\text{pH} < 2$) par Cd, ont été analysées.

Après chaque ajout de cadmium à la solution, trois mesures par DPASV ont été effectuées. Le traitement des voltamogrammes obtenus, par déconvolution des pics de Cd et Pb et fitting de la ligne de base (processus explicité ultérieurement), a abouti aux valeurs de concentrations en Cd labile, notée Cd_f . Les variations de l'écartype sur la concentration en Cd_f ainsi obtenues sont représentées (en valeur absolue) sur la figure II.15.

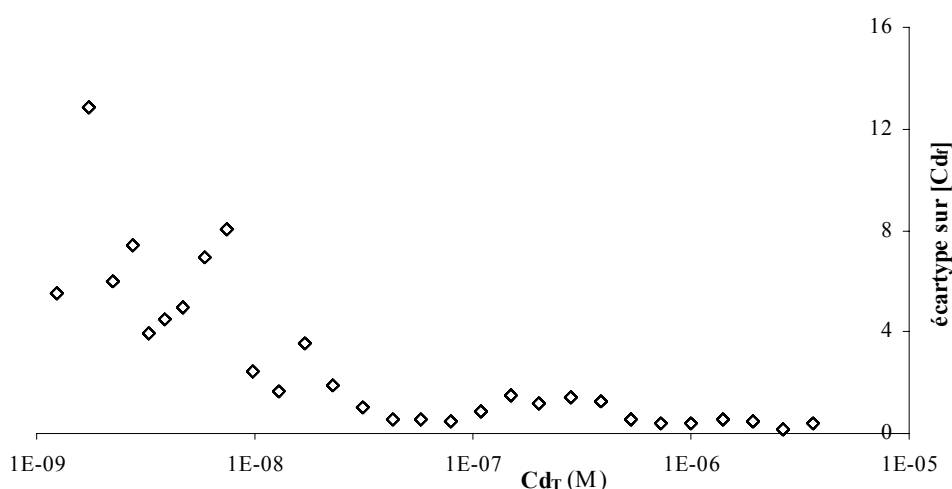


Figure II.15: variation de l'écartype sur la concentration en Cd labile déterminé par DPASV au cours d'une titration logarithmique sur une eau ultra-pure ($\text{pH} < 2$).

Les limites de l'écartype sur Cd_f sont proches de 10% pour les concentrations faibles, et 1 à 2% pour les concentrations fortes.

Il apparaît donc que l'hypothèse formulée (erreur comprise entre -2 et $+2\%$) est trop optimiste pour les concentrations inférieures à la nM. Cependant, les limites ainsi obtenues sont certainement hautement dépendantes de la technique d'analyse, de l'appareillage et des conditions d'analyse, donc une erreur maximisée par une constante semble, en première approximation, relativement correcte.

Pour essayer de simuler cette variation de bruit sur la mesure, différents fonctions ont été testées. Celle qui a permis de restituer au mieux les variations observées est une fonction de la forme:

$$E(M) = \frac{1}{\exp\left(\frac{M}{M_\infty} \times \alpha\right) - \frac{E_0 - E_\infty - 1}{E_0 - E_\infty}} + E_\infty \quad (\text{eq. II.20})$$

où:

α : coefficient

M, M_∞ : les concentrations en M_f au cours de la titration et en fin de titration

E_0, E_∞ : limites du bruit sur M_f en début et en fin de titration

Cette fonction permet de représenter de manière plus réaliste le bruit observable sur la mesure de M_f par DPASV au cours d'une titration logarithmique. Elle a donc été appliquée dans une

nouvelle étude théorique (II.F/) visant à estimer la capacité à déterminer les caractéristiques de complexation de systèmes mono- et poly-dentates multi-ligands à l'aide de *PROSECE*.

II.E.5/ Conclusions de cette étude théorique:

Les analyses visant à étudier l'influence du type de titration et de la méthode de traitement de données sur la fiabilité de la détermination des paramètres de complexation pour des systèmes à un ou deux ligands, basées sur la simulation de données correspondant à celles typiquement mesurables par DPASV, suggèrent les conclusions suivantes:

- (i) Même pour les systèmes simples à un ligand, les titrations logarithmique et décade sont largement plus efficaces que le mode linéaire.
- (ii) Les méthodes de linéarisations sont dans de nombreux cas nettement plus imprécises que les méthodes d'optimisation, particulièrement dans le mode linéaire. La répartition du bruit aléatoire ajouté aux données a une influence significative sur les méthodes de linéarisations (spécialement dans le cas de systèmes à deux ligands), puisque seulement une partie des points sont utilisés pour la détermination des paramètres de complexation. D'un autre côté, pour ces méthodes de linéarisations, dans le cas d'un système à un ligand, une corrélation forte a été trouvée entre l'intervalle de confiance des paramètres calculés et l'erreur entre les valeurs théoriques et calculées. Cette corrélation est proposée pour être utilisée comme estimation de la qualité des résultats pour des expériences "réelles".
- (iii) *PROSECE* est nettement plus fiable que les autres méthodes utilisées (linéarisations et fitting non-linéaire), dans une majorité de cas, à cause de l'algorithme d'optimisation spécifique qu'il utilise. Il est donc hautement recommandé comme outil de traitement de données de complexation. Utilisant des données non-transformées, *PROSECE* minimise l'effet de la propagation du bruit, ce qui semble favorable pour la détermination des paramètres de complexation, comparé aux autres méthodes de traitement de données définies.
- (iv) Les *graphiques contours* permettent une prédiction de l'erreur sur les paramètres de complexation, ils sont donc proposés pour estimer la fiabilité d'analyses réalisées sur des échantillons naturels.

II.F/ Etude théorique de la détermination de propriétés de complexation de systèmes mono- et multi-ligands mono- et poly-dentates:

II.F.1/ Problématique - objectifs:

Compte tenu du caractère hautement hétérogène de la structure chimique des composés organiques présents dans un échantillon naturel, la probabilité de former des complexes mettant en jeu un métal et plusieurs ligands ou groupements fonctionnels, et réciproquement, n'est pas nulle. Il a été montré que de tels complexes formés sont très stables, souvent spécifiques à un seul métal, et caractérisés par des constantes de stabilité très fortes (Byrne, 1980 ; Byrne, 1983 ; Zelić, 1993a, 1993b). De ce fait, ces complexes peuvent avoir un impact non-négligeable sur la spéciation des métaux traces et leur comportement dans un environnement naturel. Il convient donc de savoir si, à partir des techniques analytiques et des méthodes de traitement de données actuellement disponibles, il est possible de distinguer correctement de tels complexes par rapport à des ligands plus simples (i.e. mono-dentates).

Pour ce faire, une étude théorique a été menée, s'appuyant sur les résultats obtenus précédemment (II.E/), visant à étudier des systèmes mono- et multi-ligands formant vis-à-vis d'un métal des complexes mono- et poly-dentates.

II.F.2/ Systèmes chimiques étudiés – simulation des expériences:

Différents systèmes chimiques ont été simulés à l'aide de MINEQL. Afin de limiter le nombre d'expériences, de simulation et de modélisation, l'ensemble des titrations ont été simulées en utilisant un mode d'ajout logarithmique, les résultats obtenus par ce dernier étant nettement plus efficaces que ceux calculés pour des ajouts linéaires, même pour des systèmes chimiques simples (Garnier *et al.*, 2004a). Dans la même optique, l'ensemble des expériences simulées ont été traitées uniquement par PROSECE.

a/ Systèmes chimiques étudiés:

A partir de deux catégories de ligands (*A* et *B* représentant respectivement des ligands forts et faibles), trois types de systèmes chimiques ont été définies:

(cas I) un seul ligand *A* (ou *B*) formant des complexes mono- et bi-dentates: *MA* et *MA*₂ (ou *MB* et *MB*₂)

(cas II) deux ligands *A* et *B* formant des complexes mono- et bi-dentate: *MA*, *MA*₂ et *MB*,

(cas III) deux ligands *A* et *B* formant des complexes mono-, bi-dentates et mixtes: *MA*, *MA*₂, *MB*, *MB*₂ et *MAB*.

Les réactions de complexation mises en jeu sont donc les suivantes:

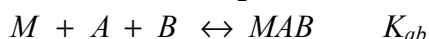
(i)



(ii)



(iii)



Les caractéristiques des ligands *A* et *B* ont été définies à partir des résultats obtenus par l'étude précédente. Les concentrations totales de ces deux ligands (*A*_T et *B*_T) ont été respectivement fixées à 30 nM et 300 nM pour toutes les simulations. Les différentes expériences simulées ont donc été caractérisées par des valeurs variables de constantes de complexations (*K*, *K'*, *K_{ab}*). L'analyse des constantes thermodynamiques de formation de complexes bi-dentates pour des molécules organiques simples (Ringbom, 1967), a conduit à fixer les valeurs de *K'* en fonction de celles de *K*, la relation retenue pour définir l'intervalle de variation de *K'* étant $\log(K') = 2 \times \log(K)$. Concernant les constantes de formation de complexes mixtes, il a été montré (Zelić, 1993a, 1993b) qu'elles pouvaient être reliées aux constantes de formation des complexes bi-dentates, suivant une relation du type:

$$K_{ab} = \omega \times (K'_a \times K'_b)^{1/2} \quad (\text{eq. II.21})$$

avec: $\omega \geq 2$

Les limites des gammes de valeurs balayées pour ces constantes sont regroupées dans le tableau II.6.

	K_a	K'_a	K_b	K'_b	K_{ab}
limite inférieure	10^8	10^{16}	10^6	10^{12}	$10^{14.3}$
limite supérieure	10^{12}	10^{24}	10^8	10^{16}	$10^{26.3}$

Tableau II.6: domaines de variations des constantes de formation des complexes mono-, poly-dentates et mixtes (avec ω : 2, 2×10^3 et 2×10^6)

b/ Expériences simulées – modèles de complexation:

Pour chaque expérience, une titration en mode logarithmique a été simulée par 25 points "expérimentaux" balayant des concentrations en métal total de 0 à 457 nM (II.E.2/).

b.1/ Cas I – systèmes mono-ligand mono- et bi-dentates:

Contrairement à l'étude précédente, les expériences simulées n'ont pas été générées à l'aide d'une matrice factorielle. Elles ont été subdivisées en deux catégories, suivant qu'il y a (i) formation de complexes mono-dentates (MA ou MB), ou (ii) formation de complexes mono- et bi-dentates (MA , MA_2 ou MB , MB_2). La première catégorie s'apparente donc aux expériences déjà simulées précédemment.

A partir des valeurs de constantes choisies, 24 expériences ont été simulées à l'aide de MINEQL. Ces expériences sont représentées dans le graphique II.16. Dans le cas (I.i), ces expériences ont été notées a , b et c (ligand B) et a' , b' et c' (ligand A) ; dans le cas (I.ii), elles ont été notées: 1 à 9 (ligand B) et 1' à 9' (ligand A).

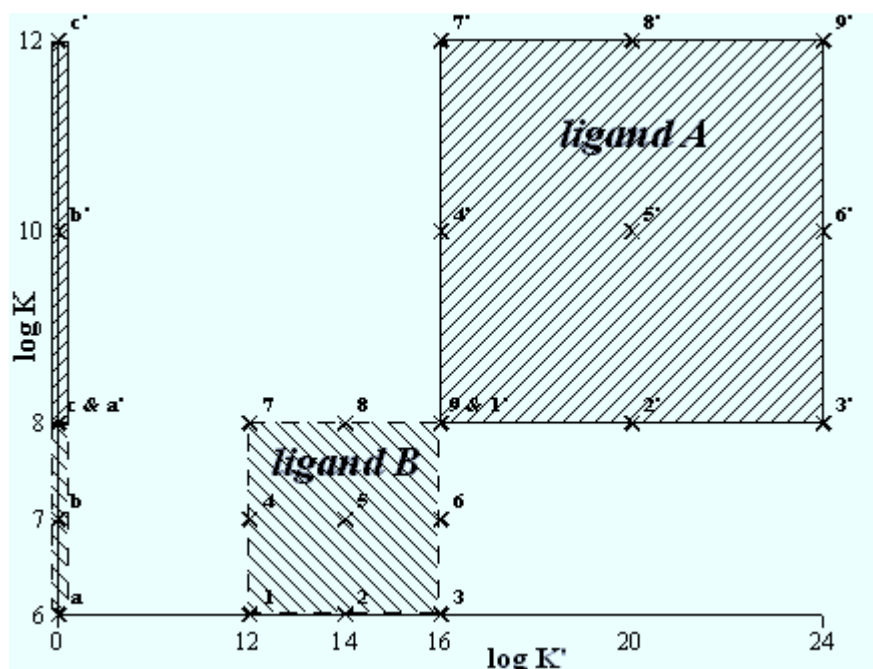


Figure II.16: Cas I - représentation schématique des valeurs de constantes caractérisant les 24 expériences simulées

Les systèmes chimiques de ces 24 expériences ont ensuite été représentés par trois modèles de complexation différents: ML , $M(L_1)+M(L_2)$ et $ML+ML_2$. En effet, une des principales interrogations était de savoir si il était possible de différencier une complexation mono-ligand bi-dentate ($ML+ML_2$) d'une complexation mono-ligand mono-dentate (ML) ou multi-ligand mono-

dentate ($M(L_1)+M(L_2)$). *PROSECE* a donc été utilisé pour fitter les données (M_f , M_T) de ces expériences simulées, à partir de ces trois modèles. Théoriquement, seule le troisième modèle de complexation devrait permettre de correctement fitter ces données.

b.2/ Cas II – systèmes multi-ligands mono- et bi-dentates:

Dans ce cas, seul le ligand fort (*A*) a été défini comme pouvant former avec le métal des complexes bi-dentates, le ligand faible (*B*) ne pouvant conduire qu'à des complexes mono-dentates. 15 expériences ont donc été simulées, notées: $a1'$, $a3'$, $a5'$, $a7'$, $a9'$, $b1'$, $b3'$, $b5'$, $b7'$, $b9'$, $c1'$, $c3'$, $c5'$, $c7'$ et $c9'$ suivant les valeurs des constantes de complexation (figure II.16). Aux trois modèles de complexation définis pour fitter à l'aide de *PROSECE* les expériences du cas (I), un quatrième a été ajouté: $M(L_1)+M(L_1)_2+M(L_2)$. Ce dernier modèle de complexation devrait donc être celui qui conduit aux meilleurs résultats.

b.3/ Cas III – systèmes multi-ligands mono-, bi-dentates et mixtes:

15 expériences ont été définies pour représenter ce type de systèmes chimiques. En référence aux valeurs de complexations utilisées, elles ont été notées: $11'$, $33'$, $55'$, $77'$ et $99'$ en définissant la valeur de K_{ab} en fonction de K'_a et K'_b pour différents ω : 2, 2×10^3 et 2×10^6 (II.F.2.a/).

Ces expériences ont été représentées à l'aide de 5 modèles de complexation: ML , $M(L_1)+M(L_2)$, $ML+ML_2$, $M(L_1)+M(L_1)_2+M(L_2)$ et $M(L_1)+M(L_1)_2+M(L_2)+M(L_2)_2+ML_1L_2$.

b.4/ Ajout de bruit aléatoire aux données simulées:

Afin de rendre plus réaliste ces expériences, un bruit aléatoire a été ajouté aux concentrations en métal libre simulées par MINEQL. Considérant la répartition non-uniforme de la déviation standard des mesures en Cd labiles obtenues lors d'une titration logarithmique réelle (II.E.4.b.6/), il a semblé intéressant d'essayer de reproduire ce type de variations dans cette étude. Pour cela, le bruit ajouté aux données a été borné à l'aide d'une fonction d'erreur de la forme:

$$E(M) = \frac{1}{\exp\left(\frac{M}{M_\infty} \times 10\right) - \frac{E_0 - E_\infty - 1}{E_0 - E_\infty}} + E_\infty \quad (\text{eq. II.22})$$

M , M_∞ : les concentrations en M_f au cours de la titration et en fin de titration ($M_T = 457$ nM),

E_0 , E_∞ : limites du bruit sur M_f en début et en fin de titration, respectivement 1% et 20%.

Le bruit maximal, fixé à 20%, semble réaliste voire un peu surestimé par rapport aux données réelles.

Le bruitage des données simulées a donc consisté à leur ajouter une valeur aléatoire comprise entre $-E(M_f)$ et $+E(M_f)$.

De plus, compte tenu du fait que la détection limite des techniques analytiques, utilisées pour caractériser les propriétés de complexation de ligands naturels, descend rarement en dessous de 0.1 nM, les concentrations en métal libre M_f simulées par MINEQL puis bruitées n'ont pas été prises en compte lorsqu'elles étaient inférieures à cette limite. Le nombre de points d'une expérience n'a donc pas toujours été de 25, descendant jusqu'à 9 pour les expériences où l'intensité de complexation est la plus forte (i.e. les valeurs de M_f les plus faibles), ce qui limite évidemment la définition de la titration.

La figure II.17 représente les données simulées par MINEQL et modifiées par la fonction d'erreur de l'expérience 5' du cas (I.ii). Sur cet exemple, 11 points (M_f , M_T) sont éliminés ce qui réduit notablement la définition de la courbure.

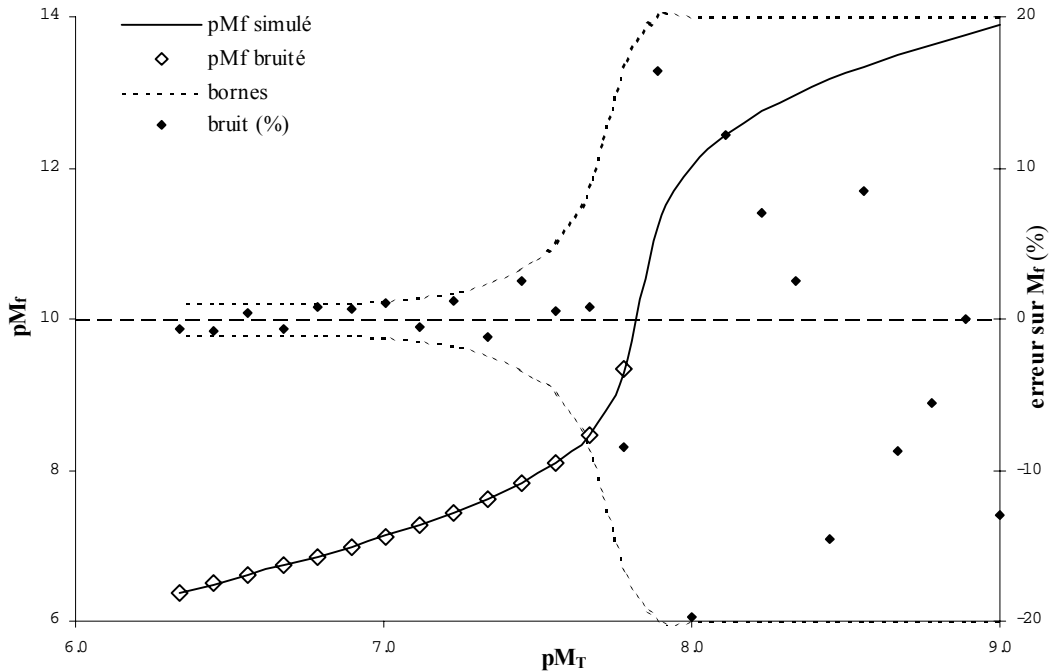


Figure II.17: Modification des données simulées par MINEQL de l'expérience 5' par ajout de bruit aléatoire et élimination des valeurs de M_f inférieures à 0.1 nM

II.F.3/ Résultats obtenus:

PROSECE a été utilisé pour fitter les données des expériences, à partir des modèles de complexation définis (3 à 5 suivant le cas étudié), en optimisant les paramètres les caractérisant. Afin d'estimer l'effet du bruit sur la détermination de ces paramètres, chaque expérience a été fittée par *PROSECE* sur les données simulées non-bruitées (*NB*), non-bruitées avec élimination des points où M_f est inférieure à la DL (*NB+DL*) et bruitées avec élimination des points où M_f est inférieure à la DL (*B+DL*). Ainsi, 216 fitting ont été réalisés pour le cas (I), 180 pour le cas (II) et 225 pour le cas (III). Comme pour l'étude précédente, chaque fitting a été caractérisé par une valeur de *bias* (eq. II.17), représentant l'écart entre les valeurs de M_f simulées et calculées par *PROSECE*, ainsi que par les erreurs sur la détermination des concentrations en ligands (L_{iT}) et des constantes de complexation (K_i, K'_i, K_{ij}) associées.

L'erreur sur une concentration a été calculée à partir de l'équation II.18. Au contraire, une nouvelle fonction a été définie pour calculer l'erreur sur la détermination d'une constante. L'expression de cette fonction d'erreur est:

$$K_{\text{erreur}} = \text{abs}(\log(K_{th}) - \log(K_{calc})) \times 100 \quad (\text{eq. II.23})$$

La différence de traitement, par l'équation II.18, de valeurs de constante optimisées par *PROSECE* inférieures ou supérieures à la valeur théorique est à l'origine de ce changement de fonction. En effet, supposons que pour l'expérience 1' du cas (I) (figure II.16), deux calculs d'optimisation conduisent respectivement aux valeurs de $\log(K_a)$: 6 et 10. Comparées à la valeur théorique $\log(K_a)$: 8, les erreurs sur K_a calculées par l'équation II.18 sont respectivement de 9900 % et 99 %. Ainsi, si la valeur calculée d'une constante est supérieure à la valeur théorique, l'erreur peut devenir infiniment grande, alors qu'elle est bornée à 100 % si la valeur de K calculée est inférieure à la valeur théorique. Or, en terme d'intensité de complexation d'un ligand, il y a autant d'écart entre 10 et 8 qu'entre 6 et 8. Au contraire, avec l'équation II.23, les erreurs sur la détermination de K_a pour ces deux calculs sont identiques (200), ce qui semble plus rigoureux.

Le nombre de valeurs (*bias*, K_i , K'_i , L_{iT} , erreurs, ...) obtenues pour l'ensemble des fitting réalisés dépasse 8000. Il n'a donc pas été possible de les représenter sous la forme d'un tableau dans ce manuscrit. L'interprétation de ces résultats nécessite l'utilisation d'un outil statistique élaboré de traitement de données. Cette analyse a été engagée, mais faute de temps n'a pas pu être terminée. L'exploitation des résultats faite dans ce paragraphe sera donc plus succincte, principalement basée sur l'analyse de "graphiques-contours" de type $X_{\text{erreur}} = f(\log(K_i), \log(K'_i))$, X représentant les concentrations L_{iT} ou constantes K_i , K'_i , K_{ij} optimisées par *PROSECE*.

Ainsi, on montre que:

- le fitting des données simulées est très nettement perturbé par l'ajout de bruit et l'élimination de points. En effet, les valeurs de *bias* obtenues (donc la qualité du fitting) sont plus fortes pour les données de type *NB+DL* et *B+DL* que pour les données simulées traitées par *PROSECE* sans bruit (*NB*). Simultanément, les erreurs sur les paramètres de complexation sont plus fortes pour les données modifiées (*NB+DL* et *B+DL*).
- pour les données non modifiées (*NB*), le *bias* optimisé par *PROSECE* est généralement d'autant plus faible que le modèle chimique utilisé pour le fitting se rapproche du modèle chimique théorique, ceci quelque soit le cas (I, II ou III) étudié. Dans ce cas, les valeurs de concentrations et constantes de complexation optimisées par *PROSECE* sont très proches des valeurs théoriques, même pour des modèles chimiques complexes.
- *PROSECE* peut donc être utilisé pour optimiser les propriétés de complexes poly-dentates ($M(L)_i$ ou $M(L)_i(L')_j$), ce que ne peuvent permettre les techniques de linéarisation.
- Lorsque les données sont de type *NB+DL* ou *B+DL*, le modèle chimique adéquat ne conduit pas toujours aux meilleurs fitting (en terme de valeur de *bias*). Dans ce cas, il y a deux possibilités:
 - . soit le modèle chimique optimisé est plus simple que le modèle chimique théorique (par exemple ML_1+ML_2 au lieu de $ML_1+M(L_1)_2+ML_2$). Ceci signifie généralement qu'il n'y a pas assez "d'informations" sur la courbe de titration pour correctement définir le ou les complexes manquants (ici $M(L_1)_2$), ce qui est fréquent lorsque beaucoup de points ont été éliminés.
 - . soit le modèle chimique optimisé est plus complexe que le modèle chimique théorique (par exemple $ML+ML_2$ au lieu de ML). Alors, la constante optimisée caractérisant ce complexe (ici K'), ou le produit $K_i \times L_{iT}$ (ou $K'_i \times L_{iT}^2$), est toujours non-significative, i.e. ce complexe n'a pas d'influence réelle sur la spéciation de M, et donc peut être éliminé.

Ces résultats montrent que, d'une manière générale, le fitting de données expérimentales par *PROSECE* ou tout autre programme d'optimisation non-linéaire, doit être fait en plusieurs étapes. Il faut d'abord commencer par fitter les données avec un modèle simple, par exemple un seul ligand, puis, à partir de l'erreur sur le fitting, estimer s'il faut définir un ligand supplémentaire et/ou un complexe poly-dentate. Le modèle chimique choisi doit être celui qui permet de fitter au mieux les points expérimentaux, i.e. d'obtenir le meilleur *bias*, tout en étant le plus simple possible. Bien évidemment, ces règles sont valables pour l'analyse d'échantillons naturels, donc de propriétés inconnues, mais peuvent être modulées pour des solutions de molécules dont les structures sont connues, i.e. pour lesquelles le type de complexe formé est connu.

CHAPITRE III/ TECHNIQUES D'ANALYSE UTILISEES POUR ETUDIER LES INTERACTIONS MON - METAUX TRACES ET PROTON

III.A/ Généralités:

Compte tenu de la présence de métaux dans de nombreux écosystèmes, de leur toxicité souvent élevée, et du fait qu'ils ne sont pas biodégradables au contraire d'autres contaminants comme les HAP ou les pesticides, la nécessité d'étudier leur comportement est apparue évidente (Buffle, 1988 ; Sigg *et al.*, 1992 ; Wang, 1985). Il a été montré que, parmi l'ensemble des espèces chimiques interagissant avec ces métaux, les macro-molécules organiques présentes dans les milieux naturels, regroupées sous le terme de MON, jouent un rôle très important quant aux formes chimiques de ces contaminants métalliques et donc de leur réactivité vis-à-vis du milieu (Chau et Lum-Shue-Chan, 1974 ; Christensen *et al.*, 1999 ; Dzombak *et al.*, 1986 ; Gustafsson *et al.*, 2003 ; Koukal *et al.*, 2003 ; Lorenzo *et al.*, 2002 ; Perdue et Lytle, 1983 ; Rozan et Gaboury, 1999b ; Slaveykova *et al.*, 2003 ; Vasconcelos et Leal, 2001b). L'analyse des propriétés de complexation et/ou d'acidité d'échantillons naturels a donc fait l'objet de très nombreux travaux (Abate et Masini, 2002 ; Benedetti *et al.*, 1996 ; Christensen *et al.*, 1998 ; Kinniburgh *et al.*, 1999 ; Lu et Allen, 2002). Cependant, la nature des interactions mises en jeu, la complexité des systèmes chimiques ainsi que la présence de ces métaux à l'état de trace voire d'ultra-trace, rendent ces analyses difficiles, et ont nécessité le développement de techniques analytiques spécifiques (Belmont *et al.*, 1996 ; Bond, 1999 ; Bonfil *et al.*, 2000 ; Bruland *et al.*, 2000 ; Masini *et al.*, 1998 ; Omanović *et al.*, 2003 ; Pei *et al.*, 2000 ; Riso *et al.*, 1997 ; Xue et Sigg, 1998).

Parmi l'ensemble de ces techniques, l'une des plus efficaces pour la caractérisation de la spéciation des métaux traces est basée sur des mesures électrochimiques par voltamétrie, et plus précisément par voltamétrie différentielle à impulsion en redissolution anodique (i.e. DPASV: Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry) (Achterberg et Braungardt, 1999 ; Erk et Raspor, 2001 ; Locatelli et Torsi, 2001 ; Pižeta et Branica, 1997 ; Wang, 1985). L'étude des interactions MON-métaux traces par cette technique analytique repose sur des titrations par ajouts du ou des métaux considérés. La répartition des ajouts, la fenêtre analytique balayée, la répétabilité de la mesure de DPASV sont des paramètres importants qui doivent être rigoureusement choisis, puisqu'ils conditionnent la justesse du fitting des données expérimentales obtenues (Garnier *et al.*, 2004a).

Concernant l'étude des propriétés d'acidité de la MON, la technique la plus courante repose sur une mesure potentiométrique de la concentration en proton libre (i.e. le pH), au cours d'une titration acido-basique (Christensen *et al.*, 1998 ; de Souza Sierra *et al.*, 2001 ; Masini *et al.*, 1998 ; Ritchie et Perdue, 2003 ; Smith et Kramer, 1999).

Dans cette thèse, l'investigation des propriétés d'acidité et de complexation de matières organiques naturelles a été menée principalement à l'aide de ces deux techniques analytiques. Elles ont donc fait l'objet de modifications, aussi bien en terme de conception et de mesure que de traitement des données expérimentales, afin de les adapter aux types de résultats escomptés pour la modélisation par *PROSECE* des propriétés ainsi étudiées.

III.B/ Analyse des métaux traces par une technique électrochimique, la DPASV:

Sous le terme voltamétrie sont rassemblées l'ensemble des techniques analytiques où la mesure se fait à courant non-nul (Bard et Faulkner, 1983), elles se distinguent donc des techniques potentiométriques (par exemple les électrodes sélectives). Parmi ces techniques voltamétriques, les analyses par redissolution ("stripping") anodique (ASV) ou cathodique

(CSV) ont comme principal intérêt d'analyser simultanément différents métaux, à des concentrations extrêmement basses (inférieures au ppb), sans pour autant être très onéreuses (au contraire de certaines techniques spectroscopiques comme l'ICP-AES, l'ICP-MSHR, GF-AAS, ...) (Wang, 1985). Ces techniques ont également l'avantage d'offrir la possibilité de caractériser, dans certains cas, la spéciation chimique des métaux étudiés, si tant est que les conditions analytiques utilisées aient été judicieusement établies (Bruland *et al.*, 2000 ; Muller *et al.*, 2001). De plus, elles sont appropriées à des mesures automatiques "en ligne" voire *in situ*. Environ une trentaine de métaux peuvent être ainsi analysés (Ag, As, Au, Ba, Bi, Cd, Co, Cs, Cu, Ga, Ge, Hg, In, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Pt, Rb, Rh, Sb, Se, Sn, Sr, Tc, Te, Zn), et ces techniques sont également adaptées à la mesure de composés non-métalliques tels que les thiols, les sulfures, ... principalement par CSV (Achterberg et Braungardt, 1999 ; Al-Farawati et Van Den Berg, 1997 ; Erk et Raspor, 2001 ; Donat et Van Den Berg, 1992 ; Van den Berg, 1989 ; Wang, 1985). Comme toutes techniques analytiques spécifiques à la détermination d'éléments traces, ces techniques électrochimiques souffrent d'un certain nombre d'interférences. Ainsi, la formation de composés intermétalliques (Shuman *et al.*, 1976), l'adsorption de substances organiques (Raspor *et al.*, 1985 ; Raspor et Valenta, 1988) ou le recouvrement de pics (Pižeta *et al.*, 1999) peuvent être à l'origine de difficultés dans l'analyse des résultats obtenus. S'ajoutent également les problèmes inhérents à toutes mesures de traces, i.e. les contaminations qui peuvent aussi bien être dues aux prélèvements et stockages qu'aux mesures elles mêmes, on parle alors de contamination rémanente. Ces interférences et/ou contaminations devront donc être systématiquement minimisées pour pouvoir caractériser la spéciation des métaux traces aux concentrations naturelles.

III.B.1/ Considérations générales sur les techniques électrochimiques par redissolution:

L'analyse par redissolution est une technique analytique qui utilise une étape d'électrolyse afin de préconcentrer le ou les éléments chimiques présents dans la solution dans ou à la surface de l'électrode de travail. La plupart des mesures par redissolution impliquent une préconcentration (ou dépôt) sur une électrode de mercure. Dans ce cas, l'étape de préconcentration peut être assimilée à une extraction chimique consistant en une dissolution de l'élément dans le mercure à un niveau nettement plus élevé que celui de la solution analysée. Cette étape de préconcentration est suivie d'une mesure électrochimique par réoxydation de l'élément concentré (étape de redissolution). Cette combinaison d'une étape de préconcentration avec des procédures de mesures élaborés (III.B.2.c/) permet d'accroître le ratio signal/bruit et donc rend efficaces ces techniques pour l'analyse de métaux à l'état de traces. Le type d'analyse par redissolution le plus couramment utilisé est la voltamétrie par redissolution anodique (ASV).

La voltamétrie se réfère à une classe de techniques électrochimiques pour laquelle le courant est mesuré à une électrode de travail en fonction d'un potentiel qui lui est appliqué. Les réactions de réduction ou d'oxydation générées par le potentiel appliqué ont donc lieu à cette électrode de travail. Plus le potentiel de l'électrode devient négatif, plus elle devient un réducteur fort, donc une source d'électrons. Au cours de la mesure voltamétrique, la variation du potentiel suit le plus souvent une rampe linéaire ou un train d'impulsions (III.B.2.c/). Si une espèce électroactive est présente, un courant est enregistré lorsque le potentiel appliqué devient suffisamment négatif (ou positif), pour qu'elle puisse être électrolysée. Le courant ainsi généré, résultant du changement d'état d'oxydation de ces espèces électroactives, est nommé courant faradique, parce qu'il obéit à la loi de Faraday. Ce courant faradique est une mesure directe de la vitesse de la réaction redox à l'électrode. En simplifiant les processus réellement en jeu, il dépend principalement de deux phénomènes: (i) la vitesse de déplacement des espèces de la solution à l'électrode, (ii) la vitesse de transfert des électrons de l'électrode aux espèces chimiques et réciproquement. Se superposant au courant faradique, un "courant de base" ("background current") (Wang, 1985), indépendant des réactions redox, passe à travers la cellule. Par similitude au comportement

électrique des capacités, ce courant est appelé courant capacitif. Il est dû au réarrangement des molécules chargées en couche de polarisation et ne correspond pas à un transfert d'électron de la solution vers l'électrode de travail. Au contraire du courant faradique, qui a été représenté par des fonctions mathématiques, il est vrai souvent complexes, les variations du courant capacitif sont difficilement prévisibles. Le développement des techniques analytiques et l'accroissement de leur précision passent donc nécessairement par une minimisation de cette composante capacitive du courant d'électrolyse mesuré à l'électrode de travail (Bard et Faulkner, 1983 ; Wang, 1985).

Le graphique courant-potential résultant de cette analyse est nommé voltamogramme. Suivant le type de mesure utilisé, les réponses sont représentées par des vagues ou des pics. D'une manière générale, c'est cette dernière représentation qui est la plus utilisée car elle accroît considérablement la précision sur l'analyse des voltamogrammes. La forme exacte de ces réponses (pics) est gouvernée par différents processus apparaissant pendant la réaction. Un voltamogramme d'un mélange d'espèces électroactives est constitué de la somme des vagues ou des pics caractéristiques des éléments pris individuellement.

La polarographie est un type de voltamétrie qui utilise comme électrode de travail une (ou plusieurs) goutte(s) de mercure. Historiquement, elle se référait à une mesure directe, i.e. sans préconcentration, de la réduction des métaux sur des gouttes successives (tombantes) de mercure. Par abus de langage, on nomme ainsi aujourd'hui les techniques plus récentes travaillant sur des goutte de mercure pendantes. Ces techniques sont très souvent utilisées pour l'analyse d'espèces réductibles. A la fin de l'étape de dépôt, la concentration de l'élément réduit à la surface ou dans le mercure (goutte ou film) est 100 à 1000 fois supérieure à celle de l'échantillon. Les métaux ainsi amalgamés sont mesurés dans une seconde étape (redissolution), par l'application d'un balayage de potentiel vers les valeurs positives (potentiel anodique) et mesures des pics (ou vagues) d'oxydation formées, au potentiels standards E° . Il a été montré théoriquement que le courant de pic était proportionnel à la concentration du métal dans la solution, dans la mesure où les conditions de dépôts sont inchangées (équations de Cottrell, de Levich, d'Ilkovic ou de Koutecky (Bard et Faulkner, 1983)). Le potentiel de pic quant à lui permet d'identifier le métal analysé.

Une autre technique de redissolution est également utilisée: la CSV. L'élément considéré est préconcentré à la surface de l'électrode, soit directement par oxydation formant alors un film insoluble, soit par le biais d'un autre élément (le plus souvent une molécule organique spécifique) qui est adsorbé à la surface de la goutte au potentiel considéré. L'élément préconcentré est ensuite mesuré pendant une étape de redissolution cathodique par un balayage du potentiel vers les valeurs négatives, on observe alors son pic (ou sa vague) de réduction. Cette technique permet d'analyser un grand nombre de métaux ne formant pas d'amalgame avec le mercure (Achterberg et Braungardt, 1999), ou de composés organiques possédant des propriétés d'oxydo-réduction (Al-Farawati et Van Den Berg, 1997). Il est généralement admis qu'elle est plus sensible que l'ASV mais par contre elle nécessite des conditions d'analyse très strictes (pH, force ionique, potentiel de dépôt, ...), qui peuvent entraîner dans certains cas des imprécisions sur la détermination ultérieure de propriétés de complexation par exemple, notamment par compétition vis-à-vis du métal entre le ligand ajouté (pas toujours correctement caractérisé en terme de réactivité) et les ligands naturels (Pižeta et Branica, 1997).

III.B.2/ Principe de fonctionnement de l'ASV:

a/ La cellule de mesure et les électrodes:

Les mesures par ASV sont réalisées au sein d'une cellule électrochimique, qui est généralement un récipient thermostaté en verre, téflon voire en quartz, de 5 à 200mL. Le matériel utilisé est choisi pour engendrer le moins d'interférences possibles, notamment par adsorption et/ou relargage des métaux. La mesure par ASV de ces métaux nécessitent trois

électrodes: travail, référence, auxiliaire ; immergées dans la solution. Ces électrodes, ainsi que le système d'agitation (sauf dans le cas d'un barreau aimanté) et le tube de purge sont maintenus par un couvercle généralement en téflon. Une électrode de pH et un système d'ajouts de solutions standard peuvent également prendre place dans la cellule.

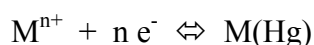
Les électrodes de travail utilisées sont généralement caractérisées par une faible surface, ce qui améliore la polarisation. De plus, ces petites électrodes permettent de minimiser les diminutions, par électrolyse, des concentrations en espèces électroactives analysées dans la solution. En voltamétrie par redissolution, les électrodes les plus couramment utilisées sont soit des micro-gouttes de mercure (SMDE: Static Mercury Drop Electrode, HMDE: Hanging Mercury Drop Electrode), soit des films de mercure. Des électrodes solides construites en or, carbone ou platine sont également utilisées pour la détermination de métaux tels que Se, Ag, Au, possédant un potentiel plus anodique que celui du mercure.

Les électrodes de référence les plus courantes sont l'électrode au calomel et l'électrode Ag/AgCl, reliées à la solution par un pont salin. La troisième électrode du système est appelée contre-électrode ou électrode auxiliaire. Elle est fabriquée dans un matériel chimiquement inerte, le plus souvent en platine ou en graphite. Alors que le potentiel est appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence (pendant les étapes de préconcentration et de mesure), on mesure le courant entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire. Ce circuit électrique permet de ne pas faire passer de courant dans l'électrode de référence, et de s'affranchir de la chute ohmique.

Avant toute mesure d'ASV, il convient d'éliminer l'oxygène dissous de la solution, ce dernier pouvant atteindre des concentrations assez fortes à température ambiante. En effet, l'oxygène génère des interférences sur le polarogramme, dues à sa réduction en H₂O₂ puis H₂O, respectivement à -0.05V et -0.9V (par rapport à une électrode au calomel). La méthode la plus simple pour atteindre ce but consiste à purger la solution à l'aide d'un gaz électro-inactif tel que l'azote ou l'argon. L'azote est plus fréquemment utilisé car il est nettement moins onéreux.

b/ Etape de dépôt - préconcentration:

L'étape de dépôt, permettant de préconcentrer les espèces électro-actives, est primordiale en ASV. Elle consiste le plus souvent à porter le couple électrode de travail- électrode de référence, à un potentiel plus négatif que le potentiel standard du métal à analyser, pendant une durée déterminée et dans des conditions les plus reproductibles possibles, notamment l'agitation de la solution. A ce potentiel, le métal est réduit à l'électrode de mercure puis amalgamé, suivant la réaction:



Pour les électrodes solides, la réaction de réduction abouti à la formation d'un film de métal déposé en surface.

La formation d'un amalgame dépend principalement de la solubilité du métal considéré dans le mercure. Cette solubilité peut varier de 3×10⁻⁴ (en % atomique) pour le cobalt à 10.0 pour le cadmium. Cette valeur de solubilité va conditionner la capacité d'analyser ces métaux mais aussi la possibilité de saturer le mercure et donc de ne plus avoir un signal de redissolution analysable.

Suivant la valeur du potentiel de dépôt appliqué, un ou plusieurs métaux pourront être analysés simultanément. Dans la pratique, on applique généralement un potentiel de dépôt inférieur de 0.3V à 0.5V au potentiel standard calculé par l'équation de Nernst. La limite inférieure de potentiel, visualisée par un mur sur le voltamogramme, est définie par la formation d'H₂, elle est d'autant plus basse que le milieu est basique. La limite supérieure de potentiel, définissant ainsi le fenêtre analytique des techniques de redissolution, est définie par l'oxydation de Hg₀ en Hg₂²⁺, ou Hg₂Cl₂ en présence de chlorures.

La quantité de métal réduit et amalgamé à l'électrode est dépendante d'un certain nombre de paramètres. En effet, l'intensité de réduction (i.e. mesurée pendant l'étape de dépôt) du métal considéré est théoriquement constituée de trois composantes: diffusion, convection et migration. La migration est facilement contrôlable par ajout d'un sel de fond non-interférant (par exemple NaNO_3 , KClO_4 , ...), i.e. de cations et d'anions non-électroactifs assurant le transport de charge dans la solution à la place des métaux qui doivent être analysés. La convection est dépendante de la vitesse d'agitation de la solution. Cependant, comme le montre la figure III.1A, la relation entre la vitesse d'agitation et l'intensité résultante de la réoxydation du métal (i.e. mesurée pendant l'étape de redissolution) n'est pas linéaire. Il convient donc de travailler à une vitesse constante durant toute l'expérience pour obtenir des résultats reproductibles.

Dans ce cas, l'intensité de réduction mesurée n'est donc fonction que de la composante de diffusion. L'expression de cette composante est elle même fonction de différents paramètres, notamment des caractéristiques de l'électrode (goutte/film, volume et surface), de la concentration en métal dans la solution, et de l'épaisseur de la couche de diffusion. Dans la pratique, le temps de dépôt ainsi que la taille de la goutte vont également modifier l'intensité de réoxydation du métal amalgamé (figures III.1B et III.1C), elle même fonction linéaire de la quantité de métal amalgamé et donc de la quantité de métal initialement présent dans la solution. Les équations théoriques reliant l'intensité de réoxydation au temps de dépôt, à la vitesse de rotation, à la taille et à la forme de la goutte, ... sont relativement complexes.

Dans les faits, l'étape de préconcentration peut éventuellement être précédée d'un temps de conditionnement, durant lequel on peut: (i) soit porter l'électrode à un potentiel positif pour la décontaminer (technique utilisée pour les électrode tournantes à film de mercure, ou les micro-électrodes), (ii) soit porter l'électrode à un potentiel nettement plus négatif que celui utilisé pour le dépôt, elle est alors chargée négativement ce qui peut limiter l'adsorption de molécules organiques interférentes (souvent chargée négativement), telles que des surfactants.

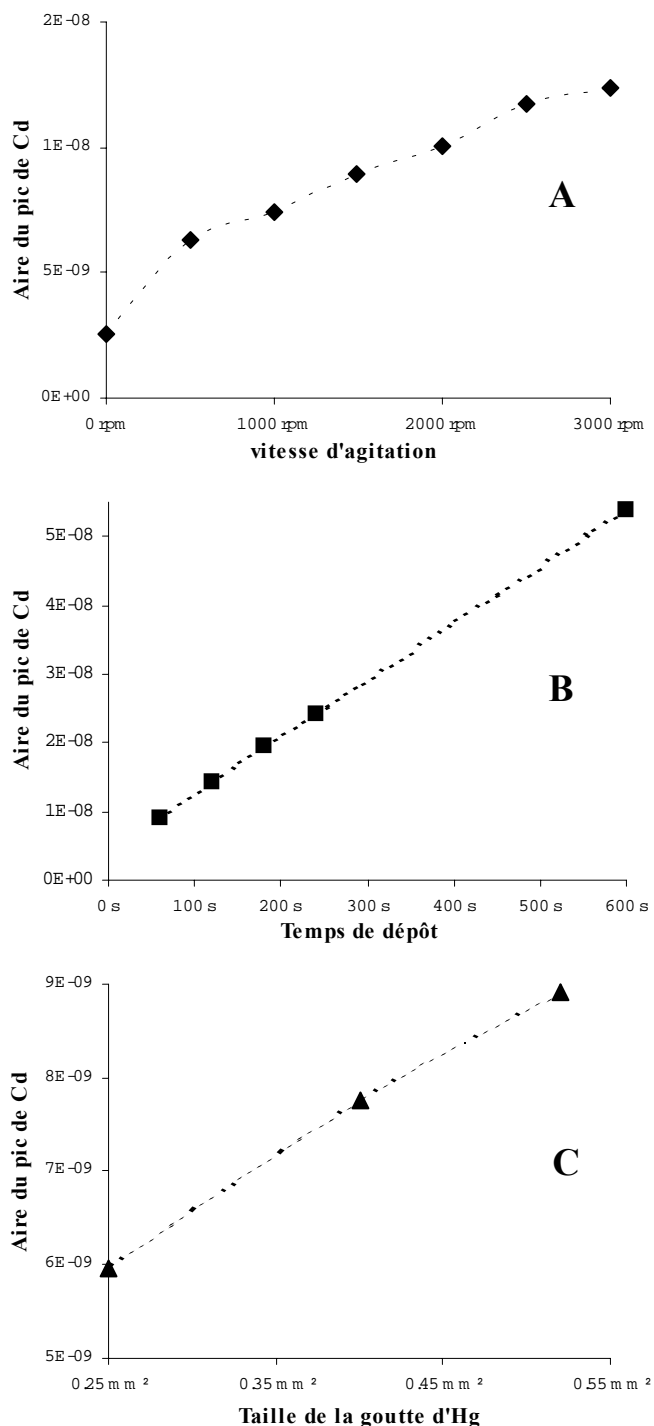


Figure III.1: Influence de la vitesse d'agitation (T_d : 60s, S: 0.52mm^2), du temps de dépôt (V : 2000rpm, S: 0.52mm^2) et de la taille de la goutte (T_d : 60s, V : 2000rpm) sur l'aire du pic de réoxydation du Cd.

c/ Etapes de repos et de redissolution:

Entre les étapes de dépôt et de redissolution, un temps d'équilibre est indispensable pour que la distribution de la concentration en métal dans le mercure soit uniforme. Ce temps d'équilibre, de quelques secondes, se fait donc sans agitation. Cependant, il ne doit pas être trop long car l'électrode de travail est généralement portée à un potentiel voisin de celui de début de balayage (étape de redissolution), la réduction des métaux électro-actifs est alors toujours possible, mais cette fois sans une composante convective contrôlée, ce qui rend plus aléatoire l'exploitation des résultats (figure III.2).

L'étape de redissolution consiste généralement en un balayage des potentiels vers les valeurs positives, linéairement ou en utilisant d'autres formes de fonctions potentiel-temps. Quand le potentiel atteint un potentiel standard d'un couple métal amalgamé-métal ionique, le métal considéré est réoxydé, et un courant résultant de l'intensité de réoxydation est observé. L'intensité obtenue pour un pic caractéristique d'un métal est proportionnelle à la concentration dans ou à la surface de l'électrode, et donc à la concentration dans la solution.

Parmi l'ensemble des techniques de redissolution, la voltamétrie différentielle à impulsion (DPSV: Differential Pulse Stripping Voltammetry) est sans nul doute la plus utilisée et l'une des plus efficaces. Dans ce mode de balayage, des impulsions ("pulse") de potentiel d'amplitudes constantes sont surimposées au balayage linéaire de potentiel. L'amplitude, la durée et l'intervalle de temps entre deux impulsions sont des paramètres conditionnant l'allure du voltamogramme. Le courant est échantillonné deux fois par impulsion une fois juste avant l'impulsion, et une fois juste à la fin de l'impulsion. Le voltamogramme est construit à partir du tracé de la différence entre ces deux mesures, en fonction du potentiel. Cette technique permet de minimiser l'influence de la composante capacitive (courant capacitif ou courant de charge) dans l'intensité mesurée, au profit de la composante faradique (i.e. celle qui est représentative des réactions redox mises en jeu), car en fin d'impulsion le condensateur, formé à l'électrode par les charges négatives et positives, est presque totalement déchargé (décroissance en $1/\exp$), donc son intensité est négligeable à la fin de l'impulsion.

D'autres techniques de "stripping" ont été développées, telles que la Staircase, la Square Wave (SW), ou l'Alternating Current (AC) Stripping Voltammetry, suivant le type de rampe de potentiel utilisé. La SWASV présente l'avantage d'être nettement plus rapide (quelques secondes) que la DPASV (quelques minutes), ce qui nécessite par contre un appareillage plus sophistiqué (Bard et Faulkner, 1983 ; Wang, 1985).

III.B.3/ Mesure par DPASV des concentrations en métaux traces:

Dans cette étude, les métaux traces (principalement le cadmium et le plomb) ont été déterminés à partir de mesures par DPASV. En effet, cette technique est:

- (i) suffisamment sensible pour atteindre les concentrations naturelles de ces éléments,
- (ii) possède une fenêtre analytique importante, donc elle est tout à fait adaptée à l'analyse des interactions entre ces métaux et des échantillons naturels sur une large gamme de concentrations,

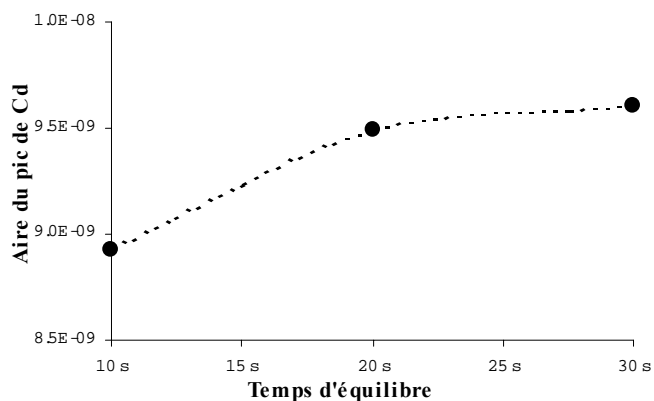


Figure III.2: Influence du temps d'équilibre sur l'aire du pic de cadmium (T_d : 60s, V: 2000rpm, S: 0.52mm²)

- (iii) suivant les conditions, de pH notamment, elle permet l'investigation de la spéciation des métaux analysés et donc en particulier de différencier la fraction de métal organique de la fraction inorganique, ce qui est indispensable pour l'étude des phénomènes de complexation avec des MON.

Cette technique a donc fait l'objet d'adaptations pour tenter de la rendre la plus performante possible et d'obtenir des résultats suffisamment fiables pour pouvoir ensuite modéliser les propriétés de complexation des MON étudiées.

a/ Notion de labilité électrochimique – définition de la spéciation chimique:

La détermination de la spéciation des métaux traces dans des eaux naturelles est un challenge de par leurs très faibles concentrations (Buffle, 1988). Quel que soit la technique analytique utilisée, il faut veiller à minimiser d'éventuelles contaminations ainsi que la modification des équilibres inévitablement générée par une succession d'étapes de préconcentration et/ou séparation. De ce fait, aucune technique n'est tout à fait satisfaisante. Cependant, les techniques électrochimiques par redissolution offrent la possibilité de mesurer ces métaux à l'état de trace, sans pré-traitement, ainsi que d'appréhender les différentes formes qu'ils prennent dans le milieu (Wang, 1985).

Suivant le type de procédure analytique utilisée (en DPASV), les concentrations totales ou labiles peuvent être mesurées. Le métal labile (ou électrochimiquement labile), représente une fraction du métal total mesurable, dans des conditions expérimentales bien définies, au pH naturel voire dans un milieu acide tamponné (par exemple acide acétique/acétate, à pH 4.6). Cette fraction est constituée du métal libre hydraté ainsi que de l'ensemble des complexes labiles, i.e. qui peuvent se dissocier très rapidement pour conduire au métal libre (Bard et Faulkner, 1983). La concentration en métal labile ainsi mesurée dans un milieu, peut être considérée comme une estimation de la fraction de métal biodisponible, sachant que le métal libre hydraté est généralement le plus réactif. Par opposition, la fraction de métal qui dans les mêmes conditions analytiques n'est pas mesurée est constituée de complexes métalliques inertes et de la fraction de métal adsorbé à la surface de colloïdes, le plus souvent de natures organiques (Wang, 1985).

Le choix du potentiel de dépôt est important pour l'évaluation de la labilité des complexes métalliques, car s'il est suffisamment négatif, il peut conduire à la réduction de certains complexes inertes. De plus, la vitesse d'agitation de la solution, qui contrôle l'épaisseur de la couche de diffusion, impose le temps de résidence d'un complexe à la surface de l'électrode et donc sa contribution éventuelle au signal de redissolution. Evidemment, cette contribution dépend aussi de la vitesse de dissociation du complexe. La terminologie d'espèces métalliques labiles est donc liée aux conditions analytiques, ces dernières doivent donc être choisies avec la plus grande attention.

La différenciation entre métal libre hydraté et métal labile peut être observée par le déplacement "shift" du potentiel de pic. Ces déplacements peuvent être interprétés de la même manière que les déplacements de potentiels de demi-vague en polarographie classique (i.e. sans étape de dépôt), i.e. comme une indication de la formation de complexes réductibles en solution. Théoriquement, l'observation du déplacement d'un pic en fonction de l'ajout d'un ligand ou du pH de la solution peut permettre l'évaluation des constantes de stabilité et du nombre de coordination (Cukrowski *et al.*, 1996). Cependant, pour des échantillons naturels, la position du pic pourra simplement donner une information sur la forme chimique du métal, i.e. libre ou complexé. Une approche plus précise mais demandant beaucoup de temps consiste à réaliser des pseudo-polarogrammes, i.e. à analyser un échantillon par DPASV en faisant varier le potentiel de dépôt (Town et Filella, 2000 ; Omanović *et al.*, 2003). La courbe résultante, formée à partir des maximums des pics obtenus pour chaque mesure de DPASV, peut permettre d'étudier l'état de labilité des différents complexes du métal.

Pour mesurer par DPASV la concentration en métal total, il faut travailler à pH acide (inférieur à 2) avec un potentiel de dépôt suffisamment négatif (la valeur de ce potentiel étant dépendante du ou des métaux à analyser), ce qui décomplexe les métaux initialement associés aux ligands, i.e. à la MON, par un phénomène de compétition entre le proton et les métaux vis-à-vis des groupements complexants de ces ligands (Muller, 1996). Une autre technique consiste à irradier l'échantillon aux UV, avant l'analyse, détruisant ainsi toute molécule organique présente dans le milieu (Kolb *et al.*, 1992).

Deux *procédures* de DPASV ont donc été développées pour ce travail, l'une pour la mesure des concentrations en métaux totaux dans les échantillons prélevés acidifiés (**III.B.3.b/**), l'autre pour l'étude de la spéciation des métaux en présence de MON, afin de caractériser les interactions analysables par DPASV (**III.C.2/**).

b/ Procédure de détermination des concentrations totales en métaux:

La concentration totale en un métal dans l'échantillon issu d'un milieu donné, n'est pas une donnée suffisante pour pouvoir estimer son impact par exemple dans la chaîne trophique, elle est pour autant indispensable à la caractérisation des interactions de ce métal avec les autres éléments. En effet, avant toute analyse, par exemple des propriétés de complexation d'une MON, il convient de déterminer la concentration totale de métal initialement présent dans l'échantillon, pour pouvoir faire un calcul de spéciation correct.

Pratiquement, lors d'un prélèvement, l'échantillon est subdivisé en deux fractions, filtrées soit sur un filtre acétate (0.45 μm , lavé à l'acide), soit sur un filtre de verre (0.7 μm , oxydé). La première est acidifiée, le plus souvent par H_2SO_4 , avant le stockage. C'est sur cette fraction que les mesures de concentrations totales en métaux seront effectuées. La deuxième fraction est seulement empoisonnée à l'aide d'azoture de sodium (NaN_3), ce qui permet de stopper toute activité bactérienne, sans pour autant trop modifier les équilibres chimiques du système. Les techniques d'analyses visant à quantifier et qualifier la MON seront effectuées sur cette deuxième fraction.

b.1/ Appareillage utilisé:

Les mesures de concentrations totales en métaux ont été réalisées sur un stand Metrohm-EcoChemie. Il est constitué d'un voltamètre $\mu\text{Autolab}$ (EcoChemie), générant les signaux de DPASV et permettant l'acquisition des intensités, connecté à un système Metrohm VA 663 + IME 663. Ce dernier est composé d'une électrode à goutte de mercure (Static Mercury Drop Electrode: SMDE), d'une électrode de référence (Ag/AgCl/KCl 3M) et d'une électrode auxiliaire en graphite. La formation des gouttes de mercure (hexadistillé), et leur maintien au bout du capillaire, sont assurés par un système entièrement pneumatique (N_2 ultra-pur). La solution est agitée à l'aide d'une tige en PTFE tournante. L'échantillon est purgé par de l'azote préalablement saturé en eau. Les cellules voltamétriques utilisées, de différentes tailles (suivant le volume d'échantillon analysé), sont en verre. L'appareillage est installé sous une hotte à flux laminaire de classe 100 pour minimiser les contaminations. La cellule voltamétrique utilisée dans cette étude est représentée schématiquement par la figure **III.3**.

Les techniques électrochimiques par redissolution telles que la DPASV ne se prêtent pas à la détermination de concentrations en métaux à l'aide d'une courbe de calibration, au contraire des techniques spectroscopiques par exemple. En effet, elles sont trop sensibles aux conditions de mesure (T, P, pH, I, vitesse d'agitation, ...), il faut donc avoir recours à des ajouts dosés. Pour cela, ce stand a été équipé d'une burette d'ajouts automatiques Metrohm Dosimat 765 (5mL).

Le système utilisé le plus fréquemment pour ajouter un volume de solution standard à un échantillon, à l'aide d'une burette automatique, consiste à utiliser une pointe d'ajout, plongeant dans la solution. Cette pointe d'ajout est le plus souvent équipée d'un système anti-diffusion.

Cependant, les expériences de DPASV étant souvent longues, et la solution standard concentrée, ce système génère des micro-contaminations qui peuvent ne pas être négligeables et donc entraîner un biais dans les concentrations mesurées.

Pour ce faire, le stand VA663 a été modifié de telle manière que les ajouts se fassent via le tube de purge d'azote qui plonge dans la solution (figure III.3). L'arrivée de la burette a été connectée en amont du tube de purge, il n'y a donc plus de contact direct avec la solution. Le tube de purge a été remplacé par un micro-tube, ce qui a permis de diminuer notablement le volume mort. Dans la même optique, l'espace où sont connectées les arrivées de la burette et de l'azote ainsi que le tube de purge, a été comblé avec des micro-pastilles de téflon. Ces adaptations ont permis d'éliminer toute contamination par diffusion de la (ou des) solution(s) standard(s), et a nettement amélioré la reproductibilité des ajouts de petits volumes. Ainsi, alors qu'avec le système "classique" il n'est pas conseillé d'ajouter un volume inférieur à 50 μ L, ce nouveau dispositif permet d'ajouter sans problème des volumes allant jusqu'à 20 μ L (valeur supérieure au volume minimal de 5 μ L distribuable avec ce type de burettes).

Tous les éléments de cet appareillage sont connectés à un PC, et pilotés à l'aide du logiciel GPES 4.9 développé par EcoChemie. La programmation d'expériences constituées d'une suite de mesure DPASV est donc facilitée.

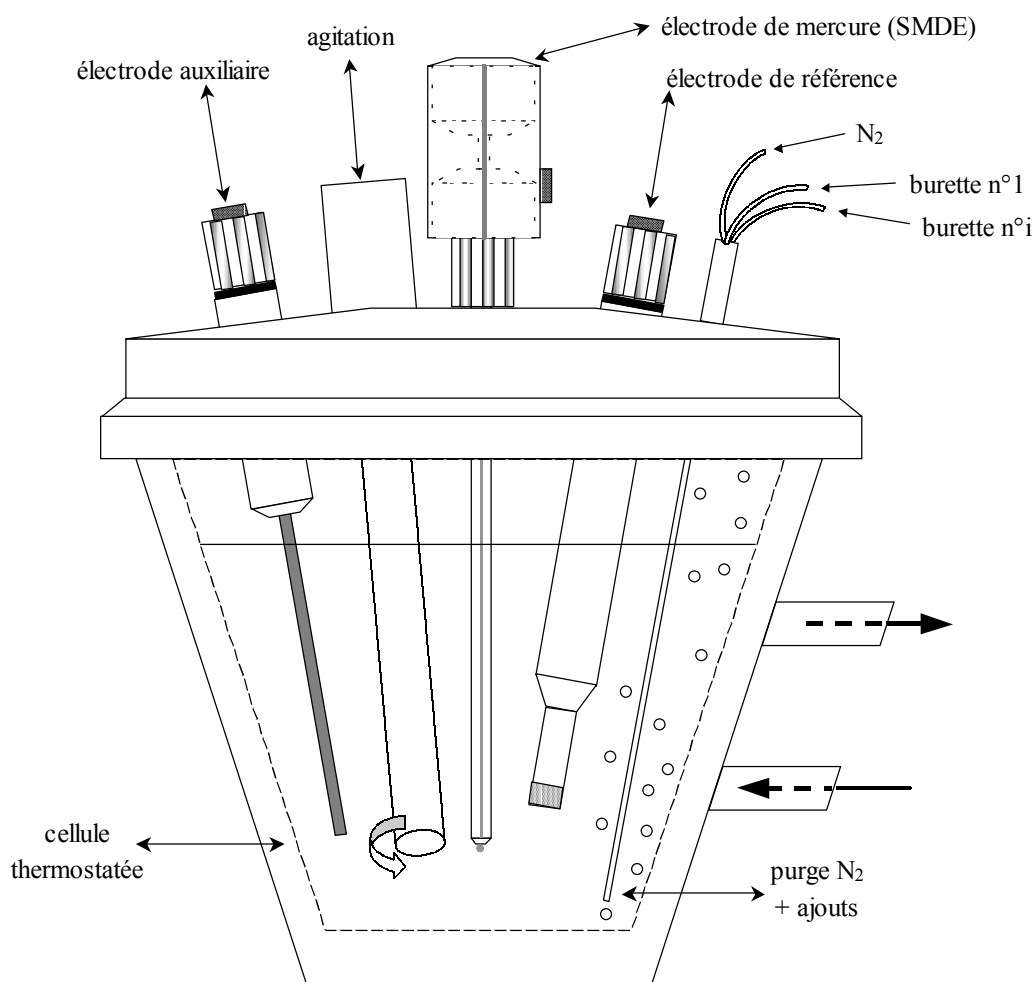


Figure III.3: Schéma de la cellule voltamétrique utilisée pour les mesures de DPASV

b.2/ Développement d'une procédure analytique spécifique à la mesure des traces:

Les différents paramètres contrôlant la mesure par DPASV du cadmium, du plomb et du cuivre ont fait l'objet d'une étude approfondie visant à optimiser leur valeur pour avoir le meilleur rapport signal/bruit dans les conditions d'analyses choisies et avec l'appareillage disponible. Les influences de certains paramètres sur la mesure de la concentration en Cd labile

(pH<2, eau ultra-pure, NaNO₃ 0.1M, 25°C) sont représentées sur les graphiques III.1A, III.1B, III.1C, III.2. Cette étude a permis de paramétrer la *procédure* de DPASV pour la mesure des concentrations totales en métaux sur des échantillons naturels. Ces paramètres sont rassemblés dans le tableau III.1.

Afin de minimiser les effets de contamination rémanente, les mesures de DPASV sont effectuées après avoir éjecté quatre gouttes, donc a priori sur du mercure toujours propre. Dans la même optique, un jeu de plusieurs cellules voltamétriques est utilisé afin de toujours travailler sur une cellule propre, i.e. nettoyée pendant plusieurs heures dans l'acide nitrique à 10%.

Dans le but de réaliser automatiquement les ajouts dosés pour déterminer la concentration en Cd, Pb et Cu d'un échantillon, cette *procédure* de DPASV a été insérée dans un *projet* élaboré sous GPES. Le logiciel GPES permet en effet de programmer à l'aide de lignes de commandes, les instructions nécessaires aux mesures électrochimiques (DPASV, SWASV, CSV, ...), à l'ajout de solutions standard par le biais des burettes connectées, à un temps d'attente avec/sans agitation avec/sans purge,

D'une manière générale, la concentration en cuivre dans les échantillons est toujours nettement supérieure à celle de cadmium et de plomb, une solution standard à 100 ppb en Cd et Pb et 1 ppm en Cu a donc été utilisée pour les ajouts dosés. Ces trois métaux peuvent être dosés simultanément, ce qui n'est pas le cas du zinc qui nécessite un pH moins acide (généralement tamponné à 4.6) . En effet, en milieu très acide, son pic de réoxydation est recouvert par la limite inférieure du voltamogramme (réduction d'H⁺). Afin d'accroître la résolution sur la détermination des concentrations, et ce malgré l'augmentation inévitable de la durée des mesures, le processus d'ajouts dosés adopté consiste à faire trois mesures de DPASV sur l'échantillon "brut" puis une mesure par ajout (5 ajouts de 50 µL de la solution standard et un 6^{ème} de 250 µL à 20 mL d'échantillon acidifié). La gamme de concentrations ainsi balayée permet d'étudier des échantillons naturels plus ou moins contaminés, sans être obligé de changer de solution d'ajout. La durée de dépôt t_d peut cependant être ajustée, par exemple pour caractériser des échantillons très peu pollués. Par cette technique, l'analyse d'un échantillon nécessite 1 à 2 heures.

<i>purge</i>	durée	10 à 120 s
	agitation	2000 rpm
Etape de préconcentration		
<i>gouttes de mercure</i>	taille	0.52 mm ²
	dépôt sur la 5 ^{ème}	
<i>dépôt</i>	durée (t_d)	60 à 600 s
	potentiel (E_d)	-1.1 V
	agitation	2000 rpm
<i>équilibre</i>	durée	10 s
	potentiel	-1.1 V
	agitation	//
Etape de redissolution - mesure		
<i>fenêtre balayée</i>	potentiel initial	-1.1 V
	potentiel final	0.25 V
	agitation	//
<i>scan</i>	vitesse de scan	19.5 mV/s
	intervalle de temps	0.10 s
	intervalle de potentiel	1.95 mV
<i>impulsions</i>	durée	0.04 s
	amplitude	25.05 mV

Tableau III.1: paramètres optimisés de la *procédure* de DPASV pour la détermination des concentration totales en métaux traces (Cd, Pb et Cu à pH<2)

b.3/ Présentation des voltamogrammes:

La figure III.4A représente les voltamogrammes obtenus pour deux mesures consécutives de DPASV (t_d 120s) effectuées sur un échantillon d'eau de mer acidifié (prélèvement de surface, Port de Toulon, 17/03/2003), avant ajout de la solution standard. Cette *procédure* analytique permet de détecter simultanément les métaux suivants: Cd (-0.60 V), Pb (-0.40 V), Cu (-0.16 V). Le pic de zinc est également observable (-0.94 V) mais est trop recouvert par le pic de réduction des protons pour être correctement analysé.

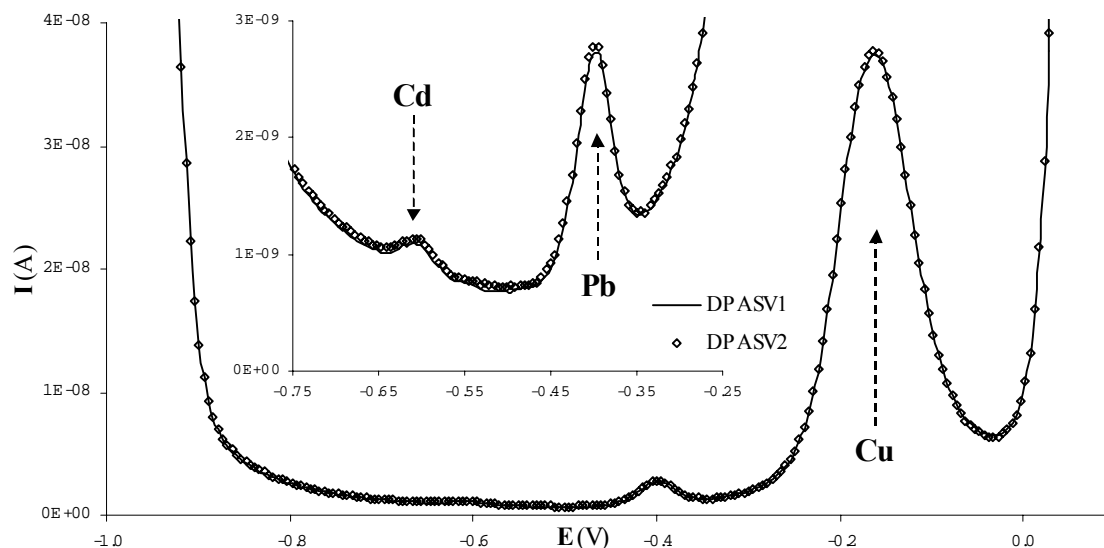


Figure III.4A: voltamogrammes obtenus sur un échantillon d'eau de mer acidifié

Ces pics sont nettement séparés les uns des autres, le cuivre apparaissant sous la forme d'un mono-pic et non d'un massif de pics comme cela est observable pour des échantillons d'eau douce. Ceci s'explique par le fait que la concentration en chlorures est très forte (S‰ 37.5) donc ce métal est presque totalement sous la forme de complexes $\text{Cu}(\text{Cl})_i^{2-i+}$. De plus, ce pic est assez bien séparé du mur d'oxydation du mercure, ce qui n'est pas non plus toujours le cas, surtout lorsque la concentration en chlorure est importante et donc que le "mur" d'oxydation est caractéristique de la formation de Hg_2Cl_2 (E° plus faible que $\text{Hg}_0 \rightarrow \text{Hg}_2^{2+}$).

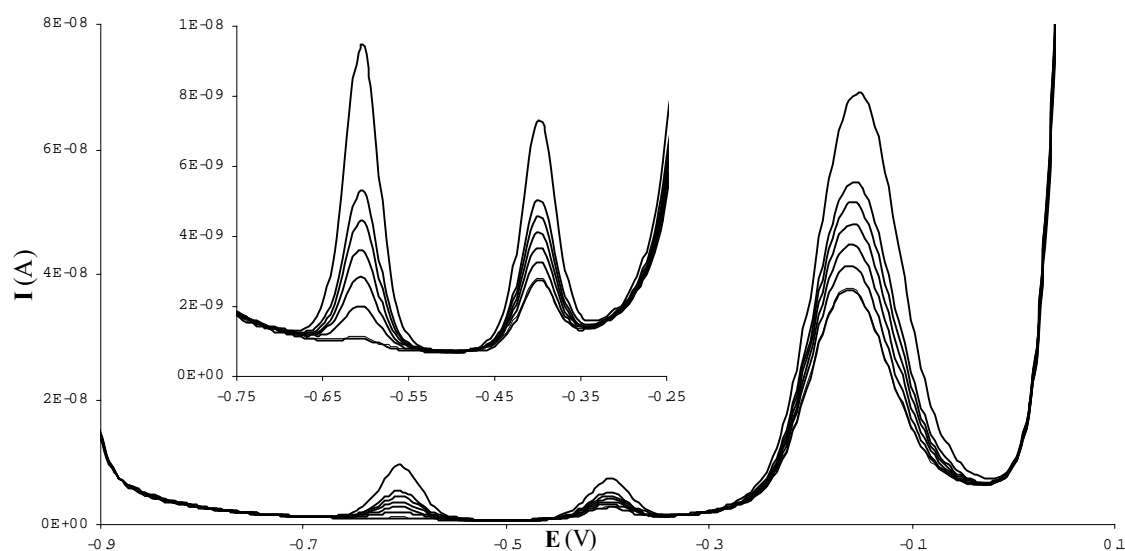


Figure III.4B: Ajouts dosés de Cd, Pb, Cu

La reproductibilité de la *procédure* adoptée est correcte dans la mesure où on ne peut pas distinguer les deux voltamogrammes. Par contre, la ligne de base n'est pas linéaire, ce qui complique l'exploitation de ces voltamogrammes en vue de la détermination des concentrations en métaux labiles (assimilables aux métaux totaux compte tenu des conditions analytiques).

Les voltammogrammes obtenus pour les ajouts dosés de Cd, Pb et Cu réalisés sur le même échantillon, à l'aide d'un *projet* développé sous GPES, sont présentés sur la figure **III.4B**. Au cours du dosage, les positions des pics de réoxydation de ces trois métaux bougent peu, indiquant qu'il n'y a pas de modification de leur spéciation.

D'un ajout à un autre, la ligne de base n'évolue pas. Etant donné qu'elle n'est pas linéaire, l'intégration des pics de Cd, Pb et Cu sur ces voltammogrammes nécessite donc une régression non-linéaire (par exemple polynomiale) de la ligne de base au niveau de chaque pic.

b.4/ Traitement des voltammogrammes:

Une des problématiques principales du traitement de voltammogrammes est de caractériser les pics (aire, hauteur, position) de manière systématique, rapide et suffisamment précise. En effet, les "murs" d'oxydation d'Hg et de réduction d'H⁺ perturbent la ligne de base des voltammogrammes, parfois même recouvrent certains des pics de réoxydation des métaux préconcentrés, rendant plus difficile leur interprétation. Les logiciels tels que GPES utilisés pour piloter les appareils de mesure de DPASV, possèdent généralement des outils informatiques permettant le traitement de ces voltammogrammes. Or, leurs systèmes de régression non-linéaire des lignes de base sont rarement suffisamment évolués pour permettre de correctement les reproduire. Ainsi, l'allure de la ligne de base simulée par ce type de logiciels, définie au niveau d'un pic de réoxydation, dépend des zones sélectionnées avant et après le pic et est le plus souvent trop influencée par le bruit sur la mesure du courant. Ceci a pour effet de rendre l'intégration d'un pic trop dépendante de l'appréciation qu'a l'utilisateur de sa ligne de base, ce qui nuit évidemment à l'objectivité des résultats obtenus. Une systématique de traitement des voltammogrammes obtenus lors d'ajouts dosés réalisés sur des échantillons naturels a donc été mise au point.

Compte tenu du fait que la ligne de base et la position des pics évolue peu lors d'ajouts dosés réalisés à pH acide (figure **III.4B**), la technique de traitement des voltammogrammes retenue dans cette étude consiste à soustraire aux voltammogrammes mesurés pour chaque ajout, le voltammogramme moyen obtenu pour l'échantillon brut. Alors, ces voltammogrammes différentiels présentent une ligne de base presque linéaire dans la zone des pics de Cd, Pb et Cu, ce qui simplifie nettement leurs intégrations. Les voltammogrammes ainsi modifiés sont présentés sur la figure **III.5**.

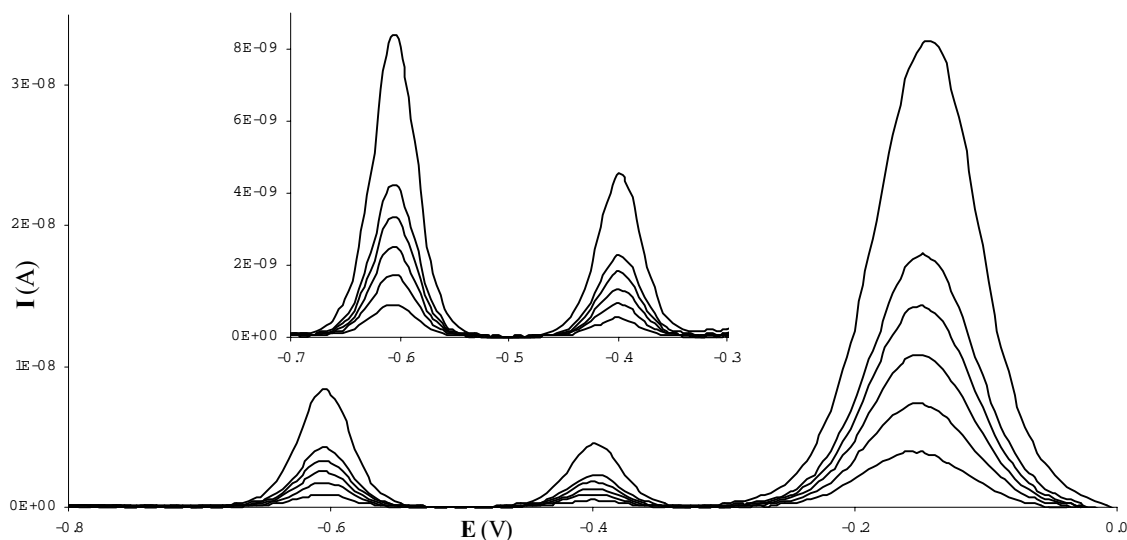


Figure **III.5**: Traitement des voltammogrammes obtenus pour les ajouts dosés de Cd, Pb, Cu

Pour chaque ajout, l'aire (ou la hauteur) de chaque pic est calculée à partir de la somme (i) de l'aire (hauteur) obtenue par intégration (ligne de base linéaire) du voltammogramme de l'ajout, et (ii) de l'aire (hauteur) moyenne obtenue par intégration (ligne de base polynomiale) des

voltamogrammes obtenus sur l'échantillon brut. La détermination de la concentration initiale en un métal consiste à tracer l'évolution de cette aire (ou de la hauteur) calculée en fonction de la concentration ajoutée en ce métal, puis de faire la régression linéaire de ces points.

Les graphiques ainsi obtenus pour l'échantillon utilisé comme exemple dans cette partie (prélèvement de surface, Port de Toulon, 17/03/2003), sont présentés sur la figure III.6. Les concentrations déterminées sont respectivement pour Cd, Pb et Cu de: $5.7 \times 10^{-10} \pm 0.6 \times 10^{-10}$ mol.l⁻¹, $5.2 \times 10^{-9} \pm 0.3 \times 10^{-9}$ mol.l⁻¹ et $3.7 \times 10^{-7} \pm 0.4 \times 10^{-7}$ mol.l⁻¹.

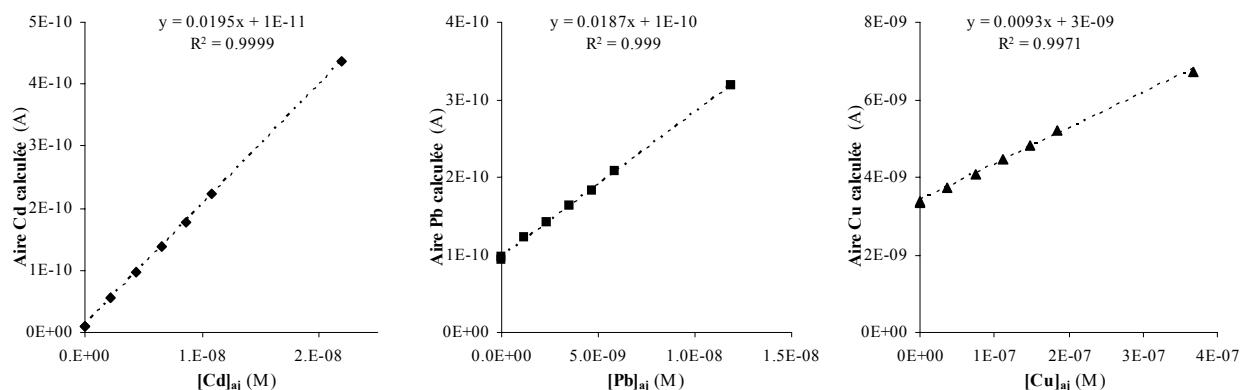


Figure III.6: Détermination des concentrations en Cd, Pb, Cu mesurées par DPASV

Cette technique analytique a été utilisée pour déterminer les concentrations totales en Cd, Pb et Cu de différents échantillons naturels, prélevés principalement dans le cadre des programmes Seine Aval2 et EcoDyn, avec une détection limite de l'ordre de 0.1 nM pour chaque métal.

III.C/ Analyse des interactions MON-métaux:

Comme cela a été vu, la mesure par DPASV de la concentration d'un métal dans un échantillon naturel, permet de déterminer la fraction de métal sous forme de complexes inertes, par différence à la concentration totale de ce métal (III.B.3.a/). Pour autant, cela ne permet pas directement de caractériser les propriétés de complexation des ligands présents dans l'échantillon. Pour cela, une titration par ajouts de solution(s) standard du métal à l'échantillon doit être réalisée.

Les premières expériences de titration d'échantillon naturel, suivies d'une détermination de la capacité complexante de l'échantillon, ont été effectuées suivant la technique de Chau (II.A/ et tableau II.1). Elles consistaient à faire plusieurs ajouts d'une même solution standard, et de suivre par polarographie la concentration en métal labile, i.e. non complexé par les ligands organiques. Cette technique ne permettant pas de calculer leur constante de complexation, elle a ensuite été remplacée par des traitements mathématiques des points expérimentaux, suivant les approches de Scatchard (1949) et de Ružić (1982) -Van den Berg (1982a, 1982b). Ces dernières ont, dans un premier temps, permis de caractériser les propriétés de complexation (K , L_T) d'une classe de ligand. Le développement de techniques analytiques plus sensibles que la polarographie, telles que la DPASV ou la CSV, a permis d'accroître la gamme de concentrations en métal analysées, i.e. la fenêtre analytique, et par la même la gamme de concentrations en sites complexants détectables sur les MON (Van den Berg, 1989). De ce fait, il a été possible de caractériser non pas une mais deux classes de sites, à l'aide des linéarisation de Scatchard et Ružić à deux ligands. Pour cela, les titrations réalisées sur les échantillons ont nécessairement dû être plus précises, i.e. constituées d'un plus grand nombre d'ajouts couvrant une fenêtre analytique élargie, facilitée par l'apparition de burettes d'ajouts automatisables. De nombreuses études sont encore basées sur cette combinaison "technique d'analyse/titration/traitement de données" (Abate et Masini, 2002 ; Kozelka et Bruland, 1998 ; Muller, 1996 ; Muller, 1999 ;

Rozan et Gaboury, 1999a ; Verweij et Ružić, 1997 ; Wells *et al.*, 1998 ; Xue et Sigg, 1998). Pour autant, il a été montré (Garnier *et al.*, 2004a) que la répartition des ajouts, mais aussi le type de traitement de données utilisé, avaient une influence considérable sur la justesse des paramètres de complexation déterminés, même dans le cas simple d'un seul ligand.

Compte tenu de la variété des groupements fonctionnels présents sur une MON, la représentation de ses interactions vis-à-vis des métaux traces par une distribution plus précise de ligands (i.e. plus de deux groupes de sites) peut paraître plus réaliste (Buffle, 1988 ; Lu et Allen, 2002 ; Tipping et Hurley, 1992 ; Tipping, 1993). De même, l'analyse de ses interactions vis-à-vis de différents métaux, voire cations, semble souhaitable par exemple pour tenir compte des phénomènes de compétition entre ces éléments (Kinniburgh *et al.*, 1999 ; Pinheiro *et al.*, 1999 ; Pinheiro *et al.*, 2000). De ce fait, une détermination correcte des paramètres de complexation des ligands, définis pour représenter la MON, nécessite la mise au point non seulement d'un outil de traitement de données suffisamment élaboré, mais aussi d'une technique analytique et d'une procédure d'ajouts spécifiques, permettant de balayer une très large gamme de concentrations en métaux, donc en sites complexants. Cependant, quelque soit la technique analytique utilisée et le traitement de donnée appliqué, il sera difficile de caractériser la complexation de sites dont le produit $K \times L_T$ est inférieur à 1, comme l'ont montré Ružić (1982) et Pižeta *et al.* (1997).

En ce sens, l'étude des interactions de la MON, présente dans des échantillons naturelles, vis-à-vis de deux métaux traces : le cadmium et le plomb a été réalisée à partir de titrations en mode logarithmique couplées à des mesures par DPASV des concentrations en métaux électrochimiquement labiles. En effet, comme cela a été théoriquement montré précédemment (II.E/), ce mode de titration accroît nettement la précision sur la détermination des paramètres de complexation.

Dans la mesure où l'objectif de ce travail est de modéliser les propriétés de la MON par un set de *quasi-particules*, afin de représenter non-seulement les interactions MON-Cd et MON-Pb, mais aussi les phénomènes de compétitions métal-métal et métal-proton, toutes ces interactions ne peuvent pas être étudiées par une seule analyse, aussi complète soit-elle. De ce fait, pour chaque MON étudiée et vis-à-vis de chaque métal trace, deux titrations logarithmiques doivent être réalisées, à pH naturel (i.e. entre 7.5 et 8.5) et à pH tamponné acétique (i.e. pH 4.6).

Ces expériences, de conception nouvelle, ont donc nécessité des modifications portant sur l'appareillage utilisé et le développement de procédures analytiques spécifiques, principalement pour permettre de balayer la plus large fenêtre analytique possible, ainsi que l'utilisation de techniques de traitement des voltamogrammes appropriées.

III.C.1/ Mise au point de l'appareillage pour les titrations en mode logarithmique:

Initialement, les premières expériences de titrations logarithmiques ont été réalisées à partir du stand utilisé pour la détermination des concentrations totales en métaux traces (III.B.3.b.1/). Ce stand ne disposant que d'une seule burette automatique, les ajouts de solutions standard ont été fait manuellement. Chaque expérience a une durée moyenne de 48 heures. Ces expériences ont tout de même permis de caractériser les propriétés de complexation d'une MON standard: l'Acide Fulvique Suwannee River (IV.A/).

Il est rapidement apparu souhaitable de développer un nouveau stand, spécifique aux titrations en mode logarithmique, permettant de réaliser ces dernières automatiquement et donc d'augmenter le nombre d'expériences, sans la présence permanente d'un expérimentateur.

La réalisation de ce type d'expériences suppose qu'un certain nombre de contraintes soient respectées. La température doit être maintenue constante durant toute l'expérience, le pH doit être mesuré en continu, puisqu'il a une influence sur la spéciation des métaux, la solution ne doit pas subir d'évaporation, les solutions d'ajouts ne doivent pas contaminer l'échantillon par diffusion, ... Comme toute adaptation d'un système existant, des problèmes ont été rencontrés, puis résolus plus ou moins rapidement.

Le stand de mesure qui a été développé, en collaboration avec Metrohm et EcoChemie, est constitué (figure III.7):

- d'un système Metrohm VA663 + IME663, constitué d'une électrode de référence (Ag/AgCl/KCl 3M), d'une électrode auxiliaire (graphite), et d'une électrode à goutte de mercure pendante (SMDE) (Figure III.3). L'agitation de la solution est assurée par une tige tournante en PTFE, la purge par de l'azote ultra-pur.
- de cellules voltamétriques thermostatées à $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en verre
- l'ensemble étant installé sous une hotte à flux laminaire de classe 100
- d'un voltamètre EcoChemie PGSTAT12, nettement plus sensible que le μ Autolab (détection limite : 30 fA)
- d'un pH-mètre Metrohm 713 équipé d'une micro-électrode de pH combinée Mettler Inlab 422 (calibration à chaque expérience par des tampons HANNA 4.01, 7.01, 10.01)
- de 4 burettes automatiques d'ajouts Metrohm 765, chacune équipée de deux unités interchangeables de 5mL (une pour Cd et une pour Pb)
- le contrôle de ces appareils se fait par le logiciel GPES 4.9 (EcoChemie)

Afin de réaliser des titrations en mode logarithmique sur la plus grande fenêtre analytique possible, et avec une définition suffisante (i.e. un nombre d'ajouts important), 4 solutions standard sont utilisées pour chaque métal, à 1, 10, 100 et 1000 μM . La gamme de concentration en métal ajouté à l'échantillon s'étend de 5×10^{-10} M à 5×10^{-6} M, en 30 ajouts.

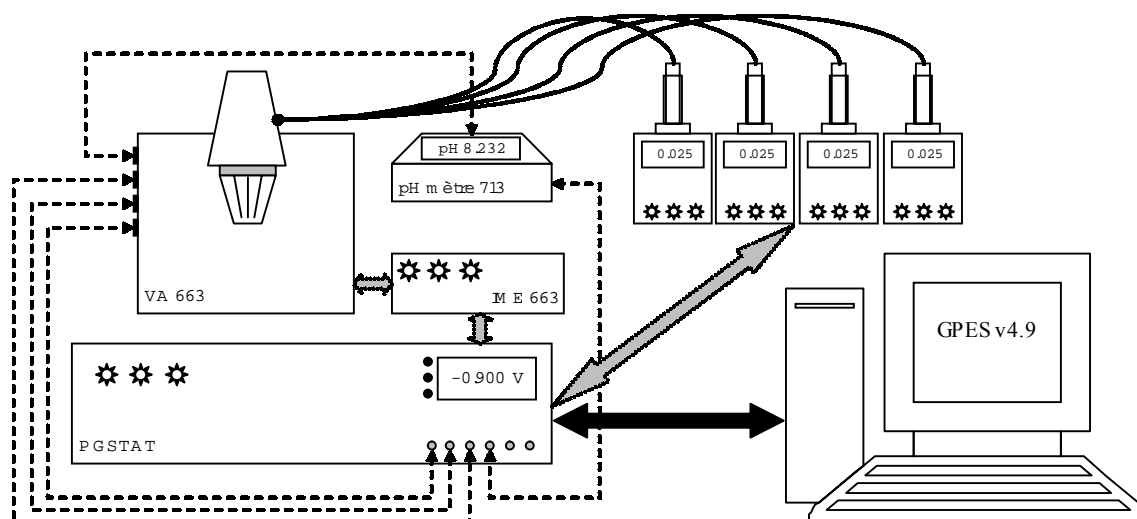


Figure III.7: Schéma du stand d'ajouts logarithmiques – mesure par DPASV

Contrairement aux mesures de concentrations totales en métaux, réalisées sur 20 mL, les titrations logarithmiques sont conduites sur 40 mL d'échantillon. L'augmentation du volume initial d'échantillon a deux avantages: la quantité de sites complexants analysables sur les MON étudiées est doublée (en terme de nombre de moles) ; les volumes d'ajouts de solutions standard peuvent être augmentés.

En effet, comme cela a été montré précédemment, le système d'ajout a dû être modifié pour éviter principalement les contaminations par diffusion des solutions standard (III.B.3.b.1/). Le risque de contamination est ici nettement plus important du fait qu'il y a un écart en concentration de 3 ordres de grandeur entre les différentes solutions utilisées. Le système ainsi mis au point a permis d'éliminer ces diffusions, inévitables avec des pointes anti-diffusions placées dans la cellule, mais a pour conséquence que le volume minimum ajouté doit être d'au moins 20 μL . De ce fait, les volumes de solutions standard ajoutés ont été calculés, pour balayer la gamme de concentration sélectionnée: 5×10^{-10} M à 5×10^{-6} M, en diluant le moins possible l'échantillon. Les volumes ainsi définis sont présentés dans le tableau III.2.

1	x x x x x x x x x x x											x x x x x x x						x x x x x x x												
10																														
100																														
1000																								x x x x x						
n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
V _{aj} μL	20	20	20	20	24	34	48	66	92	126	174	24	34	46	64	88	120	166	20	32	44	60	84	116	160	20	30	42	60	80

Tableau III.2: volumes de solutions standard à 1, 10, 100 et 1000 μM ajoutés pour réaliser les titrations en mode logarithmique sur 40mL d'échantillon

Des problèmes d'évaporation de l'échantillon ont également été observés lors des premières expériences. Le volume total de la solution passait de 40 à moins de 30 mL au cours des 48h d'analyse. Différentes solutions ont été imaginées. Le principal problème vient du fait que la cellule voltamétrique est en permanence balayée par un flux d'azote, en plus des étapes de purge précédent toute mesure de DPASV. La pression d'azote ainsi générée est indispensable à la génération et à la stabilité des gouttes de mercure. Or l'azote utilisé est sec, il entraîne donc une évaporation inévitable de l'échantillon compte tenu de la durée importante des expériences (au moins 48 h). L'utilisation d'un système de barbotage de l'azote en amont du stand de mesure, dispositif utilisé pour les appareils PAR-EGG (Omanović *et al.*, 1996), a entraîné une corrosion très rapide des électrovannes empêchant toute mesure. En effet, le même circuit d'azote est utilisé pour générer les gouttes (via une aiguille montée sur une membrane à l'intérieure de l'électrode de mercure), pour faire tomber les gouttes (en frappant le capillaire à l'aide de deux aimants par une augmentation brutale de la pression d'azote) et pour appliquer une pression constante au sein de la cellule. Ce même dispositif de barbotage a ensuite été adapté entre le bloc d'électrovannes et la cellule. Cependant, ce système, trop "élastique", gênait la percussion des aimants contre la paroi du capillaire, donc les gouttes de mercure n'étaient pas normalement renouvelées.

Finally, le thermostatage de la solution à $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$, la climatisation de la salle, et la diminution du débit d'azote ont permis de minimiser cette évaporation.

III.C.2/ Développement d'une procédure adéquate:

a/ Mesure par DPASV des concentrations en métaux labiles:

Au contraire de la procédure précédemment développée, visant à atteindre la concentration total en métal (III.B.3.b.2/), dans cette partie c'est la fraction de métal sous la forme de complexes organiques qui est intéressante. En effet, ces complexes sont théoriquement inertes électrochimiquement, donc masqués à l'analyse. Cependant, ceci dépend des conditions analytiques adoptées pour les mesures de DPASV, notamment de la valeur du potentiel de dépôt. En effet, si ce dernier est trop négatif, une partie des complexes "inertes" sont dissociés et donc s'intègrent à la fraction de métal labile.

Compte tenu de la gamme de concentrations balayée, et notamment des concentrations initiales en métaux assez faibles, un temps de dépôt de 600 s est utilisé. Il permet d'accroître nettement la quantité minimale de métal détectable mais il limite un peu la concentration maximale analysable, par un effet de saturation du mercure en métal, pour les concentrations supérieures à 5×10^{-6} M. Les paramètres utilisés pour la *procédure* de mesures par DPASV, spécifiques à l'étude des interactions de MON avec les métaux traces, sont regroupés dans le tableau III.3.

Afin d'automatiser ces expériences de titration en mode logarithmique, un *projet* a été programmé sous GPES. Les mesures de DPASV sont toujours réalisées en triplicata pour chaque ajout, afin d'estimer l'écartype sur la concentration en métal labile (II.E.4.b.6/). Ceci a pour effet d'allonger la durée des expériences mais est tout à fait indispensable pour évaluer l'intervalle de confiance des concentrations mesurées en fonction du métal ajouté et donc estimer ultérieurement la précision du fitting de ces données par *PROSECE*.

<i>purge</i>	durée	60 s
	agitation	2000 rpm
Etape de préconcentration		
<i>gouttes de mercure</i>	taille	0.52 mm ²
	dépôt sur la 5 ^{ème}	
<i>dépôt</i>	durée (t _d)	600 s
	potentiel (E _d)	-0.9 V
	agitation	2000 rpm
<i>équilibre</i>	durée	10 s
	potentiel	-0.9 V
	agitation	//
Etape de redissolution - mesure		
<i>fenêtre balayée</i>	potentiel initial	-0.9 V
	potentiel final	0.1 V
	agitation	//
<i>scan</i>	vitesse de scan	20 mV/s
	intervalle de temps	0.10 s
	intervalle de potentiel	2 mV
<i>impulsions</i>	durée	0.04 s
	amplitude	25 mV

Tableau III.3: paramètres optimisés de la *procédure* de DPASV pour la détermination des concentration en métaux traces labiles durant les titrations logarithmiques

Il est généralement admis que la cinétique de complexation des métaux traces avec la matière organique dans les eaux de mer est lente, notamment lors d'études portant sur des compétitions de ligands. Par exemple, pour l'EDTA ajouté à des eaux de mer, le temps d'équilibre a été estimé à 24 h. Une majorité d'études utilisent donc des temps d'équilibre de l'ordre de 24 h (Byrne, 1996). Cependant quelques travaux ont montré des processus de complexation plus rapides. Des cinétiques de complexation du cadmium de l'ordre de 10 min sur des eaux naturelles ont ainsi été mises en évidence (Bruland, 1992).

Au vu de ces résultats, et sachant que la variation de la concentration en métal entre deux ajouts au cours d'une titration en mode logarithmique est relativement faible (donc la modification des équilibres chimiques également), le temps d'équilibre utilisé pour ces expériences a été de une voir deux heures, entre l'ajout et les mesures par DPASV. En effet, un temps d'équilibre de 24 heures ou plus nécessite forcément de faire autant de solutions que d'ajouts, i.e. une trentaine. Puis, d'analyser par DPASV chaque solution, après un ou deux jours. Comme cela a été montré, les expériences de DPASV ont la particularité d'être extrêmement sensibles aux conditions physico-chimiques. Ainsi, Scarano *et al.* (1992) ont montré que le coefficient (noté S_{app} : sensibilité de la mesure) reliant l'intensité (hauteur ou aire du pic) de réoxydation mesurée à la concentration du métal dans l'échantillon ($I = S_{app} \cdot [M_{labile}]$) pouvait varier de plus de 25% entre deux expériences (i.e. des mesures de DPASV réalisées sur des échantillons différents donc nécessitant un changement de la cellule voltamétrique). Au contraire, durant une même expérience on observe des variations beaucoup plus faibles sur les mesures (II.E.4.b.6/), dépendant principalement de la zone de concentration analysée.

b/ Modification de l'appareillage de mesure:

Pour que la solution soit homogène au cours de l'étape d'équilibre, il convenait d'agiter la cellule. Or, le logiciel GPES ne permet pas de définir une telle étape d'agitation, sans avoir recours à une mesure électrochimique. Après discussions avec les informaticiens d'EcoChimie (notamment Anna Farrenkopf), la version de GPES utilisée a été modifiée pour être adaptée à nos besoins. Ainsi, une nouvelle fonction utilisable dans les *projets* de GPES, a été développée (nommée "AutomaticElectrode" avec pour arguments "ON" et "OFF"). Elle permet de contrôler le stand VA663, et plus particulièrement les commandes ON/OFF de la purge, de

l'agitation et de la formation de gouttes. L'agitation de la solution pendant une durée donnée a donc été possible.

Compte tenu des capacités du voltamètre utilisé pour ces expériences, durant les temps d'équilibre, une *procédure* de ChronoPotentiométrie a été mise au point. Elle permet de mesurer le potentiel libre à la goutte de mercure, et également la mesure du pH, échantillonnée toutes les 10 s, à partir d'une micro-électrode de pH combinée (Mettler Inlab 422) connectée au pH-mètre Metrohm 713. La mesure du pH, avant une mesure des concentrations en métaux labiles par DPASV, est indispensable pour pouvoir correctement calculer la spéciation des espèces à partir de l'interprétation des voltamogrammes obtenus. De plus, les variations de pH éventuellement observées au cours du temps d'équilibre, pourraient être reliées à des phénomènes de compétition entre le proton et les métaux traces vis-à-vis des groupements complexants des MON étudiées. Par contre, la signification de l'évolution du potentiel libre risque d'être plus délicate.

Des problèmes d'interférences ont également été rencontrés lors des mesures de DPASV. Un signal sinusoïdal de basse fréquence se superposait aux voltamogrammes empêchant toute analyse rigoureuse (figure III.8A). L'apparition de ce signal était tout à fait aléatoire, rendant difficile la détermination de son origine. En outre, le bruit sur l'intensité de réoxydation mesurée était assez important, en particulier pour les très faibles concentrations. Différents phénomènes ont été suspectés. Après vérification qu'il n'y avait pas de dysfonctionnement au niveau du voltamètre et des électrodes, une interférence électrique a été incriminée. Pour autant, l'utilisation d'un onduleur régulateur en amont du stand de mesure n'a pas permis d'éliminer ce signal. Après en avoir parlé aux constructeurs, l'origine du problème a été décelée dans la gamme de mesure d'intensité utilisée. En effet, le voltamètre PGSTAT12 permet de détecter des intensités nettement plus faibles que le μ Autolab, de l'ordre de quelques fA. Pour ce faire, une gamme de mesure de 10 nA doit être utilisée. Cette dernière avait été sélectionnée pour les mesures de DPASV car, compte tenu des très faibles concentrations en métaux détectées en début de titration, les intensités de réoxydation résultantes sont également très faibles, de l'ordre de quelques nA. Les intensités mesurées en fin de titrations sont quand à elles supérieures au μ A. Donc par défaut, pour n'utiliser qu'une seule *procédure* analytique de DPASV, les gammes de 10 nA, 100 nA, 1 μ A et 10 μ A avaient été choisies. Or, il s'est avéré que lorsque l'appareil utilise une gamme de 10 nA, il est excessivement sensible aux interférences générées notamment par les appareils électriques branchés dans la même pièce, voire même aux modulations du courant d'alimentation. Cette gamme d'intensité a donc été désélectionnée ce qui a permis de retrouver des signaux interprétables (figure III.8B), sans pour autant avoir une mauvaise définition des pics de faibles intensités.

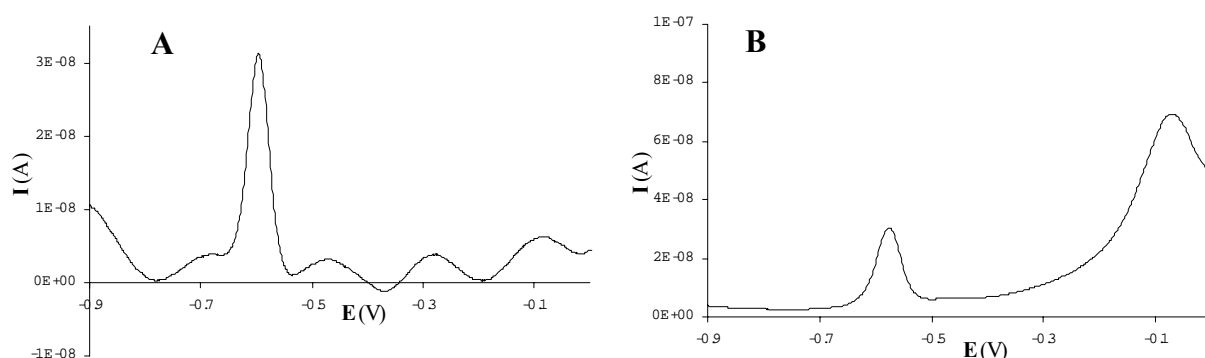


Figure III.8: voltamogrammes obtenus avant (A) et après (B) élimination des interférences électriques (40 mL, pH 7.8, I 0.1, $[Cd_{ii}] 5 \times 10^{-10} \text{ mol.l}^{-1}$)

La structure du *projet* développé pour réaliser les titrations logarithmiques est la suivante, réalisée 31 fois (mesure sur l'échantillon "brut" et les 30 ajouts):

- ajout d'un volume V_i de la solution standard C_i à partir de la burette B_i

- purge et agitation pendant 120 s (pour correctement vider le tube d'ajout/purge)
- formation de 5 gouttes
- *procédure* de ChronoPotentiométrie: mesures du potentiel libre et du pH, sous agitation (2000 rpm), pendant 3600 à 7200 s
- trois mesures successives de DPASV (tableau **III.3**)

Le code utilisé pour réaliser automatiquement ces commandes est en Annexe **III.1**.

La titration en mode logarithmique d'un échantillon a une durée moyenne de 48 heures.

III.C.3/ Traitement mathématique des voltammogrammes:

Chaque expérience de titration en mode logarithmique génère 93 voltammogrammes. Contrairement aux mesures des concentrations totales en métaux réalisées à pH acide (**III.B.3.b.3/**), pour lesquelles la ligne de base était stable et les pics correctement séparés les uns des autres, à pH naturel ou tamponné acétique (pH 4.6) et en présence de MON complexante, l'allure des pics de réoxydation des métaux et leur position ainsi que la ligne de base sont nettement plus variables. Ainsi, l'analyse des voltammogrammes obtenus ne peut être menée suivant la même procédure (**III.B.3.b.4/**), une intégration plus précise est obligatoire pour pouvoir correctement déterminer les concentrations en métaux labiles, et donc par différence les fractions en métaux complexés par des ligands organiques (Pižeta *et al.*, 1999).

Seuls les pics de Cd et Pb ont été pris en compte dans cette étude, puisque le but était d'étudier les propriétés de complexation de ces deux métaux vis-à-vis de diverses MON, à au moins deux pH différents (naturel et tamponné acétique), et les phénomènes de compétitions métal/métal. Or, dans la majorité des voltammogrammes obtenus, les pics de ces deux métaux sont superposés, leur déconvolution est donc indispensable.

L'outil d'intégration utilisé par GPES est trop limité pour atteindre ce but. En effet, la définition de la ligne de base par un polynôme est trop souvent aléatoire ce qui nuit à l'intégration correcte des pics. De plus, il n'y a aucun outil de déconvolution. Il a donc semblé souhaitable de développer un outil propre à la caractérisation des pics de DPASV. Les données des voltammogrammes étant sous la forme de tableaux et nécessitant la construction de graphique pour choisir les bornes de la ligne de base et pour vérifier l'adéquation de la technique de fitting des pics de DPASV, cet outil a été développé sous une feuille de calcul *Excel* (Annexe **III.2**), en utilisant notamment l'outil *solveur* pour optimiser les paramètres des fonctions de déconvolution utilisées.

a/ Simulation de la ligne de base des voltammogrammes:

La première étape de cette simulation des pics de DPASV a consisté à correctement définir la ligne de base, à partir de N (environ 50) points expérimentaux (E, I) situés avant et après le massif de pics de Cd et Pb. Plusieurs fonctions mathématiques $I = f(E)$ ont été testées pour représenter la ligne de base. Celle qui a donné les meilleurs résultats est un polynôme du 3^{ème} degré, ce qui corrobore les résultats de Pižeta *et al.* (1999). L'expression de cette fonction est de la forme:

$$I = A \times E^3 + B \times E^2 + C \times E + D \quad (\text{eq. III.1})$$

Le processus de fitting de la ligne de base consiste à déterminer les paramètres A, B, C, D du polynôme passant par ces N points expérimentaux. En posant:

- I le vecteur colonne contenant les valeurs de I pour ces points,
- E la matrice de dimension $N \times 4$ où la 1^{ère} colonne correspond aux valeurs de E^3 , la seconde à E^2 , la 3^{ème} à E^1 et la 4^{ème} à E^0 ,
- X le vecteur colonne des valeurs de A, B, C, D ,

la détermination des valeurs de ces paramètres consiste simplement à résoudre l'équation matricielle: $I = X \times E$. Cette résolution a été faite à l'aide d'une fonction de calcul matricielle d'*Excel*.

b/ Déconvolution des pics de DPASV:

b.1/ Fonction gaussienne:

La première approche retenue a consisté à fitter les pics à partir de fonction gaussienne. En effet, en première approximation, leur allure est assez proche d'une fonction gaussienne. Ces dernière ont de plus l'avantage de n'être définie que par trois paramètres: position (E_i), hauteur (I_i^{max}) et largeur à mi-hauteur (σ_i). L'optimisation des paramètres de telles fonctions, en vue du fitting de pics réels, est donc assez simple.

La courbe $I = f(E)$ utilisée, intégrant l'équation de la ligne de base, est donc de la forme:

$$I = \sum_{i=1}^n I_i^{max} \times \exp\left(-\frac{(E-E_i)^2}{\sigma_i}\right) + (A \times E^3 + B \times E^2 + C \times E + D) \quad (\text{eq. III.2})$$

où : n est le nombre de pics simulés par une fonction gaussienne

Après définition de la ligne de base pour le voltamogramme donné, les paramètres I_i^{max} , E_i et σ_i sont optimisés afin de modéliser la courbe expérimentale $I = f(E)$. Toutefois, lors de la titration d'une MON par le Cd, le pic du Pb est modélisé par une gaussienne puis intégré (par la méthode des rectangles), l'aire du pic de Cd est ensuite calculée suivant l'équation:

$$A_{Cd} = A_T^{exp} - A_{Pb}^{simulé} \quad (\text{eq. III.3})$$

où:

A_{Cd} : aire calculée du pic de Cd,

$A_{Pb}^{simulé}$: aire du pic de Pb simulé par la fonction gaussienne correspondante,

A_T^{exp} : aire totale expérimentale du massif de pics (Cd, Pb) calculée par la méthode des rectangles

En effet, modéliser le pic de Cd par une gaussienne n'est possible que lorsque la concentration en cadmium labile est inférieure à environ 30nM. Pour des valeurs supérieures, la fonction gaussienne utilisée ne permet pas de correctement fitter le pic expérimental. Lors du dosage d'une MON par Pb, on applique le même protocole en permutant Cd et Pb dans les équations précédentes.

Cette technique a été utilisée pour fitter les voltamogrammes obtenus lors d'expériences de titrations logarithmiques réalisées manuellement (i.e. avant que le stand spécifique soit mis au point) sur l'Acide Fulvique Suwannee River, en vue de la caractérisation de ces propriétés de complexation (IV.A).

Cependant, l'utilisation d'une gaussienne ne repose sur aucune base théorique solide, et la définition de la limite de concentration au dessus de laquelle ce type de fonction ne peut plus être utilisée est difficile à estimer, ce qui rend problématique une systématisation du traitement des voltamogrammes obtenus. Le développement d'une fonction plus "réaliste" et donc plus rigoureuse est apparu nécessaire pour la suite de ce travail. De nombreux travaux ont été réalisés pour déterminer une fonction mathématique représentant les pics ou les vagues de réoxydation observés en DPASV, et plus généralement par les techniques électrochimiques. Ces travaux s'appuient généralement sur une mise en équation des intensités de préconcentration et de réoxydation. On peut citer ainsi les équations de Cottrell, de Levich (électrode tournante),

d'Ilkovic (polarographie sur goutte de mercure) ou de Koutecky (Bard et Faulkner, 1983). Les fonctions qui ont été testées émanent donc de ces équations théoriques.

b.2/ Fonction de Kambara:

Les travaux menés par Kambara (1954) ont permis de simuler les vagues polarographiques en redissolution anodique, en mode "differential pulse", par une fonction d'expression:

$$I = \left(\frac{a_1}{1 + \exp\left(\frac{E - E^\circ}{RT/nF}\right)} \right) + \left(\frac{a_2}{1 + \exp\left(\frac{E + E_h - E^\circ}{RT/nF}\right)} - \frac{a_2}{1 + \exp\left(\frac{E - E^\circ}{RT/nF}\right)} \right) \quad (\text{eq. III.4})$$

où: $a_1 = \left(\frac{1}{\sqrt{t}} - \frac{1}{\sqrt{T}} \right)$

$$a_2 = \frac{1}{\sqrt{t-T}}$$

avec: t l'intervalle de temps entre deux impulsions (figure III.9)

$(t-T)$ la durée de l'impulsion (figure III.9)

E_h l'amplitude de l'impulsion (figure III.9)

E° le potentiel standard du couple M_o / M^{n+} étudié

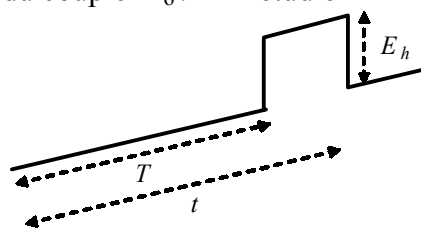


Figure III.9: rampe de potentiel utilisée en mode "Differential Pulse"

L'allure de la courbe obtenue $I = f(E)$ et sa dérivée, pour les valeurs de t, T, E_h définies dans le tableau III.3 et pour le potentiel standard E° du couple Cd_o / Cd^{2+} (figure III.4A), sont représentées par la figure III.10.

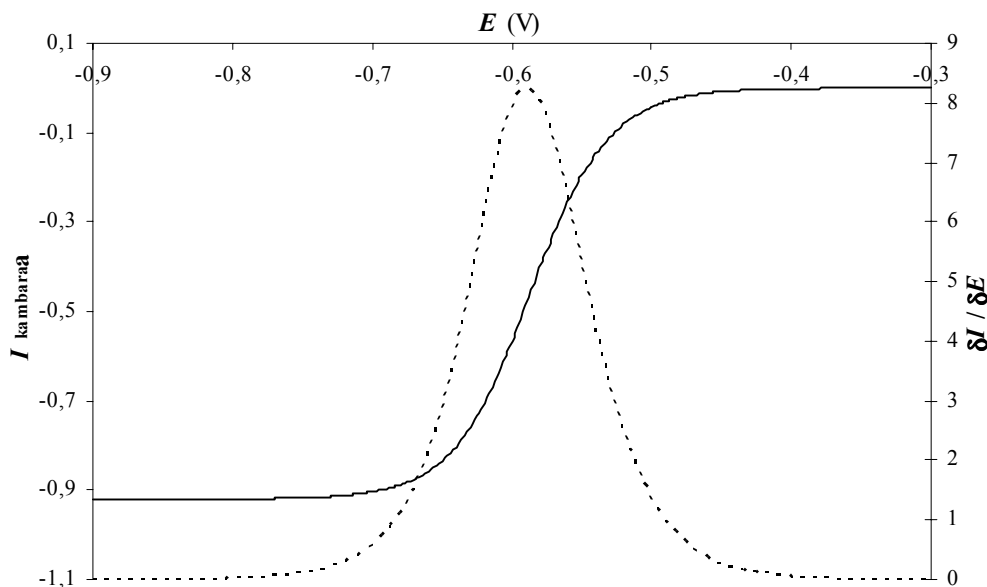


Figure III.10: fonction de Kambara et fonction dérivée

La modélisation d'un pic de DPASV, à partir de cette formulation théorique, consiste à fitter la courbe (E,I) expérimentale par la dérivée de la fonction de *Kambara* (figure III.10), en optimisant les paramètres I_{max}^i , P_i , $a_{1,i}$, $a_{2,i}$, E_i° et $E_{h,i}$. L'expression générale de cette dérivée, pour n métaux analysés, est de la forme:

$$I = \sum_{i=1}^n I_{max}^i \times \frac{\delta}{\delta E} \left[\left(\frac{a_{1,i}}{1 + \exp\left(\frac{E - E_i^\circ}{P_i}\right)} \right) + \left(\frac{a_{2,i}}{1 + \exp\left(\frac{E + E_{h,i} - E_i^\circ}{P_i}\right)} \frac{a_{2,i}}{1 + \exp\left(\frac{E - E_i^\circ}{P_i}\right)} \right) \right] + (A \times E^3 + B \times E^2 + C \times E + D) \quad (\text{eq. III.5})$$

Les résultats obtenus, en terme d'allure des pics de réoxydation des métaux analysés, sont nettement améliorés par rapport à ceux issus d'un fitting par des fonctions gaussiennes. Par contre, le nombre de paramètres à optimiser pour caractériser chaque pic est doublé. De plus, un problème persiste quant à la "valeur résiduelle" de la fonction dérivée. En effet, pour les zones de potentiels correspondant au début et à la fin des pics, la fonction de *Kambara* est bornée par des asymptotes de pente non nulles. Ceci a pour effet d'écarter le pic calculé de la ligne de base d'une valeur δI . Ce δI est d'autant plus élevé que le pic est grand. La déconvolution des deux pics de Cd et Pb, lors des titrations logarithmiques, devient alors impossible pour les fortes concentrations d'un des deux métaux traces, ce qui empêche une estimation correcte de la quantité de métal (ex. Cd) décomplexé par la MON lors de l'ajout de fortes concentrations de l'autre métal (ex. Pb).

Une étude détaillée des variations des fonctions dérivée et dérivée seconde de la fonction de *Kambara* n'a pas permis de mettre au point un protocole simple et systématique pour éliminer ce δI résiduel.

b.3/ Fonction en $1/\cosh^2$:

Afin d'améliorer le modèle de pic utilisé pour simuler les voltammogrammes, une fonction en $1/\cosh^2$ a été développée. En effet, il a été montré (Bard et Faulkner, 1983 ; Heyrovsky et Kuta, 1966) qu'une vague voltamétrique pouvait être représentée par l'expression suivante:

$$I = I_{max} \times \left(\frac{1}{1 + \exp(\varphi_i)} \right) \quad (\text{eq. III.6})$$

$$\text{dont la dérivée est: } I = I_{max} \times \left(\frac{\exp(\varphi_i)}{(1 + \exp(\varphi_i))^2} \right) = I_{max} \times \left(\frac{0.25}{\left(\cosh\left(\frac{\varphi_i}{2}\right) \right)^2} \right) \quad (\text{eq. III.7})$$

$$\text{avec: } \varphi_i = \left(\frac{E - E^\circ}{RT/nF} \right)$$

La dérivée de cette fonction peut être utilisée pour représenter les pics obtenus en DPASV. L'expression utilisée pour déconvoluer les pics de Cd et Pb obtenus lors des titrations logarithmiques a donc été définies comme:

$$I = \sum_{i=1}^n I_{\max}^i \times \left(\frac{1}{\left(\cosh\left(\frac{E - E_i^o}{P_i} \right) \right)^2} + (A \times E^3 + B \times E^2 + C \times E + D) \right) \quad (\text{eq. III.8})$$

où: I_{\max}^i, E_i^o, P_i sont les paramètres à optimiser pour chaque pic défini
 n est le nombre de pics analysés

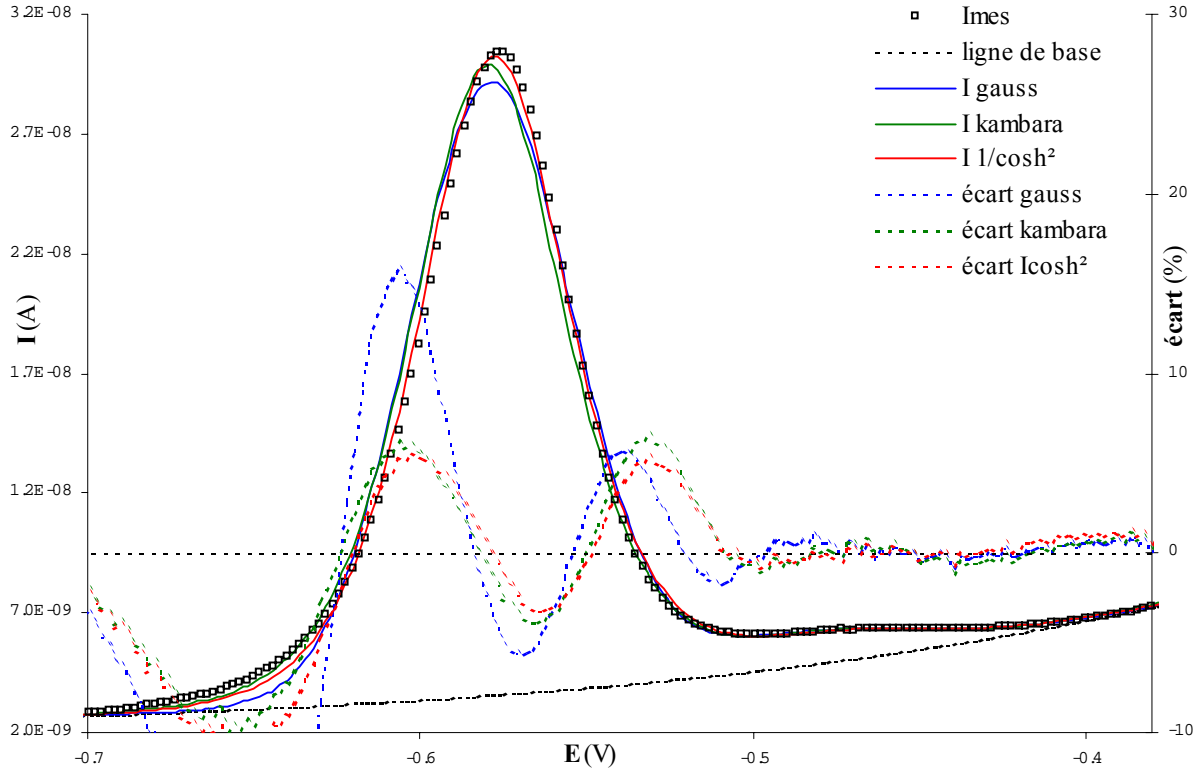


Figure III.11: fitting d'un voltamogramme expérimental, obtenu au cours d'une titration logarithmique d'un échantillon naturel par ajouts de Cd, par les différentes fonctions testées

Une comparaison du fitting d'un voltamogramme expérimental par des fonctions gaussiennes, des fonctions de *Kambara* et des fonctions en $1/\cosh^2$ est représentée par la figure III.11. Comme elle le montre, ce type de fonction permet de correctement fitter l'ensemble des voltamogrammes obtenus, pour toute la gamme de concentrations en métal ajouté (contrairement aux fonctions gaussiennes), tout en ne nécessitant pas un nombre important de paramètres à optimiser (3 par pic défini) (eq. III.2, III.5 et III.8). Elle a donc été choisie pour déconvoluer les pics de DPASV expérimentaux. Pour cela, à partir d'une feuille de calcul (Annexe III.2), après définition des paramètres de la fonction fittant la ligne de base (III.B.4.c.1/), les paramètres des fonctions en $1/\cosh^2$, définies pour chaque pic de DPASV, sont optimisés à l'aide du solveur d'Excel, jusqu'à atteindre un minimum pour le *bias* entre la courbe expérimentale (E, I_{mes}) et la courbe calculée (E, I_{calc}) défini par:

$$bias = \sum_{i=1}^n \frac{abs(I_{calc,i} - I_{mes,i})}{I_{mes,i}} \quad (\text{eq. III.9})$$

où: n est le nombre de points (E, I) pour lesquels $E \in [E_{min}, E_{max}]$

E_{min} et E_{max} sont les limites de potentiel inférieures et supérieures du massif de pics analysés sur le voltamogramme

L'intégration des pics ainsi simulés (par la méthode des rectangles) a permis de quantifier l'aire des pics de Cd et Pb pour chaque ajout d'une titration logarithmique. En DPASV, l'aire du pic de réoxydation d'un métal (A_M) étant proportionnelle à la concentration en métal labile (M). Cette relation est exprimée par l'équation:

$$A_M = S_{app} \times M \quad (\text{eq. III.10})$$

où S_{app} représente la sensibilité de l'appareil.

Comme l'ont montré Scarano *et al.* (1992), la déviation standard sur S_{app} peut atteindre 25%, du fait même des variations instrumentales. Il est donc indispensable de déterminer ce paramètre à chaque expérience, à partir des derniers points du dosage (i.e. $[M]_T > 1\mu\text{M}$). En effet, pour ces points on peut supposer que l'on a atteint ou dépassé la concentration totale en sites complexants mesurable de la MON, on a alors:

$$A_M = S_{app}' \times M_T \quad (\text{eq. III.11})$$

avec $S_{app}' \approx S_{app}$

Ce processus de titration en mode logarithmique suivi d'un traitement mathématique des voltamogrammes obtenus a été utilisé pour étudier les propriétés de complexation de différentes MON vis-à-vis du cadmium et du plomb, en vue de les caractériser par un *chimio-type* défini à l'aide de *PROSECE*. Les résultats obtenus sont présentés dans les chapitres **IV.A/** et **IV.E/**.

III.D/ Analyse des interactions MON-proton par potentiométrie:

Les propriétés acido-basiques d'une MON font partie des facteurs primordiaux influençant son pouvoir complexant vis-à-vis des métaux traces (Buffle, 1988 ; Christensen et Christensen, 2000 ; Perdue et Lytle, 1983 ; Ramos *et al.*, 2002 ; Robertson et Leckie, 1999 ; Smith et Kramer, 1999). Elles sont donc l'objet de nombreuses études. L'ensemble des modélisations appliquées à la MON, vise à définir la densité en sites de types carboxylique et phénolique (Christensen *et al.*, 1998 ; de Souza Sierra *et al.*, 2001 ; Lu et Allen, 2002 ; Masini *et al.*, 1998 ; Milne *et al.*, 2001 ; Ritchie et Perdue, 2003). En effet, le suivi des modifications du ratio carboxylique/phénolique peut ainsi permettre de suivre la variabilité des propriétés de la MON, ainsi que de déterminer son origine. Il a ainsi été montré que la MON d'origine anthropique ou terrigène (terrestre) avait un caractère phénolique plus marqué (Letizia et Gnudi, 1999). De même, les extractions et/ou séparations de MON en acides fulviques (AF) et humiques (AH) ont montré des différences récurrentes entre ces deux types de MO extraites, aussi bien en terme de densité de sites que de ratios carboxylique/phénolique (de Souza Sierra *et al.*, 2001 ; Milne *et al.*, 2001 ; Ritchie et Perdue, 2003).

La densité totale en sites acides d'une matière organique naturelle et la fraction en groupements de type carboxylique, i.e. possédant des propriétés d'acidités voisines de celles de sites carboxyliques, peuvent être déterminées à l'aide de techniques simples telles que les dosages par de l'hydroxyde de baryum (acidité totale) ou de l'acétate de calcium (sites carboxyliques) (Stevenson, 1982 ; Masini *et al.*, 1998). Cependant, ces mesures ne suffisent pas à caractériser les interactions entre la MON étudiée et le proton, de manière à obtenir des propriétés permettant de les modéliser.

La technique la plus courante pour analyser, puis caractériser, les sites acides d'une molécule organique, de structure simple ou complexe, consiste à suivre les variations de pH au cours d'une titration acido-basique. Un traitement mathématique (linéarisation de Gran, méthodes des dérivées première et seconde, fitting non-linéaire, ...) des points expérimentaux ainsi obtenus conduit ensuite à la définition de paramètres d'acidité pouvant être ensuite utilisés pour représenter le comportement de cette molécule vis-à-vis du proton.

Cette combinaison "technique d'analyse - traitement mathématique" a été initialement appliquée à la caractérisation de molécules organiques de structures simples (EDTA, acides phénolique, acétique, salicylique, ...), présentant des fonctions d'acidité distinctes, visibles par des inflexions marquées de la courbe de titration. La détermination de ces propriétés d'acidité est alors assez simple, pouvant même être réalisée par des appareillages totalement automatisés. Ce mode de caractérisation est encore couramment appliqué, par exemple pour préciser les propriétés d'acidité de composés à vocation médicale.

Au contraire, l'hétérogénéité des groupements fonctionnels de la MON, rendant imperceptible leur détection (absence d'inflexions dans la courbe de titration), implique l'élaboration d'outils analytiques et de techniques de titrations spécifiques.

III.D.1/ Appareillage utilisé – procédure analytique:

Le stand de titration utilisé pour réaliser ces dosages acido-basiques est constitué des éléments suivants (Figure III.12):

- deux Titrino 719 et un Titrino 716 (Metrohm) associant chacun un potentiomètre (une entrée électrode de référence, deux indicatrices) à une burette automatique d'ajout (5 μ L à 5mL)
- un système d'agitation (Metrohm 728)
- des cellules thermostatée à $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en verre (volume d'échantillon: 20 à 200mL)
- micro-électrodes de pH Mettler Inlab 422 et RHOSS
- contrôle de ces appareils par le logiciel Tinet 2.4 (Metrohm)

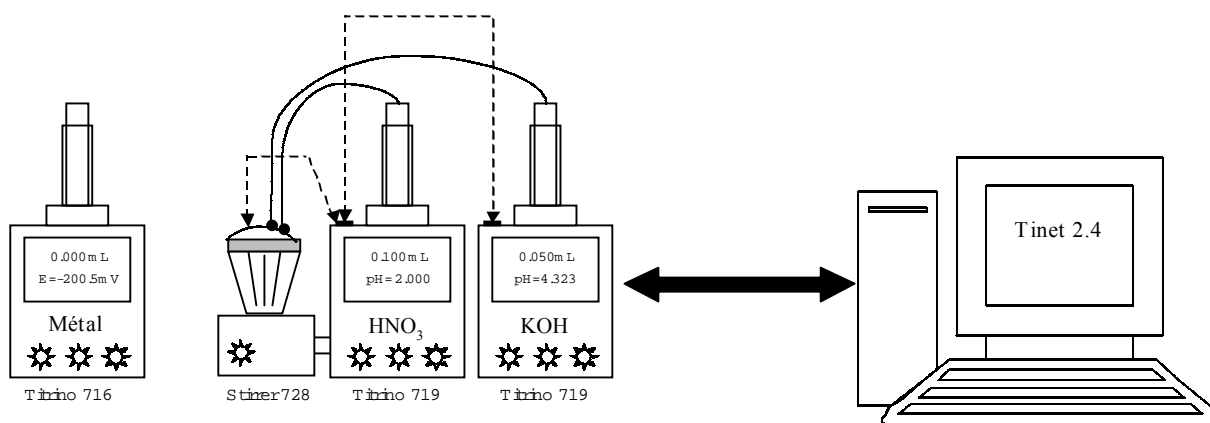


Figure III.12: Schéma du stand de titrations acido-basiques

Les deux Titrino 719 suffisent aux titrations acido-basiques, le Titrino 716 ayant été rajouté pour pouvoir mesurer la concentration en métal libre (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , ...) via des électrodes sélectives. L'électrode de pH utilisée est calibrée régulièrement par des solutions tampon HANNA 4.01, 7.01 et 10.01. Lorsque des variations importantes de ses paramètres de calibration sont observées, l'électrode est remplacée.

Les titrations acido-basiques ont été réalisées à l'aide de solutions standard, libres en CO_2 , de KOH (0.1 M, à partir de KOH 0.5033M Sigma-Aldrich) et HNO_3 (0.2 M ou 0.4 M, à partir de HNO_3 69% J.T. Baker). Le titre exacte de la solution de KOH a été déterminé par dosage de

solution d'hydrogénophthalate de potassium (mono-acide de masse moléculaire suffisamment élevée pour pouvoir mesurer avec précision la quantité ajoutée avant le dosage), sous bullage d'azote, en triplicata. Chaque courbe (pH, V_{KOHaj}) obtenue a ensuite été analysée par le logiciel Tinet afin de déterminer le point d'équivalence (méthode de la dérivée). Une fois la concentration de la solution standard de KOH déterminée, elle a été dosée par la solution standard de HNO_3 , sous bullage d'azote, également en triplicata. La détermination des points d'équivalence des courbes (pH, $V_{\text{HNO}_3\text{aj}}$) a ensuite permis d'évaluer le titre la solution standard de HNO_3 . Ces dosages ont été effectués par ajouts successifs de micro-volumes des solutions de KOH (HNO_3) jusqu'à atteindre la valeur consigne de pH = 11 (pH = 3).

Pendant du logiciel GPES 4.9 utilisé pour les titrations logarithmiques (III.B/), le logiciel Tinet 2.4 permet de programmer aisément des procédures de mesures de pH, d'ISE, de dosage avec consigne, d'ajout, ... Il utilise pour ce faire des "blocs" de commandes. Des *méthodes* ont donc été créées pour pouvoir réaliser les titrations acido-basiques nécessaires à l'analyse des propriétés d'acidités de MON.

Après plusieurs essais, les modes de titrations automatiques prédéfinis sous Tinet, visant à réaliser un dosage jusqu'à une valeur consigne de pH par ajouts variables de base ou d'acide (volume calculé en fonction de la variation du pH), ne se sont pas montrés suffisamment précis pour pouvoir être appliqués à des échantillons naturels. Les *méthodes* programmées ont donc consisté à segmenter la courbe de titration en différentes zones de pH ([pH naturel \Rightarrow 2], [2 \Rightarrow 2.5], [2.5 \Rightarrow 3.5], [3.5 \Rightarrow 10.5] et [10.5 \Rightarrow 12]). Sur chacune de ces zones, le volume d'ajout de solution standard a été ajusté afin d'avoir une précision suffisante sur la courbe de titration, tout en limitant la durée totale de la titration. Cette dernière peut tout de même dépasser 12 heures pour des échantillons présentant des densités élevées en sites acides.

Condition indispensable à une analyse ultérieure correcte, les carbonates initialement présents dans l'échantillon doivent être éliminés. Pour ce faire, les *méthodes* développées sont toujours constituées d'une étape de dosage par ajouts de la solution standard d'acide nitrique jusqu'à un pH de 2. La solution est ensuite maintenue à ce pH pendant 10 à 20 minutes (suivant le volume d'échantillon), sous flux d'azote, afin de la décarbonater. Ensuite, par des incréments variables de la solution standard de KOH (5 μL à 100 μL), le pH est porté à 11.5 avec les conditions limites suivantes: 0.5 $\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$ ou 30 s à 120 s (suivant la zone de pH).

Ainsi, une courbe de titration (de pH 2 à 12) est constituée de 100 à 300 points (pH, V_{KOH} ajouté). D'une manière générale, seuls les points expérimentaux dont le pH est compris entre 2.5 et 11.5 sont utilisés, ceci afin de minimiser les éventuelles erreurs causées par la non-linéarité de l'électrode de pH pour les valeurs extrêmes.

III.D.2/ Traitement des données expérimentales:

Contrairement à l'analyse des voltamogrammes obtenus par DPASV qui conduit indirectement à la détermination des métaux traces labiles, la mesure du pH, donc de la concentration en proton libre, est directe lors des titrations acido-basiques. Pour autant, les courbes expérimentales (V_{KOH} , pH) doivent subir quelques transformations avant d'être traitées par *PROSECE* en vue de la détermination d'un set de paramètres d'acidité (concentrations, constantes) simulant les interactions analysées.

En effet, alors que la mesure des concentrations totales en métaux au cours des titrations logarithmiques est relativement aisée (sommation des concentrations totales initialement présentes dans l'échantillon et des concentrations ajoutées lors de l'expérience), l'estimation, voire même la définition, de la concentration totale en proton (H_T) est plus complexe. Si l'on se réfère aux *tableaux d'équilibres*, et donc aux réactions faisant intervenir le proton, la concentration totale en proton peut être formulée suivant l'expression générale:

$$H_T = H^+ - OH^- + \sum_i j \times (H_j A_i) - \sum_i k \times (M_i(OH)_k) \quad (\text{eq. III.12})$$

où: H_T, H^+ sont les concentrations totale et libre en proton
 $H_j A_i$ représente la concentration libre d'un acide (ex. H_2EDTA^{2-})
 $M_i(OH)_k$ représente la concentration libre d'un hydroxyde (ex. $Cd(OH)^+$)

Aucune technique analytique ne permet d'accéder directement à H_T . De plus, cette dernière est dépendante de la spéciation des éléments chimiques, notamment des espèces protonables et des cations formant des hydroxydes (en première approximation on peut ne tenir compte que des cations majeurs, les métaux étant nettement moins concentrés dans un échantillon naturel). La détermination de la valeur exacte de H_T pour chaque point expérimental (V_{KOH} , pH) d'une titration acido-basique, nécessite donc l'utilisation d'un programme de spéciation et une parfaite connaissance du système chimique. Or, autant les concentrations en cations majeurs peuvent être estimées, conduisant alors aux concentrations en hydroxydes ; autant les concentrations libres en acides présents dans la solution sont inconnues, l'objectif de ces expériences étant précisément de les quantifier.

Par contre, on montre facilement que en tout point d'une titration, la concentration en H_T peut être reliée à sa valeur initiale suivant l'équation:

$$H_T^i = \frac{(H_T^o \cdot V_T^o + n_{HNO_3}^{aj} - n_{KOH}^{aj})}{V_T^i} \quad (\text{eq. III.13})$$

où: H_T^o, H_T^i sont les concentrations totales initiale et au point i en proton
 V_T^o, V_T^i sont les volumes totaux initial et au point i
 $n_{HNO_3}^{aj}$ et n_{KOH}^{aj} sont les nombres de mole de solutions standard ajoutés

Le problème se résume donc à l'estimation de la concentration totale initiale en proton H_T^o . Dans ce travail, la méthode retenue pour atteindre cette objectif consiste à estimer la densité totale en sites acides analysés au cours de la titration. Pour ce faire, la courbe expérimentale obtenue (V_{KOH} , pH) est comparée à la courbe théorique de la titration du même volume d'eau ultra-pure.

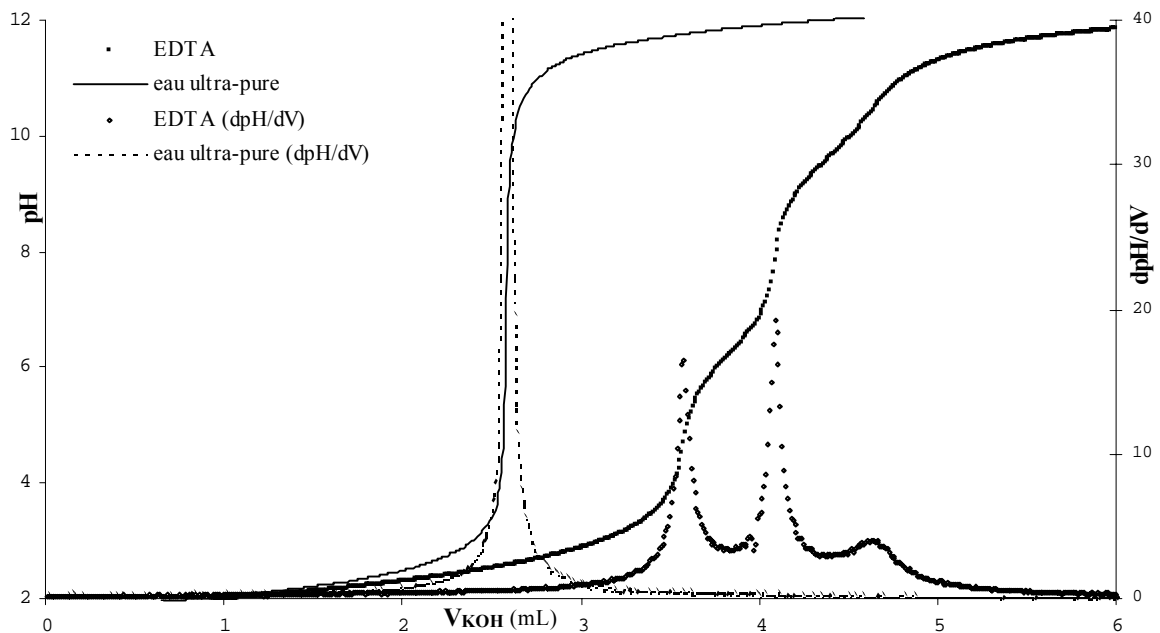


Figure III.13: Courbes expérimentales (V_{KOH} , pH) et dérivées (V_{KOH} , dpH/dV) obtenues pour les titrations acido-basiques d'EDTA et d'eau ultra-pure

La figure **III.13** représente les courbes expérimentales obtenues lors des titrations acido-basiques de 20 mL d'une solution d'EDTA à 5 mM et de 20 mL d'eau ultra-pure (milliQ), par une solution standard de KOH 0.2 M, dans les mêmes conditions de force ionique ($I \sim 0.1$). Les dérivées de ces courbes sont également tracées afin de préciser la position des sauts de pH. L'allure de la courbe de titration de l'eau milliQ montre que la procédure de décarbonatation est suffisamment efficace, puisque aucune inflexion n'est observable. Pour l'EDTA, trois points d'équivalence sont observables. Cette molécule possédant quatre sites acides, la première acidité ne semble pas détectable sur la courbe de titration.

Le traitement de ces courbes de titration consiste à calculer pour chaque valeur de pH expérimentale, la différence entre la quantité de base ajoutée à l'échantillon et celle ajoutée à l'eau ultra-pure. Cette différence est notée ΔnOH^- , exprimée en mmol d' OH^- , et représente la quantité de OH^- nécessaire pour doser les sites acides de l'échantillon analysé. Une extrapolation (linéarisation) est nécessaire puisque à chaque couple (pH, nOH^-) de la courbe de titration de l'échantillon ne correspond pas obligatoirement une valeur de nOH^- pour l'eau ultra-pure, et réciproquement. Une fois ce calcul réalisé, la courbe ΔnOH^- en fonction du pH peut être tracée. La courbe ($pH, \Delta nOH^-$) obtenue pour le cas explicité dans la figure **III.13**, ainsi que les courbes dérivée et dérivée seconde, sont représentées sur la figure **III.14**.

L'analyse des courbes obtenues conduit à différents résultats. La différence entre les valeurs de ΔnOH^- obtenues à pH 2 et 11.8, permet d'estimer la quantité totale de sites acides dosés à 0.395 mmol, notée HA_T . Cette valeur est à comparer à la concentration de la solution d'EDTA titrée, i.e. 20mL à 5 mM, soit 0.100 mmol d'EDTA, donc 0.400 mmol de sites acides, compte tenu du nombre d'acidité de cet acide. Ces deux valeurs sont très proches l'une de l'autre, ce qui permet de valider cette technique visant à estimer la densité totale en sites acides analysés. L'étude des variations des dérivées première et seconde permet d'estimer les propriétés de ces sites acides. Ainsi, un maximum de la dérivée première (passage par zéro de la dérivée seconde) indique une valeur de pKa, un minimum (passage par zéro de la dérivée seconde) le dosage d'un site acide donc sa concentration. Quatre types de sites peuvent ainsi être caractérisés:

- les deux premiers, superposés, correspondant à 0.200 mmol, soit deux sites de l'EDTA, dont les pKa peuvent être estimés à ~ 2.2 ($\Delta nOH^- \sim 0.05$ mmol) et ~ 2.9 ($\Delta nOH^- \sim 0.15$ mmol)
- le troisième correspondant à 0.100 mmol, soit un site de l'EDTA, de pKa ~ 6.2 ($\Delta nOH^- \sim 0.25$ mmol)
- le quatrième correspondant à 0.100 mmol, soit un site de l'EDTA, de pKa ~ 9.8 ($\Delta nOH^- \sim 0.35$ mmol)

Considérant les valeurs théoriques des pKa de l'EDTA: 2.07, 2.75, 6.24 et 10.34 (Ringbom, 1967), les valeurs expérimentales déterminées par cette approche graphique sont relativement correctes. Cette méthode d'analyse graphique ne peut tout de même pas se substituer à un calcul d'optimisation des paramètres d'acidité des sites analysés, par exemple par *PROSECE*, particulièrement dans le cas de MON pour lesquelles aucune inflexion n'est détectable sur la courbe (V_{KOH}, pH) et où seuls les groupes de sites de type carboxylique et de type phénolique sont identifiables sur la courbe ($pH, \Delta nOH^-$).

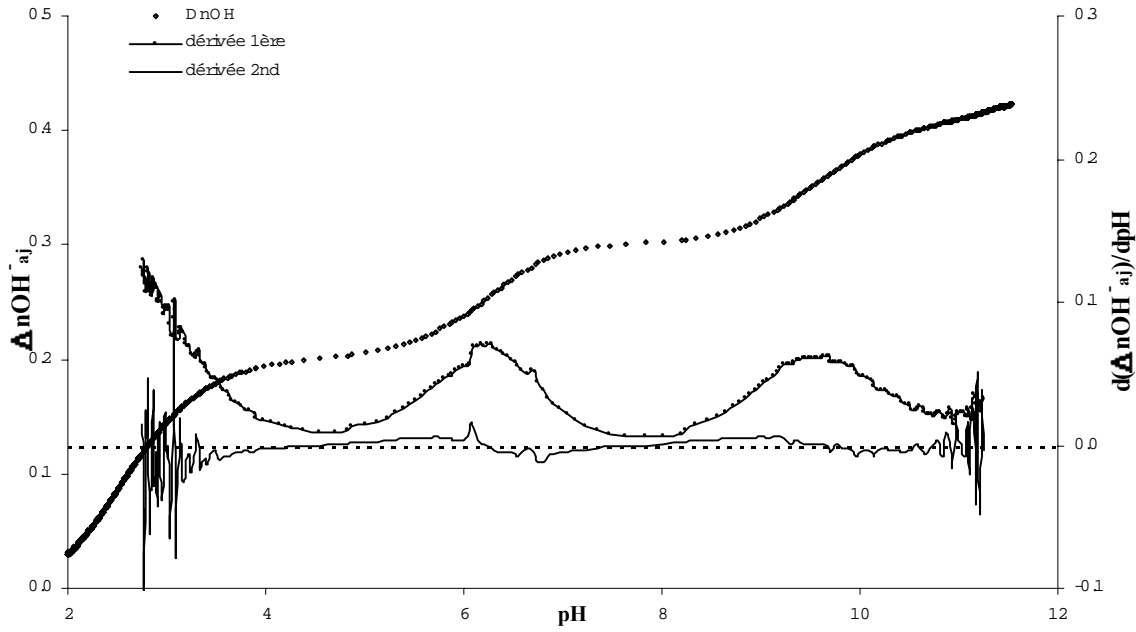


Figure III.14: Quantité de OH^- ($\Delta n\text{OH}^-$) nécessaire au dosage des sites acides de l'EDTA en fonction du pH, dérivées première et seconde.

Toutefois, cette technique permet d'estimer la valeur de la concentration totale en sites acides analysés par la titration (HA_T). Il reste à évaluer la concentration totale initiale en proton H_T^o (eq. III.13). Sachant que la titration acido-basique commence à pH 2, à ce pH, les sites acides sont majoritairement sous forme protonée, i.e. H_jA_i (eq. III.12) et non sous forme A_i . La concentration totale en ces sites est donc assimilable à HA_T . De plus, à pH 2, la concentration en hydroxydes ($\sum kM_i(\text{OH})_k$, eq. III.12) peut être négligée.

La détermination de H_T^o se réduit alors à:

$$H_T^o = H_{ini}^+ - \text{OH}_{ini}^- + \sum_i j \times [H_j A_i]_T = 10^{-pH_{ini}} - 10^{-(14-pH_{ini})} + HA_T \quad (\text{eq. III.14})$$

Ce calcul est trivial, il permet donc d'estimer pour chaque point expérimental ($V_{\text{KOH}, \text{pH}}$) la concentration totale en proton H_T , puisque les valeurs de $n_{\text{HNO}_3}^{aj}$ et n_{KOH}^{aj} sont connues en tout point de la titration (eq. III.13).

Cependant, l'estimation graphique de la concentration totale en sites acides analysés, ainsi que l'hypothèse de la protonation à pH 2 de tous les sites acides, sont des approximations, qui ne conduisent pas à la valeur exacte de H_T^o . Le calcul d'optimisation utilisé pour fitter les points expérimentaux (*PROSECE*) devra donc optimiser également cette valeur, et non pas seulement les paramètres (concentrations, constantes) des sites ou des *quasi-particules* (type I, II.C.2/) définies pour représenter les interactions de la MON étudiée avec le proton.

La technique analytique mise au point, ainsi que le traitement mathématique des courbes expérimentales obtenues, ont été utilisés pour caractériser les propriétés d'acidité de différentes MON étudiées au cours de ce travail. Les résultats obtenus sont présentés dans les chapitres IV.B/, IV.C/ et IV.E/.

CHAPITRE IV/ APPLICATIONS A DES SYSTEMES NATURELS

IV.A/ Détermination d'une distribution de ligands modélisant les propriétés de complexation de l'Acide Fulvique Suwannee River (AFSR) à l'aide de titrations en mode logarithmique:

Cette étude a fait l'objet de la rédaction d'une publication, parue en 2004 dans la revue *Environmental Technology*, sous le titre: "Metal logarithmic scale titration as a tool for complexing ligand distribution determination: an application by DPASV", Cédric Garnier, Stéphane Mounier, Jean Yves Benaïm, volume 25, pages 589-599. (Annexe **IV.1**)

IV.A.1/ Problématique:

Une majorité d'études visant à modéliser les propriétés de la MON ne tiennent pas compte de la structure exacte des groupements complexants de la MON mais les représentent par des entités mathématiques (sites, ligands, ...) (Kinniburgh *et al.*, 1996 ; Muller, 1996 ; Muller, 1999 ; Tipping et Hurley, 1992 ; Tipping, 1993 ; Wells *et al.*, 1998 ; Xue et Sigg, 1998). Ces dernières permettent alors de simuler les propriétés de la MON vis-à-vis des éléments analysés : proton, métaux traces, cations majeurs, ... Chacune de ces entités simule les propriétés d'une classe de groupements fonctionnels de la MON, présentant des propriétés voisines. La plupart des approches portent sur l'estimation de la capacité complexante de la MON (L_T) et la constante de complexation (K) associée à un équilibre thermodynamique 1:1 entre le ligand considéré et le métal (Byrne, 1996 ; Hart, 1981 ; Van den Berg, 1989). Ainsi, dans une étude récente, Town *et al.* (2000) compilent l'ensemble des données de complexation de la MON vis-à-vis des métaux traces (Cu, Cd, Pb, Zn), et montrent que leur comportement dans les eaux naturelles peut être expliqué par une grande variété de paramètres K et L_T . Compte tenu de la diversité des techniques d'analyse utilisées (ASV, CSV, ISE, quenching de fluorescence, DGT...) et des modélisations appliquées (modèles continus ou discrets), les propriétés de complexation obtenues sont en effet difficilement comparables. D'autant que les auteurs mentionnent rarement la teneur en carbone organique dissous (COD) de leurs échantillons, représentant la quantité de MON, laquelle peut varier de quelques ppm à quelques centaines de ppm de C (Mounier *et al.*, 1999a). Les sites complexants détectables dépendent aussi de la gamme de concentration analysable (fenêtre analytique) par la technique utilisée.

Le but de cette étude est de présenter une nouvelle méthode de détermination des propriétés de complexation de la MON vis-à-vis du cadmium et du plomb, permettant d'améliorer la prédiction de la spéciation des métaux traces et de la MON dans un milieu naturel. Cette méthode est basée sur des titrations en mode logarithmique (**II.E.2/**) associées à des mesure de la concentration en métal labile par DPASV (**III.C/**), ceci afin de couvrir la plus large fenêtre analytique possible. Des graphiques log-log ont été préférés aux représentations classiques $[M_{labile}] = f([M_T])$ car ils permettent de mieux appréhender l'amplitude de la complexation MON-métaux ainsi que la justesse de la modélisation, sur toute la fenêtre analytique. Le modèle d'équilibre développé pour traiter les données expérimentales, reposant sur un modèle discret de complexation MON-métal 1:1 à plusieurs sites, est basé sur un calcul d'optimisation des propriétés de complexation de ces sites, utilisant MINEQL, pour le calcul de spéciation, et un simplex modulé (MultiSimplex 2.1) pour l'optimisation (**II.D.1/**).

IV.A.2/ Matériels et méthodes:

Cette étude a été menée avant le développement du stand spécifique Metrohm-EcoChemie (**III.B.4.a/**). Les équipements et les procédures analytiques utilisés, le traitement des données expérimentales (voltammogrammes) ainsi que leur modélisation diffèrent donc légèrement de ceux explicités dans les chapitres précédents. Ils vont donc être détaillés dans cette partie.

a/ Matériel:

Les expériences de titrations logarithmiques ont été réalisées, manuellement, à l'aide du stand Metrohm-EcoChemie détaillé dans le chapitre **III.B.3.b.1/**. Les valeurs de pH ont été déterminées par un pHmètre PHM Meterlab et une électrode de verre combinée PHC3001-9 Radiometer étalonnée à l'aide de tampons Hanna Instrument de pH 4.01, 7.01, 10.01.

b/ Réactifs:

Tous les réactifs sont stockés dans des bouteilles Nalgene préalablement nettoyées pendant au moins 4 jours dans HNO₃ 10% puis rincées abondamment à l'eau MilliQ. L'eau ultrapure MilliQ a été utilisée pour le rinçage et la préparation des solutions. Les solutions de Cd²⁺ et Pb²⁺ à 1, 10, 100 et 1000μM ont été préparées à partir de Cd(NO₃)₂, 4H₂O et Pb(NO₃)₂ (Merck, pour analyses). Le tampon borax ([HNO₃] = 0.581 M, [Na₂B₄O₇] = 0.355 M) a été préparé à partir d'HNO₃ 70 % (J.T. Baker) et Na₂B₄O₇, 10H₂O (Merck, pour analyses), le tampon acétique ([CH₃CO₂H] = 1 M, [CH₃CO₂Na] = 1 M, [NaNO₃] = 5 M) à partir de CH₃CO₂Na (Merck, pour analyses) et de CH₃CO₂H (Prolabo, pour analyses). La solution d'acide fulvique (7.9 mg.l⁻¹ en COD), analysée en DPASV, a été préparée à partir d'Acide Fulvique Suwannee River (AFSR 1S101F, IHSS) maintenue à pH 7.8 par le tampon borax (200 μL dans 20 mL) ou à pH 4.6 par le tampon acétique (200 μL dans 20 mL). Toutes les solutions sont à la même concentration en NaNO₃ (0.1 M) afin de maintenir la force ionique constante durant les analyses, et sont conservées dans le noir à 4°C.

c/ Procédures analytiques:

Les concentrations initiales en métaux ont été déterminées, après digestion sous UV de la solution brute d'Acide Fulvique Suwannee River, en DPASV par ajouts dosés (procédure et appareillage explicités au chapitre **III.B.3/**). Ces valeurs sont nécessaires à la détermination de la spéciation.

L'évolution du pic de cadmium au cours du temps, après un ajout de Cd (10 μl de la solution standard à 10 μM) à 20 ml de la solution d'AFSR (pH

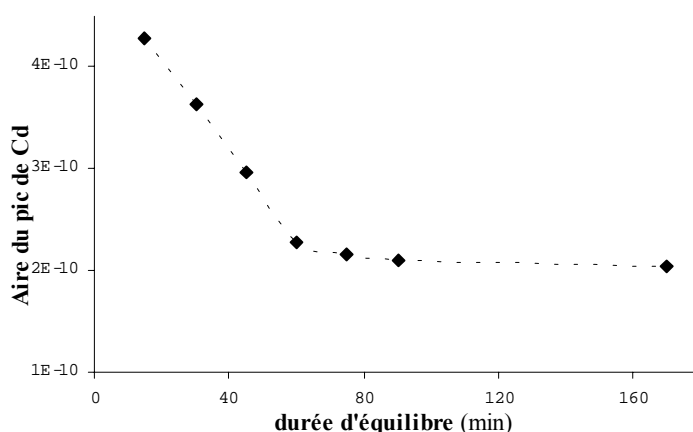


Figure IV.1: décroissance du pic de Cd (DPASV) en fonction du temps d'attente après l'ajout de Cd à une solution d'AFSR

7.8), est représentée sur la figure **IV.1**. Dans les conditions d'analyse choisies, un temps d'attente de 60 min après l'ajout de métal apparaît suffisant pour que la complexation soit à l'équilibre. Cette durée assez courte peut être en partie expliquée par l'utilisation de NaNO₃ comme électrolyte, ce dernier entrant peu en compétition avec les métaux traces vis-à-vis de la MON (Raspor *et al.*, 1977).

De ce fait, après 50 min sous agitation à 2000 tr/min puis 10 min de purge sous N₂ saturé en eau et agitation, quatre gouttes de mercure sont éjectées, l'étape de réduction se faisant sur la cinquième. Les conditions d'analyse sont listées dans le tableau **IV.1**.

Conditionnement	durée : 30 s	potentiel : -1.2 V
Déposition	durée : 600 s	potentiel : -1.0 V
Equilibre	durée : 10 s	potentiel : -1.0 V
Potentiers balayés	initial : -1.0 V	final : 0.2 V
Modulation	amplitude : 0.05 V	durée : 0.07 s
Potentiel d'intervalle	2 mV	
Durée d'intervalle	0.2 s	

Tableau **IV.1**: Conditions électrochimiques optimales à la détermination de la spéciation des métaux traces par DPASV

Les titrations, effectuées en mode logarithmique, ont été dupliquées pour Cd et Pb afin d'estimer la reproductibilité. Chaque expérience dure approximativement 36 h. L'étude de l'adsorption des acides fulviques et humiques sur une goutte de mercure durant un dépôt en DPASV, a montré que les acides fulviques ne sont pas adsorbés sur la goutte de mercure pour des potentiels inférieurs à -0.6 V (Raspor et Valenta, 1988). En effet, à ces potentiels, la goutte est chargée négativement, donc seuls les groupes positifs (comme les groupes amines) sont attirés. Or, ces derniers sont beaucoup moins présents sur les acides fulviques que sur les acides humiques. Ceci est corrélé à un ratio N/C faible. Comme le ratio N/C de l'AFSR est de 0.014, inférieur à celui décrit par les auteurs (0.027), cet acide fulvique ne devrait donc pas s'adsorber sur l'électrode au potentiel de dépôt utilisé. Ceci est confirmé par des voltamogrammes ne présentant pas d'anomalies particulières (multi-pics, distorsion de la ligne de base, ...).

IV.A.3/ Traitement des voltamogrammes - Modélisation des propriétés de complexation:

Les voltamogrammes obtenus au cours des titrations logarithmiques de l'AFSR ont été traités suivant le principe explicité dans la partie **III.B.4.c.2.1/**. En effet, compte tenu des interactions entre les métaux traces et l'AFSR modifiant leur labilité, les pics de réoxydation des deux métaux traces sont superposés, ce qui nécessite une étape de déconvolution. Ainsi, après régression polynomiale de la ligne de base dans la zone du massif de pics de Cd et Pb, ces derniers sont modélisés par des fonctions gaussiennes, par optimisation des paramètres de l'équation (eq. **III.2**). Ce processus de déconvolution a permis de déterminer pour chaque voltamogramme les concentrations labiles en Cd et Pb.

Le modèle de complexation utilisé, pour simuler les interactions de l'AFSR analysées lors de ces expériences, est constitué de quatre *quasi-particules* non-spécifiques (type II, **II.C.2/**). Chaque *quasi-particule* est caractérisée par une concentration L_{iT} et une constante de complexation vis-à-vis de chaque métal étudié (K_i^{Cd} , K_i^{Pb}). Les valeurs de ces paramètres de complexation ont été optimisées par un calcul couplé MINEQL-MultiSimplex (**II.D.1/**) afin de fitter les données expérimentales, i.e. les courbes $pM_{labile} = f(pM_T)$.

Les données expérimentales ont également été simulées à l'aide d'un modèle à deux *quasi-particules*. Dans ce cas, les paramètres (L_{iT} , K_i^{Cd} , K_i^{Pb}) de ces deux entités mathématiques ont été optimisés par l'outil *solveur* d'Excel, sans prendre en compte la spéciation chimique réelle des éléments, i.e. par exemple la complexation des métaux par les anions inorganiques du milieu. Dans ce cas, le système chimique est suffisamment simple pour ne pas nécessiter l'utilisation du calcul couplé MINEQL-MultiSimplex. En effet, le calcul de la concentration en métal non-complexé par les *quasi-particules* définies, en chaque point expérimental, se résume à résoudre un polynôme du troisième degré, problème mathématique qui possède une solution analytique. Cette méthode d'optimisation devient impossible lorsque le nombre de ligands augmente et/ou que l'on intègre les relations décrivant la spéciation des éléments, puisque le système chimique ne possède alors plus de solution analytique.

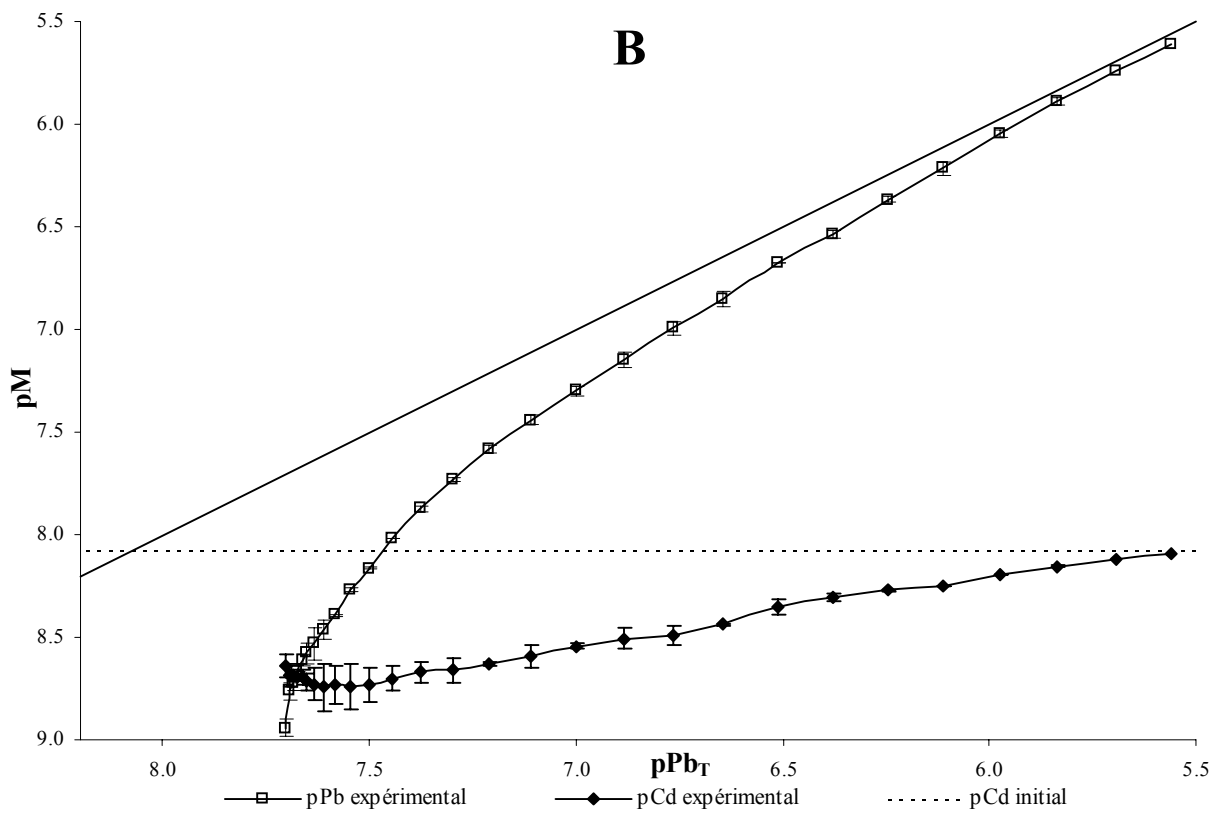
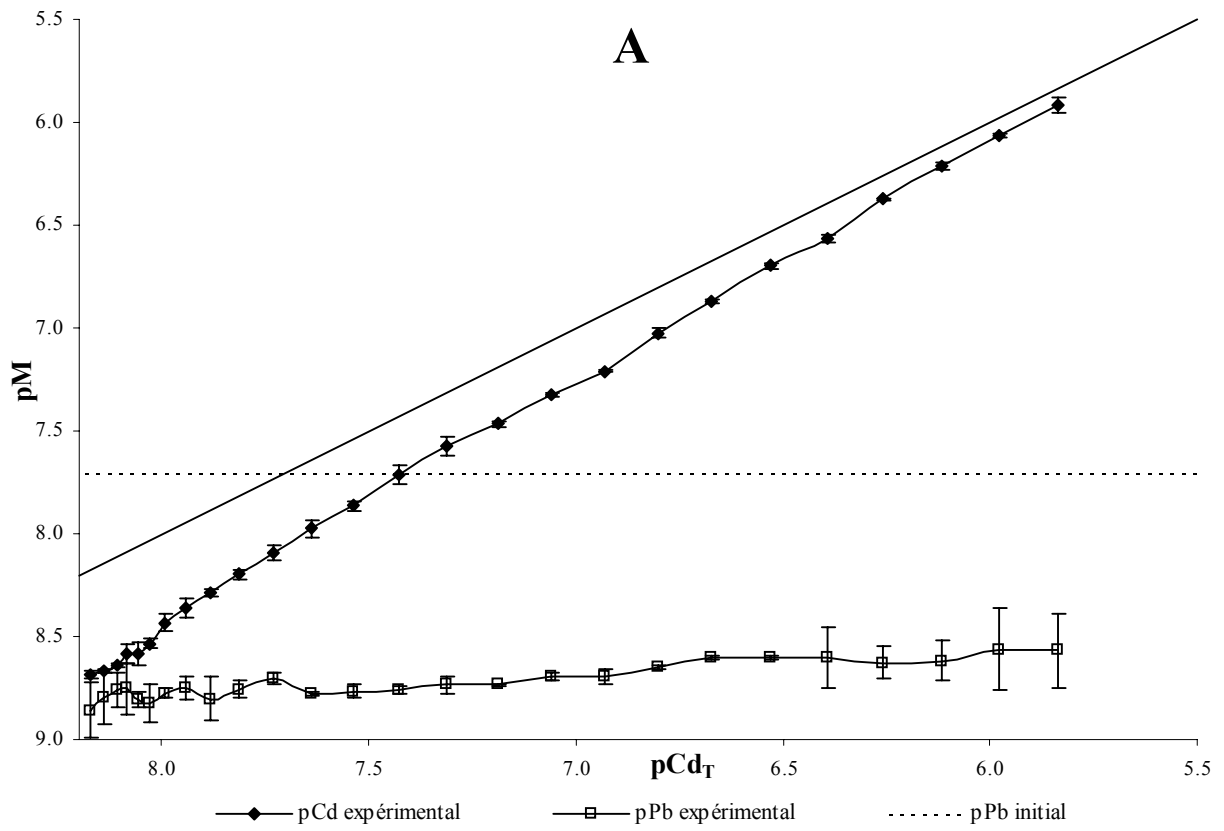


Figure IV.2: Titrations logarithmiques d'AFSR par Cd (A) et Pb (B) à pH 7.8

IV.A.4/ Résultats et discussion:

a/ Analyse des titrations logarithmiques d'AFSR par Cd et Pb:

Après traitement de l'ensemble des voltamogrammes et détermination de la sensibilité de l'appareil S_{app} (eq. III.10, III.B.4.c.2.3/), les courbes $pM = f(pM_T)$ peuvent être tracées (M , M_T : concentrations en métal labile et total ; $pX = -\log X$). La figure IV.2 représente les dosages logarithmiques d'une solution d'AFSR à pH 7.8 par Cd (figure IV.2A) et Pb (figure IV.2B). La relation $pM = pM_T$ représente une titration en absence de complexant (figure IV.2, droite). Plus la courbe expérimentale de dosage s'en écarte, plus la complexation du métal par la MON est importante, i.e. plus le produit $K \times L_T$ est élevé. En comparant les courbes pM du Cd (figure IV.2A) et du Pb (figure IV.2B), il apparaît que le Pb se complexé plus avec l'AFSR que le Cd.

Les phénomènes de compétition durant les titrations par Cd et Pb peuvent être appréciés en comparant les concentrations initiales en métaux (figure IV.2, lignes horizontales en pointillé) et les courbes pM du métal non titré (figure IV.2). Ainsi, la concentration en Pb (figure IV.2A) n'atteint pas sa concentration initiale alors que tout le cadmium semble libéré durant la titration d'AFSR par le Pb (figure IV.2B). L'écartype moyen sur la mesure en métal labile est relativement faible pour les concentrations en Pb et Cd lors des dosages d'AFSR par Pb et Cd respectivement (inférieur à 0.3% en pM). Par contre, au cours des mêmes dosages, il est plus important pour les concentrations en métaux non-ajoutés, i.e. Cd (figure IV.2B) et Pb (figure IV.2A). Ceci est dû à la difficulté d'estimer correctement S_{app}^{Cd} durant la titration d'AFSR par Pb et réciproquement. Un effet cinétique non négligeable aux faibles concentrations en métaux est également observable.

Lorsque l'on compare les résultats obtenus lors de dosages à pH 7.8 à ceux effectués à pH 4.6 (données non communiquées), on montre que la complexation AFSR-métaux est d'autant plus faible que le pH est acide. Ceci est un effet de la compétition entre les métaux et le proton vis-à-vis des groupements complexants présents sur l'AFSR.

b/ Modélisation de la complexation d'AFSR:

Les données expérimentales, issue des titrations en mode logarithmique de l'AFSR à pH 7.8 par Cd et Pb, ont été modélisées par quatre *quasi-particules* dont les caractéristiques de complexation (i.e. K_i^{Cd} , K_i^{Pb} , LT_i) ont été optimisées par les calculs couplés MINEQL-MultiSimplex. Ces *quasi-particules* sont définies à l'aide des dénominatifs "très fort, fort, faible et très faible" au regard de leurs constantes de complexation (tableau IV.2A). La figure IV.3 représente les courbes expérimentales et modélisées de ces titrations. Les *bias* moyens obtenus pour cette modélisation sont respectivement de 0.47 et 0.37 pour le dosage logarithmique d'AFSR par Cd et Pb, soit une erreur moyenne sur la concentration en métal labile de 4,2 et 3,2 %. L'écartype sur la mesure en Cd et Pb labile lors des dosages d'AFSR (figure IV.2A et IV.2B) et l'erreur relative sur la modélisation de ces données par les quatre *quasi-particules* (figure IV.3) suivent une distribution uniforme sur toute la fenêtre analytique, indiquant une modélisation correcte sur l'ensemble de la gamme de titration. Lorsque ces mêmes données sont modélisées par seulement deux *quasi-particules* (tableau IV.2B), les *bias* moyens sont alors respectivement de 1.69 et 0.39, soit 13.3 et 3.4% d'erreur moyenne sur la concentration en métal labile. Les interactions AFSR-métaux sont moins bien modélisées, notamment pour les faibles concentrations ($pM_T > 7.5$) donc dans la gamme des ligands forts ($L_T < 100$ nM). Un modèle à deux *quasi-particules* n'est pas adapté pour modéliser les propriétés de complexation de cette MON vis-à-vis de Cd et Pb conjointement, dans la fenêtre analytique choisie.

Les résultats obtenus (tableau IV.2A) pour le modèle à quatre *quasi-particules* confirment les premières impressions émises lors de l'étude des courbes de titrations d'AFSR par les deux métaux. Les constantes de stabilité d'AFSR vis-à-vis du plomb sont plus fortes que pour le

cadmium, ce qui est en accord avec la littérature (Kozelka et Bruland, 1998 ; Muller, 1996 ; Muller, 1999 ; Wells *et al.*, 1998).

A	<i>quasi-particule</i>	très fort	fort	faible	très faible	<i>bias</i>
	C _L nM	21.1	25.1	150	1900	
pH	LogK _{Cd}	9.9	6.8	6.4	4.6	0.47
7.8	LogK _{Pb}	11.1	7.6	6.8	4.9	0.37
pH	LogK _{Cd}	8.8	4.2	4.0	3.4	0.65
4.6	LogK _{Pb}	9.7	4.6	4.2	3.4	1.21

B	<i>quasi-particule</i>	fort	faible	<i>bias</i>
	C _L nM	20.3	222	
pH	LogK _{Cd}	8.2	6.4	1.69
7.8	LogK _{Pb}	9.5	6.5	0.39
pH	LogK _{Cd}	7.6	4.0	0.99
4.6	LogK _{Pb}	8.8	4.2	1.08

Tableau IV.2: Paramètres de complexation optimisés pour un modèle à quatre *quasi-particules* (A, MINEQL-Simplex) et un modèle à deux *quasi-particules* (B, Excel)

En outre, au vue des valeurs de constantes de stabilité et des capacités complexantes (L_T corrigée de la concentration en AFSR), la *quasi-particule* "très fort" semble similaire aux sites forts, représentant les ligands organiques habituellement déterminés par des modèles à un ou deux ligands en CSV et compétition de ligands (Kozelka et Bruland, 1998 ; Muller, 1999 ; Wells *et al.*, 1998 ; Xue et Sigg, 1998). L'utilisation de quatre *quasi-particules* pour la modélisation des titrations logarithmiques permet d'affiner la caractérisation des propriétés de complexation de l'AFSR par trois types de ligands supplémentaires.

L'étude présentée ici tient compte non seulement des interactions métaux-ligands inorganiques mais aussi de la compétition entre les différents métaux traces vis-à-vis des sites de complexation de la MON en définissant pour chaque *quasi-particule* une constante de stabilité par métal. Cependant, un effet de compétition entre les deux métaux vis-à-vis de la MON, matérialisé par les différences de constantes de stabilité des quatre *quasi-particules* (tableau IV.2A), n'a pu après simulation expliquer complètement les variations des concentrations en métal non titré observées lors des dosages d'AFSR (Figure IV.2).

De nombreuses études ont montré qu'il y avait compétition entre les protons et les métaux traces pour la complexation des sites ligands d'une MON (Buffle, 1988 ; Christensen et Christensen, 2000 ; Robertson et Leckie, 1999). Un travail similaire a donc été réalisé à partir des titrations d'AFSR par Pb et Cd à pH 4.6. Le but était d'obtenir la variation des constantes de stabilité en fonction du pH. En effet, les constantes conditionnelles (K_{cond}) sont directement reliées au pH suivant les équations (IV.1) et (IV.2).

$$K_{cond} = \frac{[ML]}{[M][L]} = \frac{[ML]}{\alpha[M_f]\alpha'[L_f]} = \frac{K_{th}}{\alpha\alpha'} \quad (\text{eq. IV.1})$$

$$\alpha = 1 + \sum_i K_i \cdot [L_i] \quad (\text{eq. IV.2})$$

$$\alpha' = 1 + \sum_j \frac{[H]^j}{\prod_j K_{a_j}} + \sum_n K_n \cdot [M_n] \quad (\text{eq. IV.3})$$

avec:

[M_f], [L_f]: concentrations en M et L libres (par opposition aux [M] et [L] labiles),

L_i: ligand inorganique complexant M,

K_{a_j}: j^{ème} constante d'acidité de L,

M_n: cation (majeur, métal trace...) complexant L, en compétition avec M

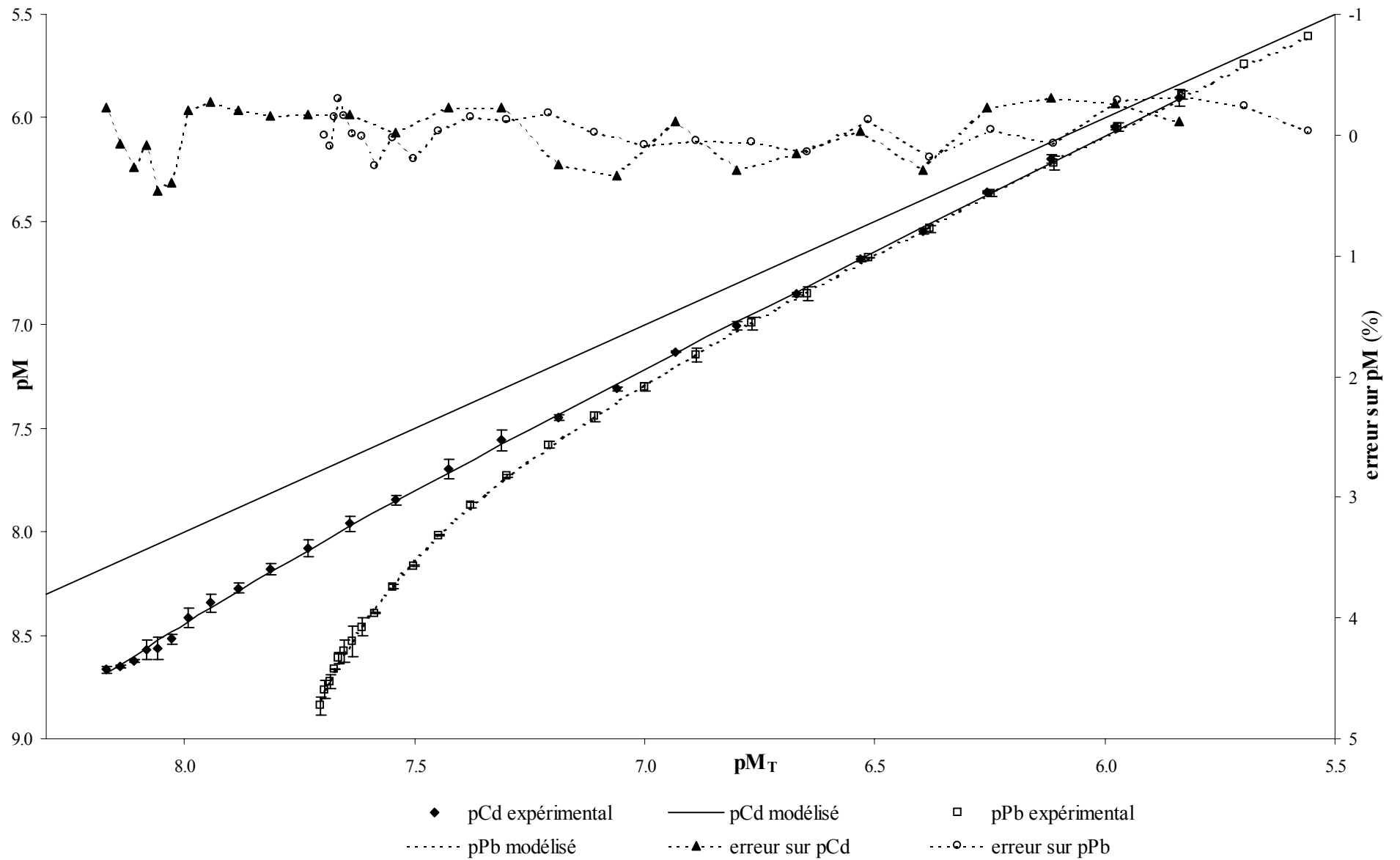


Figure IV.3: Modélisation des titrations logarithmiques de l'AFSR par Cd et Pb à pH 7.8 à l'aide d'un modèle discret à 4 *quasi-particules*

L'utilisation du logiciel de calcul des équilibres MINEQL permet, après définition des espèces du milieu, de déterminer la spéciation du métal dans l'échantillon, donc de calculer α (eq. IV.2). L'estimation de α' (eq. IV.3) est plus difficile puisque ce coefficient représente la spéciation du ligand, ici l'AFSR, dans le milieu, i.e. les interactions de L avec les cations majeurs, les autres métaux traces et le proton (phénomènes de compétition avec M vis-à-vis des sites de complexation de L). Les constantes de stabilité MON-majeurs sont généralement plus faibles que les constantes MON-métaux traces (Buffle, 1988), et conséquemment l'effet de compétition vis-à-vis du métal M est négligeable, d'autant que l'électrolyte utilisé est NaNO₃ (Raspor *et al.*, 1977). De plus, le modèle développé dans cette étude prend en compte les compétitions entre Cd et Pb. Les facteurs influençant principalement α' sont donc le pH et les pKa de L (i.e. de ces sites de complexation). En théorie, quand le pH diminue, α' augmentant, les K_{cond} diminuent aussi, d'autant plus vite que les pKa des sites sont élevés (eq. IV.3).

La modélisation a consisté à optimiser les valeurs des constantes de stabilité (K_i^{Cd} , K_i^{Pb}) pour les dosages d'AFSR par Cd et Pb réalisés à pH 4.6, en conservant les valeurs de L_T déterminées à partir des données à pH 7.8 (tableau IV.2A). Les valeurs des constantes de stabilité conditionnelles des *quasi-particules*, pour le Pb et le Cd, ont diminué lors du passage de pH 7.8 à 4.6 (tableau IV.2A). Ce phénomène est moins marqué pour la *quasi-particule* "très fort" dont les propriétés de complexation restent fortes quel que soit le pH. Donc même à pH acide, l'AFSR conserve des sites de complexation forts vis-à-vis des métaux traces, ces sites semblant plus spécifiques au métal qu'au proton.

Sachant que l'erreur sur la détermination des K est d'autant plus forte que le produit $K \times L_T$ est inférieur à 1 (Ružić, 1982), et que les K_{cond} de ces trois *quasi-particules* sont très sensibles au pH (i.e. que les valeurs de K diminuent nettement lorsque le pH devient plus acide), il n'est par étonnant que les *bias* moyens obtenus (0.70 et 1.34 respectivement pour les dosages par Cd et Pb) sont plus importants qu'à pH 7.8.

Il a été montré que la détermination des paramètres de complexation était améliorée quand la fenêtre d'analyse encadre la capacité complexante globale de la MON (Dixon *et al.*, 1999). Cependant, la difficulté d'estimer correctement la valeur de la sensibilité de l'appareil S_{app} (Scarano *et al.*, 1992) augmente l'imprécision sur les caractéristiques de sites complexants présents sur une MON de L_T supérieure à 1 μM .

Les ajouts logarithmiques permettent donc de déterminer avec justesse des caractéristiques de complexation pour des groupements complexants de L_T inférieur à la μM , i.e. modélisés par les *quasi-particules* "très fort, fort et faible".

IV.A.5/ Conclusions:

La technique des ajouts logarithmiques, basée sur la mesure des concentrations en cadmium et plomb labiles par DPASV sur une large gamme de [M] (pM_T : 9-5,5), a permis d'observer la complexation entre l'AFSR le Cd et le Pb pour des sites de capacité complexante L_T comprise entre le nM et le μM , contrairement aux autres techniques (CSV, ligand exchange-ASV, ISE...) ayant une fenêtre analytique plus restreinte et/ou une précision non uniforme sur la mesure des [M] dans cette fenêtre. Cette étude propose donc l'utilisation d'un modèle à quatre *quasi-particules* pour modéliser des expériences d'ajouts logarithmiques. Ceci corrobore les résultats montrant que plus de deux groupes de complexes différents peuvent être déterminés à partir de courbes de titration (Verweij et Ružić, 1997).

Les titrations logarithmiques réalisées à deux pH, et l'utilisation d'un calcul d'optimisation utilisant MINEQL pour la spéciation et un simplex modulé pour l'optimisation des paramètres de complexation, permettent la caractérisation complète des paramètres des *quasi-particules* simulant l'AFSR (tableau IV.2A). Ce modèle prend en compte la complexation des métaux traces (Cd et Pb), la compétition entre ces deux métaux ainsi que la dépendance au pH de ce système, dans une gamme de pH naturels. Il apparaît que même à pH acide, l'AFSR conserve des sites complexants forts à des concentrations de l'ordre de la nM. Ces *quasi-particules*

représentent des classes de sites présents sur la MON, mais ne peuvent pas être associées à des structures chimiques, ce qui n'est pas l'objectif d'une telle modélisation (Sposito *et al.*, 1981).

Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de déterminer des constantes de stabilité quasi-thermodynamiques, indépendantes du pH, i.e. prenant en compte les phénomènes de compétition métal-proton au niveau des groupements complexants de la MON. Ainsi, l'affectation de constantes d'acidité aux *quasi-particules* définies dans cette étude complètera ce modèle de MON, le rendant utilisable dans un modèle de transport de contaminants en milieu naturel, comme MOCO-SiAM3D actuellement développé par IFREMER (Gonzalez *et al.*, 2001).

IV.B/ Etude des propriétés d'acidité de MON issues de La Seine (programme Seine Aval2):

Je tiens à remercier Kerstin Küpker, post-doctorante au laboratoire RCMO-PROTEE, pour les mesures de spectroscopie de fluorescence et de teneur en carbone organique dissout qu'elle a fait sur ces échantillons. Ce chapitre est donc le fruit d'une collaboration qui a permis de caractériser les MON  tudi es. Merci également à Dominique Fevrier, Ingénieur de Recherche au laboratoire RCMO-PROTEE, pour avoir réalisé les campagnes de prélèvement dans ce programme.

IV.B.1/ Contexte – Problématique:

Seine-Aval est un programme d'études et de recherches interdisciplinaires   caractère appliqué sur l'estuaire de la Seine qui a débuté en 1995. La zone d'étude couvre 160 km, de Poses (en amont de Rouen)   Honfleur (figure IV.4). Ce programme réunit plus d'une centaine de chercheurs dans des disciplines aussi diverses que la physique, la géologie, la chimie, l'écologie, l'écotoxicologie ou encore l' conomie. Ces objectifs principaux sont de fournir les connaissances nécessaires à la compréhension du fonctionnement de l'écosystème estuarien, et de développer des d'outils d'aide à la décision pour les acteurs régionaux et nationaux. Les études menées au cours de la deuxième phase de Seine-Aval (Seine-Aval2) ont été structur es en quatre thèmes: (1) analyse des risques microbiens - analyse des risques chimiques, (2) zones connexes, (3) eutrophisation, dégradation de la matière organique, rétention des nutriments et (4) peuplement, population, habitat.

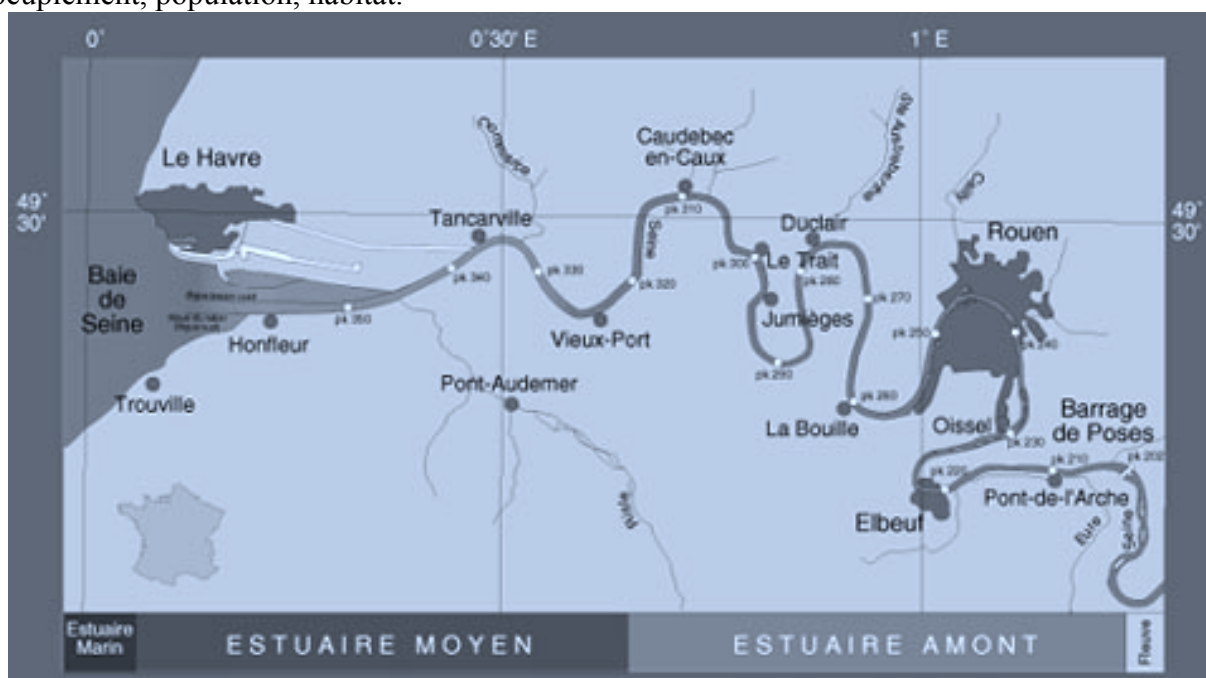


Figure IV.4: Localisation des stations d'échantillonnage de l'estuaire de La Seine

S'insérant dans la troisième thématique, tout en étant proche des problématiques évoquées dans les risques chimiques, l'étude des propriétés de la matière organique naturelle le long de l'estuaire est apparue indispensable à la compréhension aussi bien des flux de carbone que du transport des contaminants métalliques. En effet, l'estuaire de La Seine, réceptacle ultime avant la mer des eaux drainant un bassin très industrialisé (40% de l'activité économique française), urbanisé (16 millions d'habitants dont 80% en zone urbaine) et ayant une activité agricole importante et diversifiée (60000 km², soit 80% du bassin versant), est un environnement fortement concerné par la contamination des métaux traces (Ag, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn, ...) (Chiffolleau *et al.*, 2001).

Le caractère extrêmement complexe des MON dans les eaux naturelles, rend sa caractérisation toujours difficile. Son hétérogénéité structurelle est due au mélange de groupements fonctionnels qui la constitue, d'origines et d'âges très variés (Buffle, 1988 ; Martin-Mousset *et al.*, 1997 ; Sigg *et al.*, 1992 ; Thurman *et al.*, 1988). De plus, la structure de la MON est reliée au type de méthode d'extraction utilisée (Zsolnay, 2003). La MON dissoute observable dans une rivière est issue de la décomposition d'organismes aquatiques (phytoplanctons, zooplanctons, algues), mais aussi d'apports anthropiques d'autant plus influents qu'elle provient de zones urbaines ou industrielles. Enfin, les apports de MON allochtone, par les eaux de ruissellement, sont une contribution importante à la MON. Ces différentes origines, et le nombre important de processus chimiques/physiques/biologiques survenant au cours du temps, expliquent l'hétérogénéité de la MON et de la variabilité de ses interactions vis-à-vis des micro-polluants.

L'utilisation de techniques analytiques telles que la détermination du carbone organique (dissous: DOC et particulaire: POC), la spectroscopie de fluorescence et les titrations acido-basiques permettent la définition de caractéristiques indiquant l'origine et la maturité de la MON. Alors que la teneur en COD donne une idée de la quantité de matière organique, la spectroscopie de fluorescence conduit à une information sur la qualité de la MON en tenant compte du rapport de fluorescence $R_{a,c}$ (Mounier *et al.*, 1999b ; Patel *et al.*, 2002). En effet, il a été montré que ce rapport indique la composition du matériel organique en composés de types humiques et fulviques, et donc une notion de maturité de la MON étudiée. Ainsi, une augmentation de la quantité en acides humiques, décrite par une diminution du rapport $R_{a,c}$, signifie un stade de maturation plus avancé. Comparés à des rapports précédemment déterminés (Chen *et al.*, 2003 ; McKnight *et al.*, 2001), la valeur de $R_{a,c}$ peut donner une information indirecte sur l'origine de la MON (terrestre, biologique, marine, ...). Parallèlement, les titrations acido-basiques, traitées par un logiciel de modélisation adéquat, permettent une caractérisation directe de la nature des sites acides présents dans la structure macro-moléculaire (Christensen *et al.*, 1998 ; Lu et Allen, 2002 ; Masini *et al.*, 1998 ; Ritchie et Perdue, 2003 ; de Souza Sierra *et al.*, 2001).

L'objectif de cette étude est d'appliquer ces différentes techniques pour permettre caractériser les MON étudiées le long de La Seine. Ces caractéristiques devraient conduire à une meilleure compréhension des mécanismes d'apports, de transformation et de transport de ces MON, et donc leur rôle dans le transport des contaminants métalliques dans l'écosystème.

IV.B.2/ Sites de prélèvement:

Le site d'étude choisi pour ce travail est l'estuaire de La Seine qui, géographiquement, s'étend de Honfleur à Poses, soit sur environ 160 km. L'aval de l'estuaire est soumis aux apports marins, donc à de fortes variations de salinité associées à des variations de propriétés chimiques et physiques, alors que l'amont n'est soumis qu'aux apports du fleuve, pouvant varier fortement notamment pendant les épisodes de crue ou d'étiage. La figure IV.4 montre les sites de

prélèvement des échantillons d'eaux collectés d'avril 2002 à décembre 2002. Ces prélèvements ont été complétés par deux campagnes supplémentaires menées en mars et septembre 2002 sur des sites de l'estuaire de différentes salinités, à différentes profondeurs.

Le débit moyen durant l'année 2002, mesuré par la Cellule Anti-Pollution, au barrage de Poses, est de 591 m³/s, avec un maximum de 1796 m³/s en mars et un minimum de 115 m³/s en septembre. La période de crue a été inhabituellement longue durant cette année. La zone de mélange conservatif, s'étendant de Honfleur au Vieux-Port, est limitée à une gamme de salinité de 8 à 0.4 g.l⁻¹. Durant la période d'échantillonnage, la température de l'eau est passée de 12 °C en mars à plus de 20°C l'été, pour redescendre à moins de 8°C en décembre. Alors que les concentrations en nitrate montrent une stabilité spatio-temporelle (environ 27.6 mg.l⁻¹), les analyses des concentrations en phosphate révèlent une influence significative de la ville de Rouen, située entre Poses et La Bouille.

IV.B.3/ Matériel et méthodes:

Tous les matériels utilisés sont rincés deux fois à l'acide nitrique 10%, puis deux fois à l'eau ultra-pure (milliQ) avant d'être stockés. Chaque échantillon prélevé, contenant un litre d'eau de surface, est filtré à travers un filtre en fibre de verre (0.7 µm, Whatmann, GF/F) directement après le prélèvement. Les filtres sont prétraités par un chauffage à 450°C pendant 12 h, afin de détruire toute trace de carbone organique. Ensuite, de l'azoture de sodium (100 µl, 1M, Merck) est ajouté aux filtrats avant le stockage dans le noir à 4°C. Tous les résultats obtenus concernant les diverses analyses et mesures sont résumés dans le tableau **IV.3**.

a/ Carbone organique dissous et particulaire:

Le carbone organique dissous (COD) a été mesuré à l'aide d'un appareil TOC5000 (Shimadzu), équipé d'un passeur d'échantillon (volume d'échantillon: 5 mL, volume d'injection: 100 µl). Afin d'éliminer les carbonates, et donc ne mesurer que le COD, de l'acide chlorhydrique (50 µl, 30%, Fisher) est ajouté avant un barbotage à l'oxygène de 10 à 20 min. L'échantillon est ensuite analysé par une combustion catalytique à 650°C. Le CO₂ formé est mesuré par un détecteur infrarouge non-dispersif (NDIR). Les valeurs obtenues sont comparées à une courbe de calibration réalisées sur des solutions de phtalate acide de potassium (Prolabo). La détection limite obtenue est de 0.15 mg.l⁻¹ de COD, dans ces conditions d'analyse. Chaque analyse est réalisée en triplicata.

Le carbone organique particulaire (COP), retenu sur les filtres en fibre de verre, est analysé en utilisant le même système analytique, équipé d'un four (SSM-5000A) à 900°C. Trois parties d'un même filtre sont successivement analysées, ce qui conduit à la concentration en POC et à la déviation standard de l'échantillon filtré. Cette dernière est calculée à partir d'une courbe de calibration s'étendant de 4 à 2000 mg.l⁻¹. Dans ces conditions, l'erreur sur la mesure est de l'ordre de 1%.

b/ Spectroscopie de fluorescence:

Les spectres d'excitation ($\lambda_{em} = 420$ nm, $\lambda_{ex} = 200 - 400$ nm, résolution ex/em = 5 nm) sont enregistrés grâce à un spectromètre Hitachi F-4500. Les intensités de fluorescence correspondant aux longueurs d'ondes I_a ($\lambda_{ex} = 250$ nm) et I_c ($\lambda_{ex} = 325$ nm) sont mesurées, leur rapport est nommé $R_{a,c}$. Les propriétés de fluorescence des échantillons sont étudiées au pH naturel, contrôlé par un pH-mètre (Radiometer) équipé d'une électrode de pH combiné (Orion).

campagne date	échantillon	débit m ³ /s	T °C	S % mg/l	chlorophylle A µg/l	phaeocopigments µg/l	DOC mg/l	POC mg/l	pH	R _{ac}	pKa des quasi-particules						concentrations des quasi-particules (mol/L)						carboxylique mol/l	phénolique mol/l			
											pK _{H1}	pK _{H2}	pK _{H3}	pK _{H4}	pK _{H5}	pK _{H6}	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆					
21/03/2002	Baie1 S						8.7	1.7	7.26	2.11																	
21/03/2002	Baie1 F						3.6	5.6	7.49	2.59																	
21/03/2002	Baie2 S						3.8	10.8	7.19	2.11																	
21/03/2002	Baie2 F						0.1	8.2	6.94	2.16																	
21/03/2002	Honfleur S						7.5	4.3	7.69	1.89	2.7	4.6	6.4	9.7	10.6	10.7	2.3E-04	1.1E-04	5.3E-05	4.0E-04	2.7E-04	2.2E-04	3.9E-04	9.0E-04			
21/03/2002	Honfleur F						3.0	147.1	7.76	1.95	3.4	4.7	6.4	9.7	10.9	11.6	1.3E-04	1.0E-04	2.8E-05	1.6E-04	5.1E-04	2.4E-04	2.6E-04	9.1E-04			
21/03/2002	Pt Normandie S						6.6	2.2	7.68	1.93	2.1	4.1	5.9	9.0	10.3	10.7	8.3E-08	1.6E-04	6.0E-05	8.4E-05	6.9E-04	2.1E-04	2.2E-04	9.8E-04			
21/03/2002	Pt Normandie F						3.3	3.4	7.55	1.87	2.7	4.7	6.4	9.6	10.5	10.9	4.5E-04	1.0E-04	4.2E-05	2.6E-04	2.1E-04	8.1E-04	6.0E-04	1.3E-03			
17/04/2002	Poses	523	12	414	75.1	13.6	4.4	3.3	7.69	1.39	2.1	4.6	6.4	9.2	9.8	10.2	9.3E-06	4.7E-04	3.0E-04	1.7E-04	2.4E-04	2.5E-04	7.9E-04	6.7E-04			
17/04/2002	La Bouille	520	11.8	404	82	16.4	4.3	1.3	7.55	1.46																	
17/04/2002	Caudebec	535	11.8	393.4	62.3	30.7	3.4	3.5	7.65	1.56	4.6	4.6	6.4	9.6	10.5	11.1	1.5E-04	1.8E-04	1.7E-04	3.2E-04	1.7E-04	3.1E-04	5.0E-04	8.0E-04			
17/04/2002	Tancarville	575	11.9	433.5	44.9	51	3.0	15.9	7.63	1.49	4.4	4.6	6.4	9.5	10.4	11.0	1.0E-04	3.7E-04	1.4E-04	2.5E-04	2.1E-04	1.2E-04	6.2E-04	5.8E-04			
17/04/2002	Honfleur	570	11.6	8039	9	34.8	3.7	46.2	7.67	1.63																	
12/06/2002	Poses	332	18.54	416	22.4	6.7	3.3	6.5	7.85	1.85	-1.5	4.6	6.4	9.4	10.4	11.0	4.6E-04	5.1E-04	9.0E-05	2.6E-04	2.0E-04	2.4E-04	1.1E-03	7.0E-04			
12/06/2002	La Bouille	345	18.2	430	21.9	13.6	3.4	2.9	7.74	1.70	4.5	4.7	6.5	9.8	11.2	12.7	9.0E-04	9.4E-05	9.1E-05	3.8E-04	4.1E-04	3.9E-04	1.1E-03	1.2E-03			
12/06/2002	Caudebec	395	18.02	421	20.8	17.7	2.5	2.7	7.66	1.54	1.8	4.6	6.4	9.5	10.5	11.5	6.5E-09	4.9E-04	1.6E-04	2.6E-04	3.2E-04	3.3E-04	6.5E-04	9.1E-04			
12/06/2002	Tancarville	445	18.2	461	41.7	84.7	2.9	14.1	7.86	1.65	4.5	4.5	6.3	9.8	10.9	10.9	2.5E-04	2.1E-04	6.1E-05	1.8E-04	1.8E-04	1.7E-04	5.2E-04	5.3E-04			
12/06/2002	Honfleur	305	17.4	5086	28.8	96.8	2.5	10.2	7.90	1.94																	
04/09/2002	Poses	225	20.45	374	7.7	0.3	3.1		7.15	1.77	3.7	4.7	6.5	9.3	9.9	11.5	1.3E-04	3.9E-04	1.4E-04	1.1E-04	2.5E-04	2.9E-04	6.5E-04	6.5E-04			
04/09/2002	La Bouille	260	20.12	393	1.5	3.6	2.8		7.44	1.55	4.6	4.6	6.4	9.2	9.2	10.3	7.8E-05	2.0E-04	4.9E-05	4.1E-05	4.3E-05	2.7E-04	3.2E-04	3.6E-04			
04/09/2002	Caudebec	325	20.2	380	13.8	8.4	2.1	2.0	7.15	1.75	4.5	4.6	6.5	9.6	9.7	11.2	1.7E-04	2.7E-04	5.4E-05	9.3E-05	6.3E-05	2.1E-04	4.9E-04	3.6E-04			
04/09/2002	Tancarville						2.4		7.93	1.68																	
04/09/2002	Honfleur						2.2		7.76	1.92																	
18/09/2002	Honfleur S		17.7	2510			1.7	0.5	7.53	2.10																	
18/09/2002	Honfleur F		17.9	2830			1.8	2.1	7.53	1.86																	
18/09/2002	Point2 S		18.3	1740				0.4	7.54	1.90																	
18/09/2002	Point2 F		18.1	2380				0.5	7.57	1.80																	
18/09/2002	Vasière2 S							11.4	7.68	1.94																	
18/09/2002	Vasière2 F							77.8	7.69	1.88																	
18/09/2002	Tancarville S		19	560			2.1	2.8	7.63	1.79																	
18/09/2002	Tancarville F		19.1	680			2.6	61.6	7.64	1.99																	
18/09/2002	IVAS R3								7.62	1.89																	
11/12/2002	Poses	473	6.77	398	0.75	3.21	3.3		7.70	1.60	4.3	4.7	6.5	9.7	11.1	19.5	2.3E-04	2.4E-04	3.3E-05	2.0E-04	1.7E-04	2.2E-04	5.1E-04	6.0E-04			
11/12/2002	La Bouille	545	7.12	430.9	0.51	1.86	3.0		7.71	1.51	4.5	4.7	6.6	9.5	10.5	12.8	2.6E-04	1.2E-04	6.9E-05	1.4E-04	2.0E-04	3.2E-04	4.5E-04	6.6E-04			
11/12/2002	Caudebec	570	7.62	412	2.35	1.84	3.4																				
11/12/2002	Tancarville	665	7.62	437	2.56	4.91	3.3		7.72	1.53	4.5	4.6	6.5	9.4	10.5	11.2	3.0E-04	1.8E-04	3.7E-05	1.0E-04	2.6E-04	2.0E-04	5.1E-04	5.6E-04			
11/12/2002	Honfleur	650	7.35	9636	0.43	11.38	2.5		7.79	1.61																	

Tableau IV.3: Résumé des campagnes et des résultats obtenus

c/ Titration acido-basiques:

Les titrations acido-basiques des échantillons ont été réalisées suivant le processus explicité dans le chapitre III.C.1/. Afin d'accroître la quantité de sites acides analysables par cette technique, sachant que les échantillons n'ont subi aucun pré-traitement visant à augmenter la quantité de MON, les analyses ont été réalisées sur 100 ml d'échantillon. Compte tenu de ce volume plus important, les volumes d'ajouts de solutions standards (KOH et HNO₃) ont également été augmentés. Enfin, pour minimiser les effets de la dilution, une solution d'HNO₃ à 0.4 M a été utilisée. Chaque titration dure en moyenne 12 h.

d/ Modélisation des propriétés d'acidité des MON:

Les données expérimentales (V_{KOH} , pH) issues de ces titrations ont été traitées à partir du principe détaillé au chapitre III.C.2/. A partir des courbes (pH, $\Delta n\text{OH}^-$) obtenues, la concentration totale en sites acides analysables (HA_T) et la concentration totale initiale en proton (H_T^o) ont pu être estimées pour chaque échantillon.

Ainsi, la figure IV.5A représente la courbe (V_{KOH} , pH) obtenue pour la titration de 100 ml d'un échantillon prélevé à Tancarville lors de la campagne du 11/12/02. La transformation de ces données expérimentales permet d'aboutir à une courbe (pH, $\Delta n\text{OH}^-$) représentée sur la figure IV.5B. Bien qu'aucun point d'inflexion ne soit décelable sur la courbe (V_{KOH} , pH), les sites de type carboxylique et de type phénolique sont facilement identifiables sur la courbe (pH, $\Delta n\text{OH}^-$).

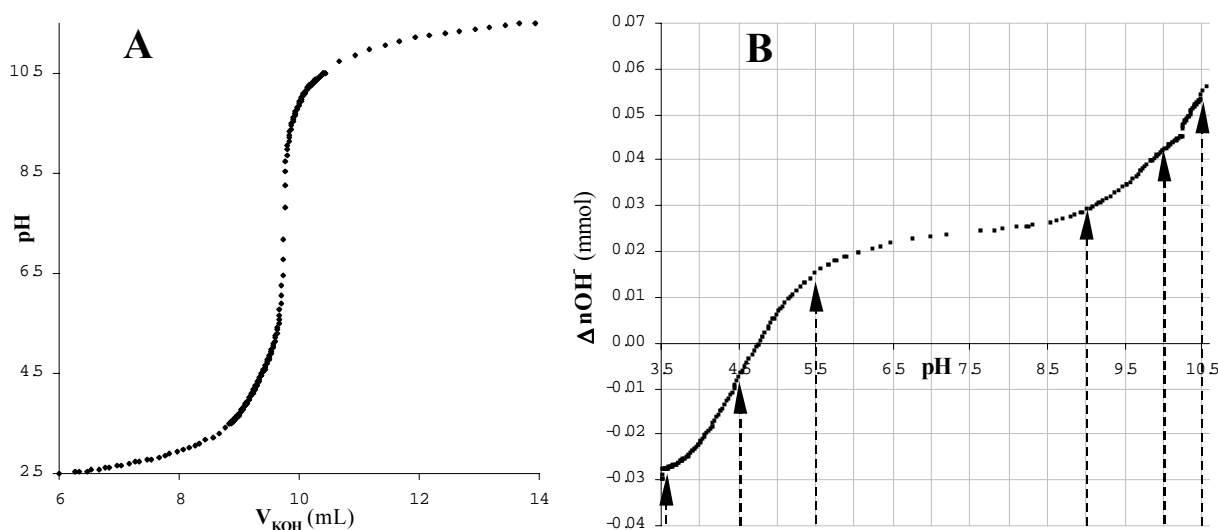


Figure IV.5: Représentation des données expérimentales (V_{KOH} , pH) issues d'une titration acido-basique d'un échantillon prélevé à Tancarville (11/12/02) (A), et courbe (pH, $\Delta n\text{OH}^-$) résultante du traitement de ces données (B)

Un modèle chimique à 6 *quasi-particules* a été défini pour représenter les interactions MON-proton analysées. En effet, cette configuration conduit aux meilleurs fitting des données de titrations acido-basiques réalisées sur des MON standards (AF et AH) (IV.C/). Pour chaque échantillon, la distribution initiale des constantes d'acidité ($pK_{H,i}$) de ces *quasi-particules* a été établie comme étant: 3.5 ; 4.5 ; 5.5 ; 9 ; 10 ; 10.5 (figure IV.5B: flèches pointillées). Les valeurs initiales des concentrations (L_{iT}) en ces 6 *quasi-particules* ont été calculées, à partir du graphique (pH, $\Delta n\text{OH}^-$), en déterminant la valeur de $\Delta n\text{OH}^-$ correspondante au $pK_{H,i}$ fixé.

Une fois cette initialisation réalisée, la concentration totale initiale en proton (H_T^o), les constantes d'acidité ($pK_{H,i}$) et les concentrations (L_{iT}) de ces *quasi-particules* sont optimisées par PROSECE pour obtenir le set de paramètres reproduisant au mieux les données expérimentales. Par exemple, la figure IV.6 représente les courbes (H_T , pH) expérimentale et simulée obtenues après fitting par PROSECE des données issues du dosage de l'échantillon de Tancarville

(11/12/02) (figure IV.5). Avec une erreur moyenne sur le pH de 0.3%, cette modélisation apparaît correcte, malgré la faible teneur en COD (3.3 mg.l^{-1}), donc de MON, présent dans cet échantillon.

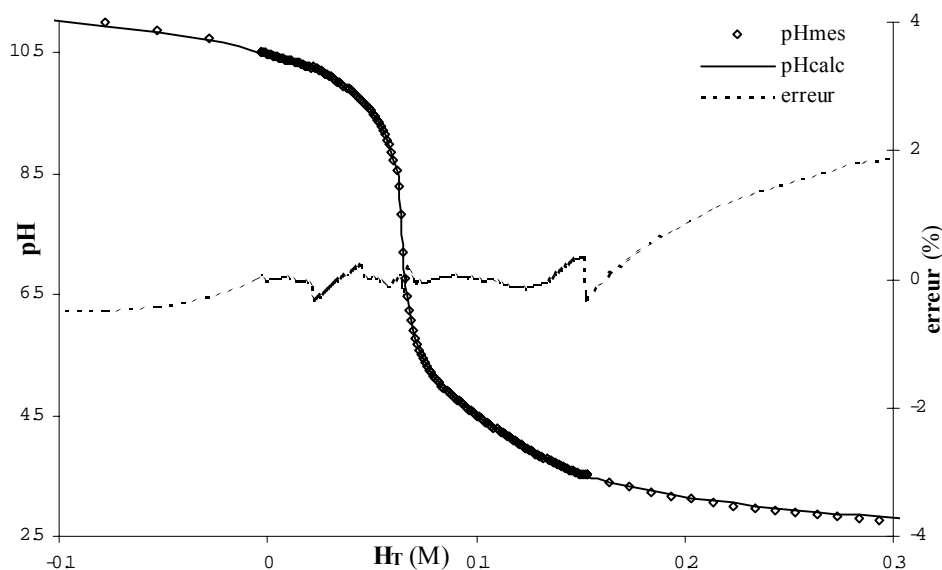


Figure IV.6: Fitting des données de la titration acido-basique de l'échantillon Tancarville (11/12/02) par un modèle à 6 quasi-particules

IV.B.4/ Résultats et discussion:

a/ Carbone organique:

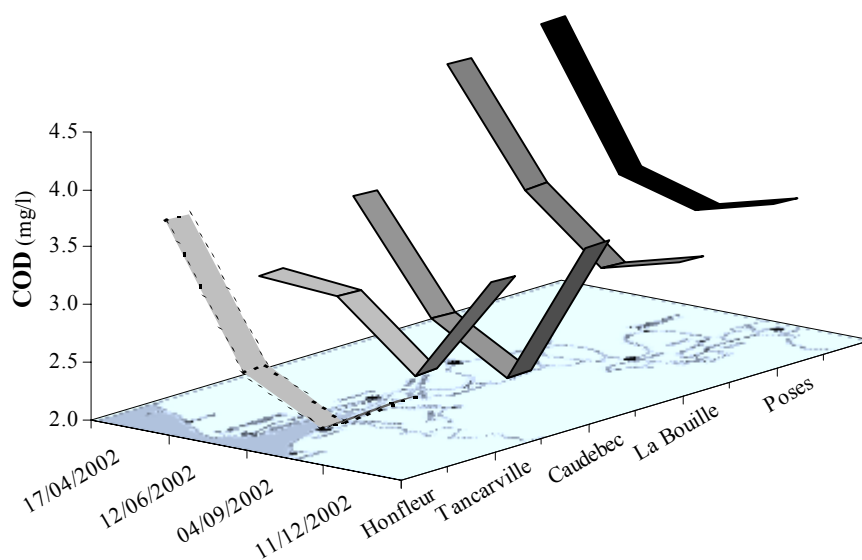


Figure IV.7: Variations des teneurs en COD

Les résultats des mesures de carbone organique dissous, pour les 4 campagnes réalisées en 2002 (17/04, 12/06, 04/09 et 11/12), sont représentés sur la figure IV.7. Une décroissance régulière du COD de l'amont vers l'aval est observable, seuls deux échantillons prélevés en hiver (Tancarville et Caudebec) ne suivent pas cette tendance. Cette tendance reflète probablement la dilution des eaux de la rivière qui ont pour autant subi des apports de MON telles que les rejets industriels ou agricoles (Baker, 2001). Les teneurs en COD observées à la station d'Honfleur, située dans l'estuaire, sont généralement systématiquement inférieures à celles observées pour les stations plus en amont. Ceci est la conséquence de phénomènes de

conglomération et de précipitation observés dans les estuaires, ainsi que d'une lyse des cellules accompagnant les changements de salinité (Saliot *et al.*, 2002). Les analyses de POC corroborent ce résultat puisqu'elles indiquent une augmentation significative du carbone organique particulaire aux stations de Honfleur et de Tancarville, quelque soit la période de l'année. Ces deux stations sont sous l'influence d'apports marins, et montrent une augmentation du gradient de salinité vers Honfleur.

Pour la période estivale, les valeurs de COD mesurées sur l'ensemble des stations sont plus faibles que celles obtenues pour les mois d'hiver. Bien que déjà observé en hiver et au printemps (Saliot *et al.*, 2002), ce phénomène est contradictoire avec les observations faites sur les autres grands fleuves et estuaires, pour lesquels les concentrations en COD sont plus élevées en été qu'en hiver (Cauwet *et al.*, 2002 ; Fukushima *et al.*, 2001). Les concentrations plus faibles détectées pendant la période estivale pourraient être reliées à une activité biologique consommant le COD, supérieure aux apports allochtones. De plus, il a été montré que la ville de Rouen, située entre les stations de Poses et La Bouille, n'influence pas la teneur en COD.

b/ Titration acido-basiques:

Tous les échantillons ont subi une titration acido-basique puis une modélisation des interactions MON-proton analysées par *PROSECE*. Les résultats obtenus (tableau IV.3) sont présentés sur la figure IV.8, en termes de concentrations optimisées en sites de type carboxylique (i.e. somme des concentrations L_{iT} des *quasi-particules* de $pK_{H,i}$ comprise entre 4 et 7) et de type phénolique (i.e. somme des concentrations L_{iT} des *quasi-particules* de $pK_{H,i}$ comprise entre 9 et 12). Ces informations n'ont pu être acquises pour la station d'Honfleur. En effet, la formation systématique d'un gel blanc à la surface de l'électrode a rendu impossible une analyse correcte des échantillons collectés. La nature de ce gel, également observé sur des échantillons prélevés dans la rade de Toulon, sera discutée ultérieurement.

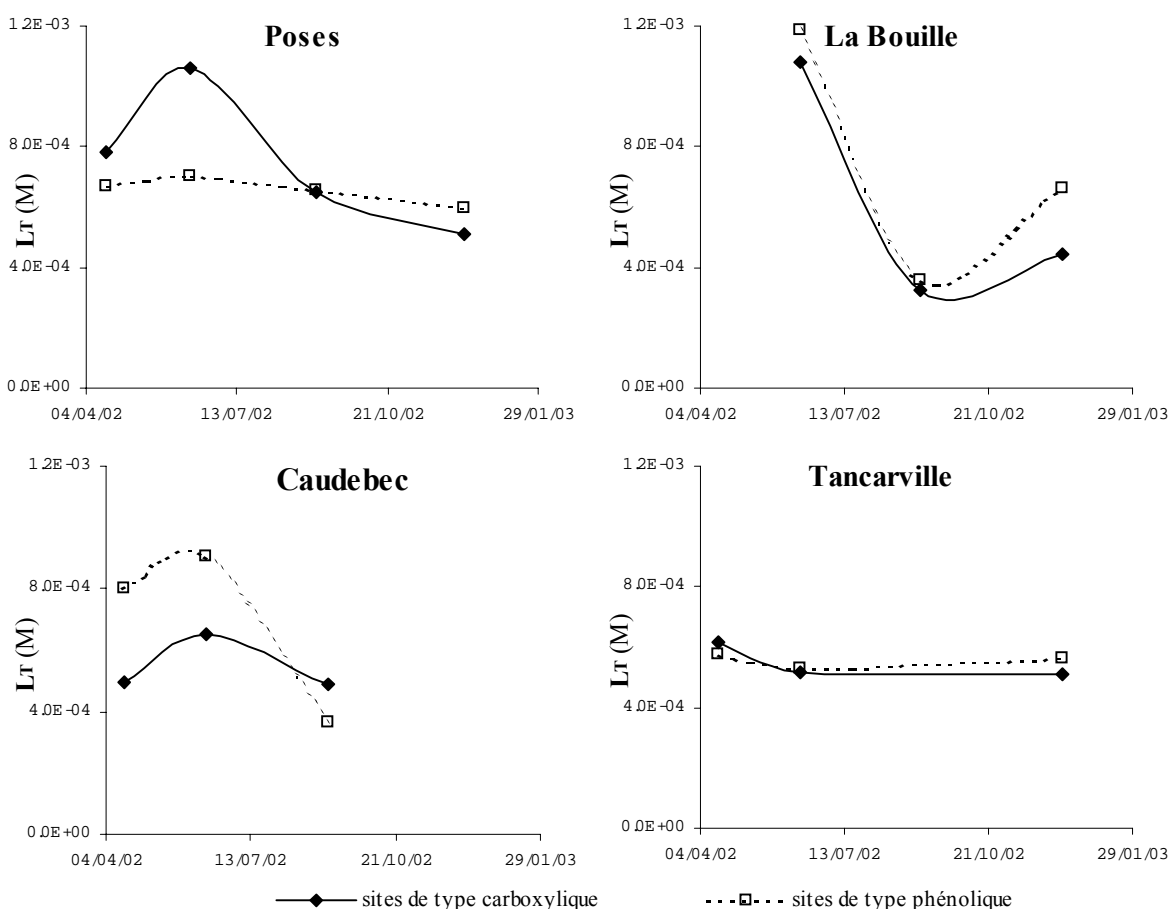


Figure IV.8: Variations des concentrations en sites de types carboxylique et phénolique

Les ratios carboxylique/phénolique obtenus, répartis entre 0.27 et 1.15 (valeur moyenne de 0.83), sont en accord avec les valeurs détectées pour des acides fulviques et humiques standards par Ritchie *et al.* (2003), ou pour des MON extraites par de Souza Sierra *et al.* (2001) et Milne *et al.* (2001).

La variabilité importante des valeurs observées souligne la grande hétérogénéité des MON analysées. Les trois stations entre Poses et Caudebec montrent des concentrations en sites acides supérieures à la concentration moyenne, qui est de 5×10^{-4} M (Tancarville). Une grande variation de ces valeurs est observée pour ces trois sites en juin 2002. Poses, située en amont de Rouen, montre une augmentation importante en sites carboxyliques (figure IV.8 Poses). Les résultats observés à La Bouille, donc en aval de Rouen, sont contraires à cette observation. A Caudebec, les concentrations observées en sites de type phénolique sont supérieures à celles en sites carboxylique. Ensuite, les deux types de sites acides atteignent la même concentration.

On peut suspecter que cet effet, inversant le rapport carboxylique/phénolique, est dû à l'influence de la ville de Rouen. En effet, les composés présentant des concentrations fortes en sites phénoliques sont considérés comme ayant une origine anthropique ou terrigène (Letizia et Gnudi, 1999). Les eaux de ruissellement et d'égouts ont donc un effet sur les propriétés des sites acides analysés, alors que la teneur en COD n'apparaît pas modifiée. La nature de la MON (mais pas sa concentration) semble donc être modifiée par l'influence de l'agglomération urbaine. Cette hypothèse est supportée par les résultats obtenus sur les autres campagnes, qui ne sont pas complets mais qui montrent la même tendance.

Tancarville, située en aval du Havre, ne montre aucune variation significative des concentrations en sites carboxylique et phénolique au cours des quatre campagnes réalisées (figure IV.8 Tancarville). Cette stabilité apparente n'est pas reliée à la teneur en COD (figure IV.7), plus faible en période estivale, ce qui souligne la présence d'une MON présentant une densité en sites acides plus élevée. Ceci semble être la caractéristique d'une MON juvénile, due à une activité biologique qui produirait une MON très réactive. Ce fait indique que le matériel organique présent en été est plus réactif que celui présent en hiver.

c/ Spectroscopie de fluorescence:

Afin de vérifier l'hypothèse formulée sur la production d'une MON récente en été, des analyses de fluorescence ont été effectuées. Des résultats précédents suggèrent que les acides humiques ont des longueurs d'onde d'excitation et d'émission plus élevées que celles des acides fulviques (Senesi *et al.*, 1991), en raison d'une augmentation du degré d'aromaticité, et donc de la proportion de groupes carboxyliques et de structures aromatiques poly-condensées et conjuguées. Le groupe de fluorophores dit "de type C" (Mounier *et al.*, 1999b), représentant des structures de type humique, présente un maximum de fluorescence à: $\lambda_{ex} = 320-350$ nm / $\lambda_{em} = 420-450$ nm. Au contraire, le maximum de fluorescence observé dans la zone: $\lambda_{ex} = 230-260$ nm / $\lambda_{em} = 420-450$ nm, est habituellement attribué à un groupe de fluorophores dit "de type A", représentant des structures de type fulvique. Le rapport $R_{a,c}$ de ces deux intensités de fluorescence mesurées à 250 nm (A) et 325 nm (C), est donc un indicateur de la composition de la MON analysée en composés de types fulvique et humique, mais aussi une information sur sa maturité. Ainsi, une augmentation de la proportion en acides humiques, décrite par un rapport $R_{a,c}$ faible, indique un stade de maturation avancé, et donc aussi un accroissement de la taille du matériel organique (Patel *et al.*, 2002). Les résultats obtenus (tableau IV.3) sont résumés dans les figures IV.9 et IV.10.

Le rapport $R_{a,c}$ est soumis à des variations spatio-temporelles sur le fleuve (figure IV.9). Les résultats démontrent qu'il y a une influence importante de la période d'échantillonnage. Ainsi, le rapport $R_{a,c}$ augmente durant la période estivale (entre juin et septembre) alors que les plus

faibles valeurs de $R_{a,c}$ sont observées en hiver (décembre à avril). Au contraire, la teneur en COD suit une tendance inverse durant les mêmes périodes (figure IV.7). Ceci corrobore l'hypothèse d'une activité biologique intensive en été, produisant une MON juvénile. De plus, il a été montré que les radiations UV-B en été ont un effet sur la distribution de taille de la MON, mais pas sur la teneur en COD (Lepane *et al.*, 2003). Ce phénomène peut sans doute expliquer en partie l'augmentation du rapport $R_{a,c}$ durant l'été. L'évolution spatiale du rapport $R_{a,c}$ le long du fleuve est visible sur la figure IV.9. Alors que l'activité biologique semble être à son maximum en été, pour tous les points échantillonnés, son amplitude est assez différente. L'activité biologique maximale est observée aux stations de Poses et de Honfleur, puisque les valeurs de $R_{a,c}$ mesurées y sont systématiquement supérieures. Ceci laisse supposer qu'une activité biologique influence l'écosystème du fleuve, d'origine marine dans la zone de mélange qu'est l'estuaire (Honfleur), et d'origine terrigène à Poses.

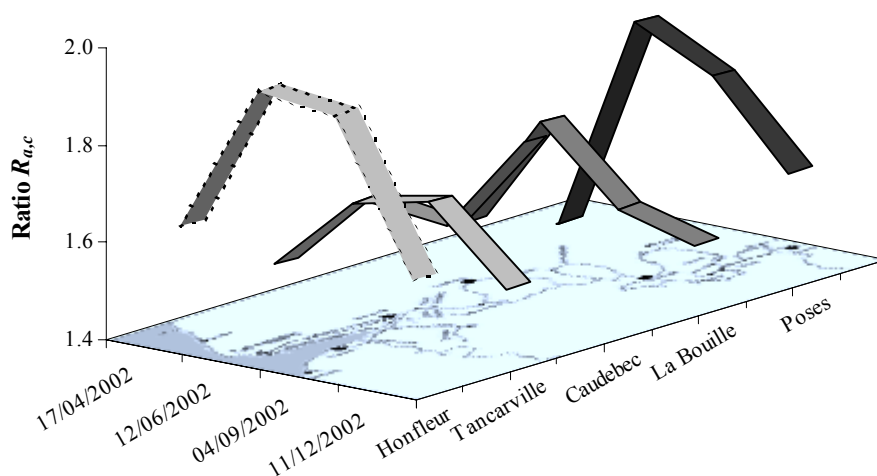


Figure IV.9: Variations spatio-temporelles des rapports de fluorescence $R_{a,c}$

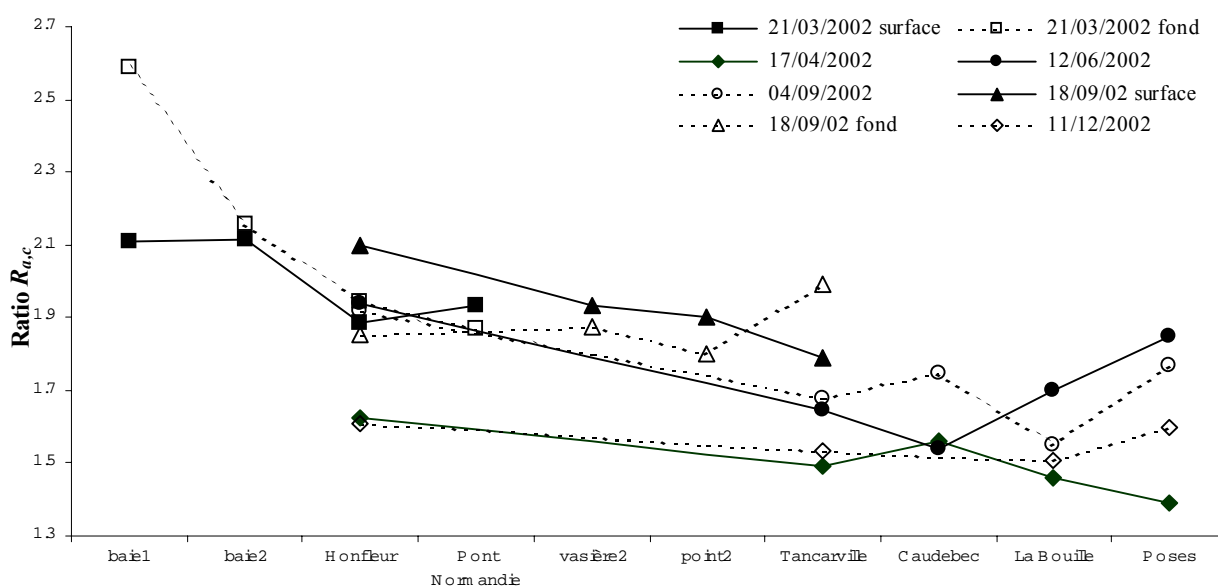


Figure IV.10: Distribution des rapports de fluorescence $R_{a,c}$ mesurés pour toutes les prélèvements

Afin d'obtenir des informations supplémentaires dans la zone de mélange de La Seine, influencée par les apports marins, deux campagnes supplémentaires ont été réalisées. Les résultats des mesures de fluorescence sont représentées par la figure IV.10. Une augmentation

générale du rapport $R_{a,c}$ est observée le long du gradient de salinité. Ce phénomène semble plus influent que la dépendance temporelle notée. Il est en contradiction avec l'hypothèse non-véifiée d'un vieillissement du matériel organique lors de sa circulation dans le fleuve vers la mer. A côté d'une importante production de MON le long du fleuve, il est évident qu'il y a des mécanismes de transformation des fluorophores de la MON. En particulier, on peut supposer un effet de précipitation dans l'estuaire, favorisant la proportion d'acides de type fulviques en solution ($R_{a,c}$ élevé). En prenant en compte les variations observées de la teneur en COD (figure IV.7), la transformation de structures de type humique semble supérieure à l'altération des structures de type fulvique. Ceci expliquerait l'accroissement du rapport $R_{a,c}$ parallèlement à une diminution de la concentration en COD.

d/ Chlorophylle a et phaeo-pigments:

Il a été montré que les pigments de plantes sont de bons bio-marqueurs du carbone organique dans les écosystèmes estuariens (Bianchi *et al.*, 2002). Alors que la chlorophylle *a* n'est pas spécifique à une classe d'organismes, les phaeo-pigments sont la signature des produits de dégradation du phytoplancton, résultante de leur broutage par du zooplancton ou d'autres types de mortalité (par exemple la lyse des cellules par les bactéries). Pour cette raison, les données présentées sur la graphique IV.11, obtenues par la Cellule Anti-Pollution en avril et juin 2002, vont être comparées aux résultats déterminés précédemment.

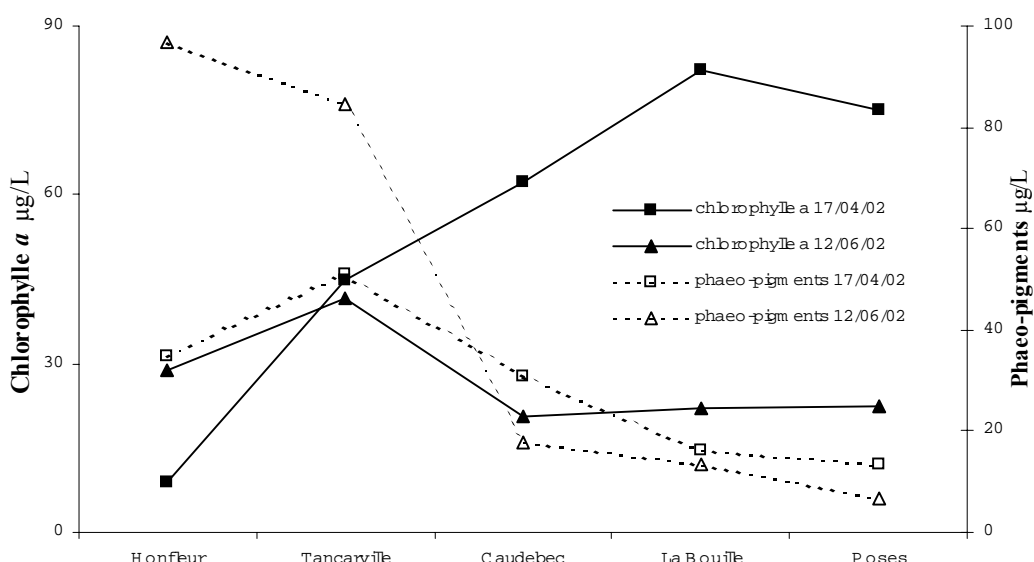


Figure IV.11: Variations des concentrations en chlorophylle *a* et en phaeo-pigments d'avril à juin le long de La Seine

Les concentrations en chlorophylle *a* en avril sont très fortes, et montrent une nette corrélation inverse avec le gradient de salinité, avec une augmentation forte à partir de Caudebec. Ceci est dû au fait que le phytoplancton d'eau douce produit est tué lors de l'augmentation de la salinité (Uncles *et al.*, 1998). Ainsi, le bloom d'avril n'apparaît pas à Honfleur, station plus influencée par la salinité et la turbidité (Irigoiien et Castel, 1998). Il est à noter que les résultats des analyses de COD (figure IV.7) suivent la même tendance que la concentration en chlorophylle *a*, décroissante d'avril à juin. Une proportion importante du carbone présent dans les eaux de surface est fixé au phytoplancton lors de la photosynthèse, et ce carbone peut ensuite être relargué sous forme de MON riches en carbohydrates durant les épisodes de bloom (Biersmith et Benner, 1998 ; Fajon *et al.*, 1999). Par conséquent, une diminution de la population phytoplanctonique peut être une explication de la diminution générale du COD observée d'avril à juin (figure IV.12). Comme le nouveau matériel organique est riche en carbohydrates, donc peu fluorescent, le délai avant la détection d'une augmentation

du rapport $R_{a,c}$ visible en juin indiquant une MON juvénile, est probablement dû à un processus de transformation par les bactéries de cette MON en matériel organique plus fluorescent. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse des variations des concentrations en phaeo-pigments (figure IV.11). En effet, que ce soit en avril ou en juin, leurs concentrations sont plus fortes en aval qu'en amont. Ceci souligne la mortalité du phytoplancton lorsque la salinité augmente. Cette mortalité s'accompagne d'une précipitation du COD sous forme de POC (Saliot *et al.*, 2002), visible par l'augmentation nette de la teneur en POC en aval (figure IV.12). De plus, comme pour la fluorescence, le maximum de concentration en phaeo-pigments est observé en juin, i.e. décalé dans le temps par rapport au bloom d'avril. Ceci supporte l'idée d'une activité bactérienne forte en période estivale, produisant par transformation du matériel organique présent, une MON identifiée comme juvénile ($R_{a,c}$ fort, donc tailles des macro-molécules faibles) et nettement plus réactive (densité en sites acides élevées).

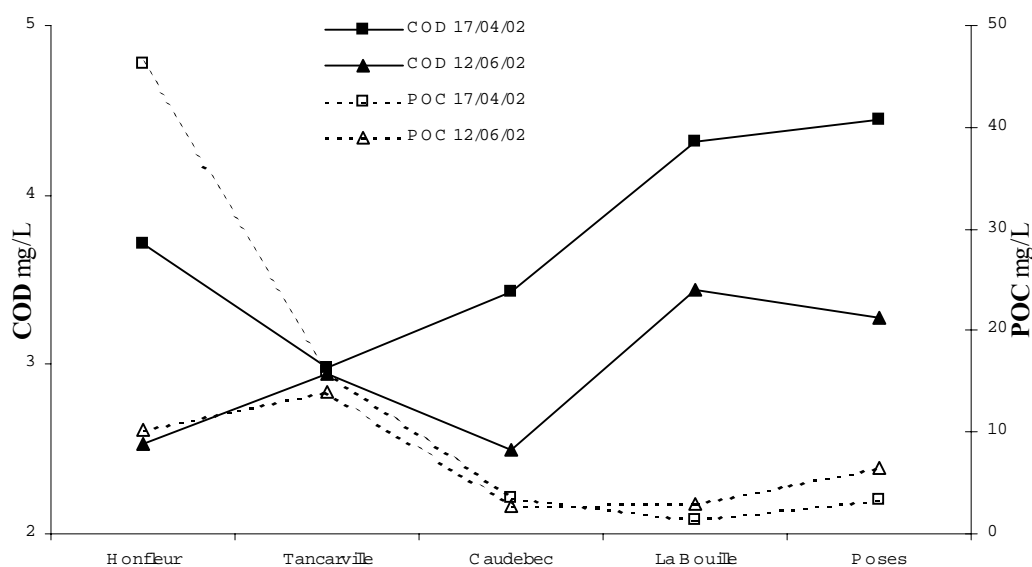


Figure IV.12: Variations des concentrations en COD et POC d'avril à juin le long de La Seine

e/ Modélisation des propriétés d'acidité:

Afin d'obtenir plus d'informations sur les modifications des MON le long du fleuve, une étude détaillée des sites acides a été menée. Cette analyse quantitative a été réalisée par la modélisation du comportement de la MON vis-à-vis du proton par le biais d'une distribution de sites acides définie à l'aide de 6 *quasi-particules*, chacune caractérisée par une constante d'acidité (pK_{Hi}) et une concentration (L_{iT}). Afin d'illustrer ces résultats, les concentrations en sites acides obtenues (tableau IV.3), distinguées en 3 *quasi-particules* de type carboxylique (notées Ca1, Ca2 et Ca3) et 3 *quasi-particules* de type phénolique (notées Ph1, Ph2 et Ph3), sont représentées sous la forme de graphiques radars (figure IV.13). Chaque axe décrit la concentration d'une *quasi-particule*. Sur la figure IV.13 les résultats de ces modélisations sont représentés pour quatre stations au cours des quatre campagnes. Dans leur globalité, ces résultats montrent la complexité de la dépendance spatio-temporelle des variations observées concernant les interactions MON-proton.

L'analyse temporelle de chaque prélèvement révèle à Poses une dépendance claire de la répartition en sites acides à la période d'échantillonnage (figure IV.13, ligne A). En avril, le site acide le plus fort (Ca1) n'est pas représenté (figure IV.13, A-I) mais apparaît en juin (figure IV.13, A-II) puis ne contribue que très peu à l'acidité totale le reste de l'année. Les sites acides Ca2 et Ca3 sont présent à Poses toute l'année, diminuant en décembre (figure IV.13, ligne A). Ces variations sont sans doute reliées à des modifications de l'activité biologique. Au contraire,

la répartition en sites phénoliques (Ph1, Ph2 et Ph3) ne montre pas de variations significatives à Poses pour l'année étudiée (figure IV.13, ligne A).

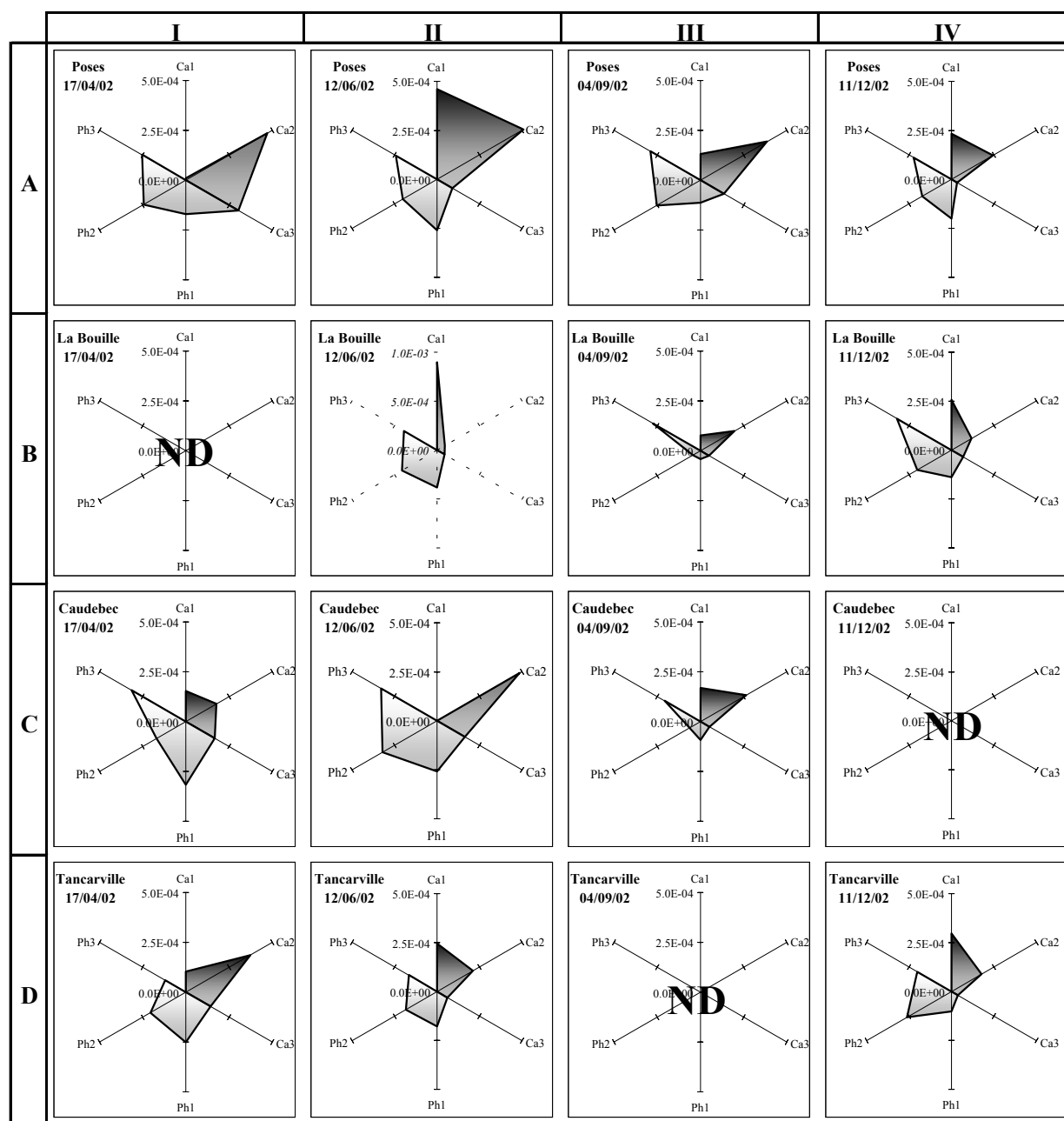


Figure IV.13: Résultats de la modélisation des sites acides des échantillons de quatre stations, représentés sous forme de graphiques radar afin d'exprimer les concentrations L_{iT} des 6 quasi-particules, réparties en type carboxylique (Ca1, Ca2 et Ca3) et phénolique (Ph1, Ph2 et Ph3) dans l'ordre croissant de $pK_{H,i}$.

A la station de prélèvement de La Bouille (figure IV.13, ligne B), située en aval de Rouen, un signal fort en Ca1 est détecté à nouveau en Juin, avec une participation plus faible des deux autres sites de type carboxylique (figure IV.13, B-II). Il est de plus à noter que les concentrations de tous les sites sont faibles en septembre (figure IV.13, B-III). Le résultat le plus remarquable pour cette station est la variation forte de la distribution en sites de type phénoliques. Alors que les concentrations en sites Ph1 et Ph2 sont très faibles en septembre (figure IV.13, B-III), elles augmentent significativement en décembre (figure IV.13, B-IV). A cette station, un signal biologique (exprimé par les sites de type carboxylique) est sans doute superposé à des apports anthropiques irréguliers. Ils sont probablement dus à la présence de la ville de Rouen, qui introduit des eaux d'égouts possédant une signature en sites acides phénoliques marquée.

A Caudebec (figure IV.13, ligne C), une proportion importante des trois sites de type phénolique et une équipartition des sites acides de type carboxylique sont observables en Avril (figure IV.13, C-I). En juin, un déplacement des propriétés d'acidité de Ca1 vers Ca2 est observé (figure IV.13, C-II), qui pourrait indiquer une transformation de la MON étudiée dans cette période. Comme pour les deux autres stations déjà étudiées, les concentrations en sites acides diminuent en septembre.

Pour le prélèvement d'avril effectué à Tancarville (figure IV.13, D-I), la différence majeure par rapport aux autres stations est la dominance du type Ca2. Comme pour Poses (figure IV.13, ligne A), les sites de type phénoliques sont présent tout au long de l'année (au moins pour les trois prélèvements analysés). Pour Tancarville, une variation saisonnière de ces sites est observable, atteignant le même niveau qu'à Poses en Décembre (figure IV.13, D-IV). Cette variation est plus faible que celle observée à La Bouille mais indique une transformation du matériel organique étudié.

L'analyse spatiale de ces résultats montre en avril une modification intéressante des concentrations en sites acides de type Ca2 (figure IV.13, colonne I). Ce type de sites disparaît presque à Caudebec pour réapparaître à Tancarville. En juin (figure IV.13, colonne II), les sites de type Ca1 et Ca2 présentent les variations les plus évidentes. Le dernier disparaît à La Bouille (figure IV.13, B-I) pour réapparaître à Caudebec, alors que Ca1 disparaît totalement (figure IV.13, C-II). La campagne de septembre (figure IV.13, colonne III) est caractérisée par des concentrations faibles en sites, quelque soit le lieu de prélèvement. Durant cette période, les sites acides de type phénoliques présentent tout de même une variation importante de leur distribution. En décembre (figure IV.13, colonne IV), peu de variations sont observables.

Cette analyse de la distribution des sites acides, définis pour représenter les propriétés des MON analysées, montre leur extrême variabilité, même lorsque la répartition carboxylique/phénolique semble constante durant l'année échantillonnée (Tancarville, figure IV.8). C'est donc un outil permettant de suivre les propriétés de la MON, et d'estimer notamment ses origines, ses transformations ainsi que les apports qui peuvent la modifier le long du fleuve et au cours de l'année.

IV.B.5/ Conclusions:

Le principal objectif de cette étude était de caractériser les modifications des propriétés de la MON sur La Seine durant l'année 2002, aussi bien spatialement que temporellement.

La concentration en carbone organique dissous, indiquant la quantité de MON, décroît d'amont en aval. Ce résultat est globalement indépendant de la période d'échantillonnage, ce qui était prévisible.

Par des analyses de spectroscopie de fluorescence 3D et de propriétés d'acidité, il a été prouvé que la MON étudiée subissait d'importantes modifications au cours de l'année. Ainsi, durant la période estivale, lorsque l'activité biologique est à son maximum, le matériel organique semble être ingéré et transformé par les organismes vivants, notamment les bactéries. Une nouvelle MON, plus réactive, est produite, possédant des propriétés de fluorescence et d'acidité différentes. Les caractéristiques de cette MON juvénile ($R_{a,c}$ et densité en sites) sont en effet distinctes de celles observées en hiver. Comme ce matériel organique est peu aromatique (rapport $R_{a,c}$ élevé), et riche en sites acides, il est sans doute nettement plus réactif vis-à-vis des micro-polluants. Les apports anthropiques de l'agglomération rouennaise se signalent par une modification importante de la quantité et de la qualité des sites acides analysés, mais pas de la quantité globale de la MON ni de ses propriétés de fluorescence. La proportion en sites de type phénolique augmente significativement.

Comme il est bien connu que le nombre de sites acides présents sur une MON est relié au nombre de sites complexant effectivement les métaux traces (Buffle, 1988), la MON présente

dans le fleuve a certainement une influence forte sur la spéciation et donc le transport de ces micro-polluants vers l'estuaire. Les différences entre les prélèvements d'été et d'hiver sont importantes et sûrement reliées à l'activité biologique, ce qui laisse penser à une réactivité très différente vis-à-vis des éléments trace au cours de l'année.

Ces résultats soulignent l'importance d'améliorer la compréhension des transformations de la MON et des mécanismes responsables de la complexation ou de la mobilisation des métaux et des molécules organiques toxiques par la MON. Les techniques analytiques utilisées permettent, sans perturbation notable, d'analyser les propriétés des MON étudiées sans pré-traitement, ce qui semble préférable. La mesure du rapport $R_{a,c}$ couplée à la caractérisation des propriétés d'acidité donnent une indication de la maturité et de la réactivité de la MON, mais également des apports et des transformations qu'elle subit au cours du fleuve.

Cependant, pour compléter la caractérisation des propriétés de complexation de la MON, essayer de comprendre les mécanismes de transformations ainsi que de quantifier les apports, notamment anthropiques, il semble indispensable d'ajouter à ces analyses des techniques spécifiques aux propriétés de complexation (telles que les titrations logarithmiques avec mesure par DPASV), ainsi que d'accroître la fréquence d'échantillonnage aussi bien spatialement que temporellement. Nécessitant donc nettement plus de temps d'analyse et d'interprétation, c'est à cette seule condition qu'une qualification et une quantification correctes des propriétés de la MON pourront être faites. Elles devraient permettre d'aboutir à sa modélisation, paramétrable dans un logiciel de transport des contaminants métalliques en vue de comprendre son rôle vis-à-vis de leur spéciation et donc de leur impact dans l'écosystème étudié.

IV.C/ Influence de la teneur en carbone organique dissous sur la modélisation des propriétés d'acidité des matières organiques naturelles:

Cette étude a fait l'objet de la rédaction d'une publication, parue en 2004 dans la revue *Water Research*, sous le titre: "Influence of dissolved organic carbon content on modelling natural organic matter acid-base properties", Cédric Garnier, Stéphane Mounier, Jean Yves Benaim, volume 38, pages 3685-3692. (Annexe **IV.2**).

IV.C.1/ Problématique:

Les propriétés acido-basiques d'une MON font partie des facteurs primordiaux influençant son pouvoir complexant vis-à-vis des métaux traces (Buffle, 1988; Christensen et Christensen, 2000; Perdue et Lytle, 1983; Ramos *et al.*, 2002; Robertson et Leckie, 1999; Smith et Kramer, 1999). L'ensemble des modélisations appliquées à la MON vise à définir la densité en sites de types carboxylique et phénolique (Christensen *et al.*, 1998; de Souza Sierra *et al.*, 2001; Lu et Allen, 2002; Masini *et al.*, 1998; Milne *et al.*, 2001; Ritchie et Perdue, 2003). En effet, le suivi des modifications du ratio carboxylique/phénolique permet de tracer la variabilité des propriétés de la MON, ainsi que d'estimer son origine (**IV.B**). Il a ainsi été montré que la MON d'origine anthropique ou terrigène avait un caractère phénolique plus marqué (Letizia et Gnudi, 1999). De même, les extractions et/ou séparations de MON en acides fulviques (AF) et humiques (AH) ont montré des différences récurrentes entre ces deux types de MO extraites, aussi bien en terme de densité de sites que de ratios carboxylique/phénolique (de Souza Sierra *et al.*, 2001; Milne *et al.*, 2001; Ritchie et Perdue, 2003).

Une majorité d'études portant sur la caractérisation des propriétés acido-basiques de MON, ont été réalisées sur des MO extraites à partir de différents protocoles expérimentaux (protocole IHSS, ultra-filtration, évaporation, résine XAD-8, osmose inverse...) comme par exemple pour les MON standard de l'IHSS (Kinniburgh *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 1998; de Souza Sierra

et al., 2001; Lu et Allen, 2002; Masini *et al.*, 1998; Ritchie et Perdue, 2003; Takács *et al.*, 1999). Les expériences consistent en des titrations alcalimétriques et acidimétriques de solutions de ces MON extraites, qui sont souvent effectuées à de fortes teneurs en carbone organique dissous (40 mg.l⁻¹ à plus de 1000 mg.l⁻¹ de COD), très différentes des concentrations d'échantillons naturels (0.1 mg.l⁻¹ à 10 mg.l⁻¹) obtenues pour des eaux peu eutrophisées (Mounier *et al.*, 1999a). Outre les éventuelles modifications de propriétés que peuvent entraîner ces processus de pré-concentration/extraction (Zsolnay, 2003), il semble intéressant de savoir s'il est possible de caractériser le comportement de MON vis-à-vis du proton, à des concentrations plus faibles, voire directement à des teneurs en COD naturelles, sans pré-concentration, et ceci en minimisant d'éventuelles erreurs.

L'objectif de ce travail est donc d'analyser l'effet de la concentration en COD sur la capacité à déterminer les propriétés de la MON par un modèle discret multi-sites, utilisant le logiciel *PROSECE (II.D.2/)*. Ainsi, des titrations potentiométriques ont été réalisées sur des solutions d'acides fulvique et humique Laurentian River (AFLR et AHLR) à différentes concentrations (100 à 2 mg.l⁻¹ de COD). Cette étude a consisté à estimer l'effet de la teneur en COD sur l'évolution du rapport carboxylique/phénolique, en général, et plus précisément sur les paramètres de complexation des sites définis. De plus, différents prélèvements effectués sur La Seine (**IV.B/**), ont été analysés sans traitement de pré-concentration/extraction (i.e. 2.1 à 7.5 mg.l⁻¹ de COD), afin d'observer d'éventuelles différences de comportement entre ces MON et les AF et AH extraits. Enfin, ce travail a été complété par des titrations potentiométriques réalisées sur des mélanges modèles d'acétate de sodium et de phénol, à des concentrations proches des proportions en sites de types carboxylique et phénolique déterminées pour les solutions d'AFLR et AHLR, afin de prévenir les interférences dues à la complexité structurale de la MON.

IV.C.2/ Expériences:

a/ Matières organiques naturelles et réactifs:

A partir de solutions mères d'AFLR et d'AHLR, respectivement à 226.8 et 205.0 mg.l⁻¹ en MO (i.e. 117.9 mg.l⁻¹ et 106.6 mg.l⁻¹ de COD), des solutions diluées de ces MO extraites ont été réalisées, suivant différents facteurs de dilution: 2, 10, 20 et 50.

Les échantillons de MON sont issus de prélèvement effectués sur La Seine, dans le cadre du programme de recherche Seine-Aval 2. Ils sont issus de différentes campagnes, réalisées au courant de l'année 2002, systématiquement sur 5 sites d'amont en aval nommés Poses, La Bouille, Caudebec, Tancarville et Honfleur ; ainsi que de deux missions sur des sites de salinité plus fortes en surface et au fond, soit un total de 17 échantillons. L'ensemble de ces échantillons a déjà fait l'objet d'une étude plus détaillée au chapitre **IV.B/**.

Une solution modèle d'acétate de sodium (10.14 mM, à partir de CH₃COONa Labosi analypur) et de phénol (9.91 mM, à partir de phénol Merck pour analyse), a été diluée avant analyse suivant des facteurs de dilution : 2, 5, 10, 20, 50, 100 et 200.

La force ionique des solutions d'AFLR, d'AHLR et d'acétate de sodium-phénol a été maintenue à 0.10 M par ajouts de NaNO₃. Toutes les solutions sont stockées à 4°C dans le noir.

b/ Titration potentiométriques:

Le protocole expérimental utilisé pour analyser les interactions MON-proton, est le même que celui détaillé au chapitre **IV.B.3.c/**. Contrairement aux échantillons issus des prélèvements réalisés sur La Seine, 50 ml de solutions d'AFLR, d'AHLR ou de solutions modèles ont été titrés, les volumes de solutions standards de KOH et HNO₃ ajoutés ont donc été ajustés pour

correctement définir les courbes de titrations acido-basiques (III.D.1/). Le traitement des courbes de titrations obtenues est identique à celui explicité au chapitre IV.B.3.d/.

c/ Modélisation des données expérimentales: PROSECE

Dans cette étude, le modèle utilisé pour appréhender les propriétés d'acidité des matières organiques naturelles et extraites est basé sur la définition d'une distribution discrète des sites acides, caractérisés par des constantes d'acidité ($pK_{H,i}$) et des concentrations (L_{iT}) qui doivent être déterminés. Les valeurs de ces dernières ont été optimisées par fitting des courbes expérimentales, à l'aide du logiciel PROSECE (IV.B.3.d/).

La modélisation du comportement des MON vis-à-vis du proton a souvent été faite en utilisant un set de sites acides. Le nombre de sites définis varie suivant le type de MON analysée et le programme d'optimisation utilisé. Ainsi, de Souza Sierra *et al.* (2001) ont fitté les courbes de titrations acido-basiques de MON extraites par 2 sites (un carboxylique et un phénolique), Takács *et al.* (1999) par 3 sites, Lu *et al.* (2002) par 4 sites et Masini *et al.* (1998) ont atteint 6 sites différents. Smith *et al.* (1999), utilisant un modèle un peu différent (DISI), définissent 4 groupes de sites, suivant les valeurs de pKa obtenues.

Compte tenu de ces différences, la première étape de cette étude, a donc consisté à optimiser le nombre de sites conduisant à la meilleure modélisation des expériences, à partir du système chimique le plus simple possible.

IV.C.3/ Résultats et discussion:

a/ Titration des solutions concentrées d'AFLR et AHLR:

La figure IV.14 représente les courbes expérimentales obtenues lors des titrations potentiométriques des solutions concentrées d'AFLR et AHLR. Comme prévu, ces courbes ne présentent pas de points d'équivalences bien définis, ce qui souligne la grande hétérogénéité des fonctions acides portées par ces MO. Au vu de la quantité de KOH nécessaire pour neutraliser l'ensemble des sites acides des ces deux MO, il semble évident que l'acide fulvique présente une densité plus forte en groupements acides que l'acide humique. Ces résultats sont comparables à ceux déterminés sur des MO standards par Milne *et al.* (2001) et Ritchie *et al.* (2003).

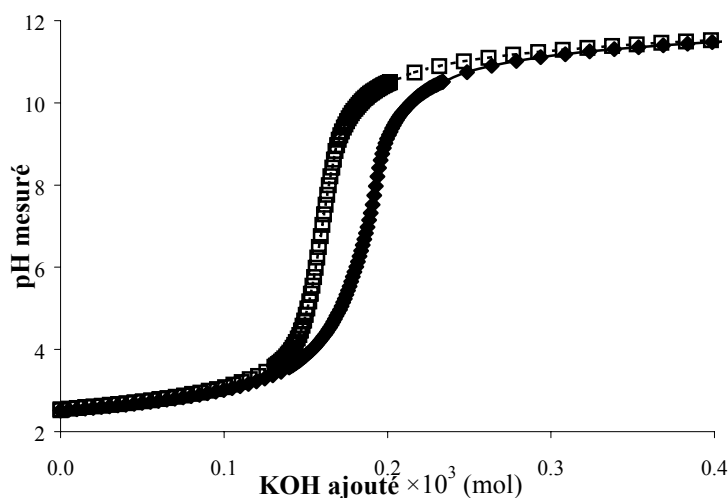


Figure IV.14: Courbes des titrations potentiométriques des solutions d'AFLR (◆) et AHLR (□)

Les titrations potentiométriques de l'AFLR et de l'AHLR ont été modélisées par des distributions discrètes de 2, 3, 4, 5, 6 et 7 sites différents, afin de déterminer le nombre de sites

discrets nécessaire à une modélisation correcte des courbes de titrations. Les erreurs sur les valeurs de pH, calculées à partir des différences entre les valeurs de pH expérimentales et optimisées par *PROSECE* (*bias*, eq. II.17), en fonction du nombre de sites définis sont présentés sur la figure IV.15. En accord avec ces résultats, une distribution discrète à 6 sites a été considérée pour les analyses des solutions d'AFLR, d'AHLR et de MON.

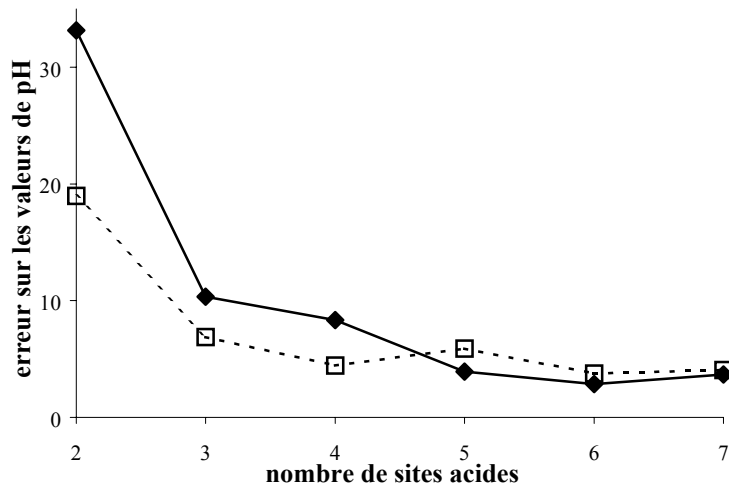


Figure IV.15: Evolution de l'erreur sur l'optimisation par *PROSECE* des titrations de l'AFLR (◆) et de l'AHLR (□), en fonction du nombre de sites acides définis

Pour l'AFLR et l'AHLR, ce modèle à 6 sites acides combiné à l'utilisation de *PROSECE* a permis d'optimiser les paramètres d'acidité (L_{iT} , $pK_{H,i}$) de 3 sites de type carboxylique et de 3 sites de type phénolique. Ceci corrobore donc les résultats de Masini *et al.* (1998). Les valeurs des paramètres d'acidité calculées sont listées dans le tableau IV.4. Les ratios carboxylique/phénolique obtenus, respectivement de 1.32 et 0.54 pour l'AFLR et l'AHLR, sont dans la gamme de ceux analysés par Ritchie *et al.* (2003), et montrent bien la différence de comportement vis-à-vis du proton entre un acide fulvique et un acide humique issus d'une même MON. Il est à remarquer que les densités en sites de type phénolique de l'AFLR et l'AHLR sont presque les mêmes (respectivement 2.55 et 2.49 meq.g⁻¹ MON), alors que la densité en sites de type carboxylique sur l'AFLR (3.37 meq.g⁻¹ MON) est 2.5 fois plus grande que celle de l'AHLR (1.34 meq.g⁻¹ MON). De plus, les valeurs de $pK_{H,i}$ obtenues pour l'AHLR sont systématiquement supérieures à celles de l'AFLR.

		1	2	3	4	5	6	carboxylique	phénolique
AFLR	L_{iT}	1.69	0.89	0.79	0.32	0.47	1.76	3.37	2.55
	$pK_{H,i}$	4.18	5.33	6.58	7.61	8.93	9.99		
AHLR	L_{iT}	0.72	0.40	0.22	0.55	0.55	1.39	1.34	2.49
	$pK_{H,i}$	4.71	5.90	6.67	7.74	9.2	10.08		

Tableau IV.4: Paramètres d'acidité ($pK_{H,i}$ et L_{iT} meq.g⁻¹ MON) des sites utilisés pour modéliser les titrations potentiométriques des solutions concentrées d'AFLR et AHLR

Pour ces titrations, les erreurs (*bias*, eq. II.17) minimisées par *PROSECE* sont respectivement de 2.86 et 3.76 pour l'AFLR et l'AHLR, pour ce modèle à 6 sites, ce qui correspond à des erreurs moyennes sur la gamme de valeurs de pH analysées de 0.29 % (ou 0.009 unité de pH) et 0.38% (ou 0.012 unité de pH). La modélisation de ces titrations est donc correcte.

b/ Titration des solutions diluées d'AFLR et AHLR:

Dans ce cas, les calculs *PROSECE* consistent à optimiser seulement les concentrations des 6 sites, ces derniers étant définis par les constantes d'acidité optimisées lors de la modélisation des solutions concentrées. Les concentrations en sites obtenues pour les titrations potentiométriques des solutions d'AFLR et AHLR suivant des facteurs de dilutions de 2, 10, 20 et 50 sont regroupés dans le tableau **IV.5**.

[MON] mg.l ⁻¹	L _{IT} meq.g ⁻¹ _{NOM}						carboxylique	phénolique	ratio
AFLR	1	2	3	4	5	6			
226.8	1.69	0.89	0.79	0.32	0.47	1.76	3.36	2.55	1.32
113.4	1.39	0.95	0.80	0.37	0.44	2.39	3.14	3.20	0.98
22.7	0.37	1.35	1.38	0.50	0.82	10.82	3.10	12.15	0.25
11.3	1.87	0.75	2.47	0.63	1.26	19.49	5.09	21.38	0.24
4.5	0.74	1.06	5.53	0.00	4.01	46.85	7.32	50.85	0.14

AHLR	1	2	3	4	5	6	carboxylique	phénolique	ratio
205.0	0.72	0.40	0.22	0.55	0.55	1.39	1.35	2.50	0.54
102.5	0.63	0.51	0.33	0.59	0.77	2.51	1.47	3.87	0.38
20.5	0.00	0.94	0.95	0.48	0.88	11.76	1.89	13.13	0.14
10.3	0.00	2.02	1.04	0.55	1.91	20.13	3.06	22.59	0.14
4.1	3.28	2.39	3.25	2.69	9.88	47.05	8.92	59.62	0.15

Tableau **IV.5**: Densités en sites optimisées pour les titrations potentiométriques des solutions diluées d'AFLR et AHLR

Les évolutions des densités en sites de type carboxylique et de type phénolique (meq.g_{MON}⁻¹) en fonction de la concentration en MON, i.e. de la quantité d'AFLR ou AHLR dans les solutions concentrées et diluées, sont présentées sur la figure **IV.16**. Théoriquement, il ne devrait y avoir aucune différence en terme de densités en sites lorsque la concentration en MON diminue, i.e. les résultats obtenus à 20 mg_{MON}.l⁻¹ devraient être comparables à ceux obtenus à 200 mg_{MON}.l⁻¹.

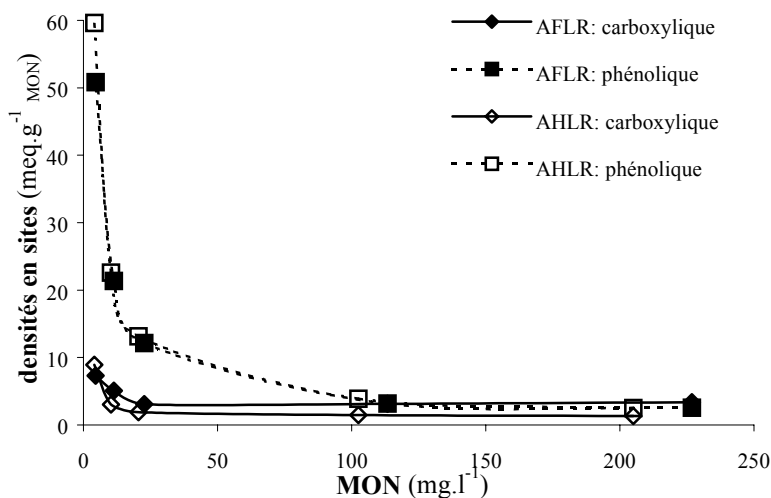


Figure **IV.16**: Densités en sites de type carboxylique et de type phénolique optimisées pour les solutions concentrées et diluées d'AFLR et AHLR

Concernant les sites de type carboxylique, jusqu'à un facteur de dilution de 10 correspondant respectivement à 22.7 and 20.5 mg.l⁻¹ d'AFLR et d'AHLR, la densité en sites est presque constante. En deçà, la densité en sites augmente nettement pour atteindre respectivement 7.32 meq.g_{AFLR}⁻¹ (+118 %) et 8.92 meq.g_{AHLR}⁻¹ (+563%).

Ce phénomène est largement amplifié pour les sites de type phénolique. En effet, pour les solutions diluées par un facteur 2 (i.e. 102.3 mg_{AFLR}.l⁻¹ et 92.5 mg_{AHLR}.l⁻¹), les densités en sites augmentent respectivement de 25 et 55%. Pour les facteurs de dilutions au dessus de 2, l'augmentation est nettement plus forte, la densité en sites atteignant ainsi 50.85 meq.g_{AFLR}⁻¹

(+1892%) et $59.62 \text{ meq.g}_{\text{AHLR}}^{-1}$ (+2288%). Ainsi, le ratio carboxylique/phénolique décroît, lorsque la concentration en MON décroît (Tableau IV.5) pour atteindre 0.14 et 0.15 respectivement pour les solutions d'AFLR et AHLR diluées par 50.

Une étude plus précise des variations des densités en chacun des sites montre une augmentation importante seulement pour le 3^{ème} site ($pK_{H,3} \sim 6.5$) et le 6^{ème} site ($pK_{H,6} \sim 10$), et dans le cas de la solutions la plus diluée, une augmentation pour presque tous les sites.

Donc, l'analyse des solutions diluées d'AFLR et AHLR a montré l'apparition d'une surestimation des concentrations en sites acides lorsque la concentrations en MON diminue. Ce phénomène, particulièrement notable pour les sites de type phénolique, conduit à des variations importantes des valeurs de ratio carboxylique/phénolique. Ainsi, Il semble assez difficile de correctement déterminer les propriétés d'acidité de MON extraite à faible teneur en COD (i.e. inférieure à 10 voir 50 mg.l^{-1} de COD), et donc, il semble impossible d'analyser des échantillons naturels qui ne sont pas au préalable traités par un protocole d'isolation de la MON.

c/ Titration des solutions modèles d'acétate de sodium et de phénol:

Afin de valider ou non les résultats obtenus sur les MO extraites et les MON, le protocole de titration/modélisation a été appliqué à une solution modèle d'acétate de sodium et de phénol. Donc, cette solution modèle a des propriétés acido-basiques similaires ($pK_{H,i}$, L_{iT}), sans les variations conformationnelles apparaissant probablement sur une matière organique naturelle. En effet, compte tenu du caractère hautement hétérogène en terme de structure et de réactivité des MO extraites et des MON étudiées, sensibles à beaucoup de facteurs physico-chimiques, il semble important de tester des simples et plus stables, dont les propriétés d'acidité sont définies par des constantes thermodynamiques connues.

Le calcul par PROSECE, pour la solution la plus concentrée, consiste à optimiser les paramètres d'acidité ($pK_{H,i}$, L_{iT}) de deux sites. Les constantes d'acidité calculées, respectivement de 4.66 et 9.98 pour l'acétate de sodium et le phénol, sont proches des valeurs thermodynamiques: 4.65 et 9.80 (Ringbom, 1967). De plus, les concentrations obtenues sont respectivement de 9.8 mM et 10.3 mM, donc assez proches des valeurs attendues (10.14 mM et 9.91 mM). La modélisation par PROSECE de ces données expérimentales apparaît correcte.

Les titrations des solutions modèles diluées ont été fittées par PROSECE, en utilisant les valeurs des constantes d'acidité déterminées pour la solution concentrée, et en optimisant les concentrations des deux sites. Le tableau IV.6 regroupe les concentrations d'acétate et de phénol obtenues.

solution	facteur	Acétate meq		Phénol meq		ratio	
		calculée	attendue	calculée	attendue	calculée	attendue
concentrée		0.490	0.507	0.517	0.498	0.95	1.02
diluée	2	0.249	0.254	0.271	0.249	0.92	1.02
diluée	5	0.101	0.101	0.120	0.100	0.84	1.02
diluée	10	0.053	0.051	0.066	0.050	0.81	1.02
diluée	20	0.030	0.025	0.041	0.025	0.73	1.02
diluée	50	0.016	0.010	0.027	0.010	0.60	1.02
diluée	100	0.009	0.005	0.028	0.005	0.28	1.02
diluée	200	0.005	0.003	0.018	0.002	0.29	1.02

Tableau IV.6: Concentrations calculées et attendues en acétate et phénol pour les solutions modèles

L'évolution des concentrations totales calculées en sites est présentée sur la figure IV.17 en fonction des concentrations totales attendues en sites, pour les solutions modèles comparées aux solutions d'AFLR et AHLR. Comme cela a été montré précédemment sur les solutions de MO extraites, la modélisation surestime les concentrations en sites acides pour les faibles teneur en MON, ce qui est prouvé par l'écart à la courbe théorique (figure IV.17, droite). De plus, les valeurs de ratio carboxylique/phénolique diminuent, jusqu'à atteindre 0.29 pour la solution modèle la plus diluée, au lieu d'une valeur attendue de 1.02 (Tableau IV.6).

En considérant ces résultats, il ne semble pas possible de correctement déterminer les propriétés d'acidité lorsque la concentration totale calculée en sites est en dessous de 0.04 meq (valeur approximative), qui peut être définie comme la limite pour une modélisation correcte (figure IV.17, rectangle pointillé).

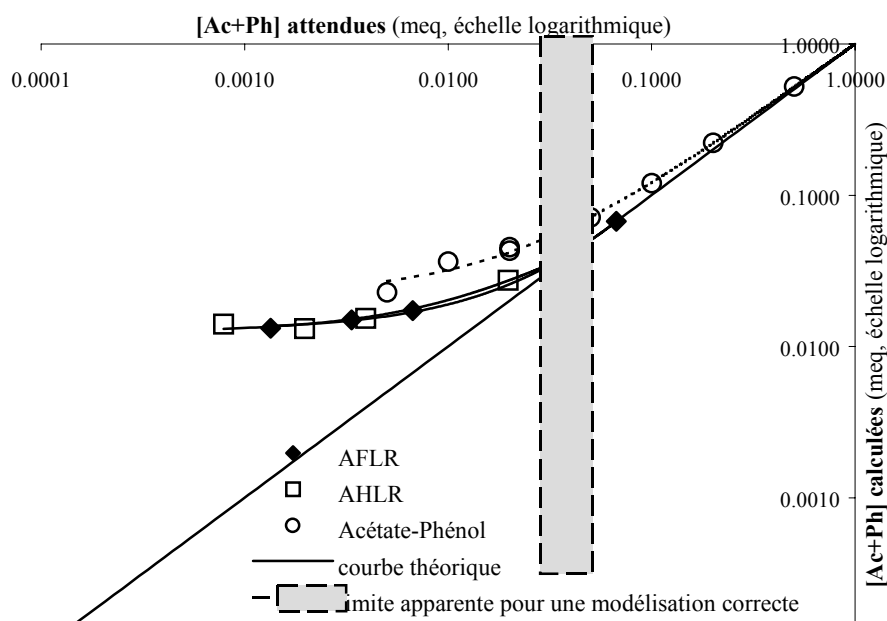


Figure IV.17: Concentrations totales calculées en sites en fonction des concentrations totales attendues pour les solutions modèles et de MO extraites

Ainsi, le phénomène consistant en une augmentation apparente des densités en sites lorsque la teneur en COD diminue, particulièrement prononcé pour les sites de type phénolique, semble être indépendant de la nature chimique des composés analysés. L'origine exacte de ce phénomène n'est pas encore déterminée. Ce phénomène pourrait être le résultat de perturbation/dysfonctionnement de l'électrode qui apparaîtrait aux pH basiques, cet effet étant amplifié lorsque la concentration en sites analysés est faible. En effet, il est évident que les électrodes sélectives ne sont pas linéaires sur une gamme infinie. A des concentrations en proton très faibles, comme celles à pH supérieur à 11, ce type de micro-électrode pourrait être perturbé, et donc induire un signal incorrect, interprété par le logiciel d'optimisation comme un signal phénolique. Dans la même idée, la non-linéarité à pH acide (inférieur à 3), pourrait conduire à un signal carboxylique incorrect. Cependant, les propriétés acido-basiques de l'AFLR obtenus par modélisation des titrations des solutions d'AFLR concentrée et diluées sur différentes gamme de pH (2.5-11.5, 3-11, 3.5-10.5 et 4-10), ont étonnamment montré qu'il était préférable de modéliser la plus large gamme de pH pour minimiser ce phénomène, et non pas de se limiter à une petite gamme de pH. L'utilisation d'une micro-électrode de RHOSS pourrait peut être atténuer ce phénomène, ce qui n'a pu être testé par faute de temps. La seule certitude est qu'il n'est ni dû à une variation de force ionique, puisqu'elle est contrôlée au cours des titrations potentiométriques, ni à aucun effet conformationnel puisque le déplacement du ratio carboxylique/phénolique observé apparaît également pour des molécules de structure simple.

d/ Titration des échantillons naturels:

Au vue des résultats obtenus lors de la modélisation des titrations d'AFLR et AHLR par *PROSECE*, une distribution discrète basée sur 6 sites acides a été utilisée pour analyser les titrations potentiométriques des échantillons naturels prélevés sur La Seine. L'étude précise des résultats obtenus a été faite dans le chapitre IV.B/.

Les valeurs obtenues pour les ratios carboxylique/phénolique des 17 échantillons naturels atteignent une valeur moyenne de 0.83, qui est proche des valeurs déterminées pour des MON isolées, analysées à des teneurs en COD plus élevées (Christensen et Christensen, 2000; Kinniburgh *et al.*, 1999; Lu et Allen, 2002, Milne *et al.*, 2001). La gamme de valeurs calculées, s'étalant de 0.23 à 1.50, montre la grande hétérogénéité de comportement des MON étudiées. Toutes les concentrations totales calculées en sites sont comprises entre 0.077 et 0.255 meq (valeur moyenne de 0.149 meq). Lorsqu'elles sont comparées à la valeur limite précédemment définie à 0.04 meq, ces concentrations sont supérieures et donc attestent a priori de la faisabilité d'une étude d'échantillons naturels non-extraits.

IV.C.4/ Conclusions:

La détermination des propriétés d'acidité des MON, en particulier des proportions en sites de types carboxylique et phénolique, a été conduite par des titrations potentiométriques, modélisées par le biais d'une distribution discrète de sites. Les résultats obtenus sur l'AFLR et l'AHLR sont comparables à ceux calculés dans des études précédentes réalisées sur des MON extraites similaires. L'utilisation de *PROSECE* a permis l'optimisation des propriétés acido-basiques de 6 sites différents: 3 de type carboxylique et 3 de type phénolique, au regard de constantes d'acidité calculées. On peut noter que les densités en sites de type phénolique sont identiques pour l'AFLR et l'AHLR, alors que l'acide fulvique est 2.5 fois plus riche en sites de type carboxylique.

Ce travail a plus particulièrement permis de montrer que, pour des solutions diluées, il existe une valeur seuil pour une détermination sûre des concentrations en sites acides. En effet, l'analyse des solutions diluées d'AFLR et AHLR a montré l'apparition d'une surestimation des concentrations en sites acides, lorsque la concentration en MON diminue. Ce phénomène, particulièrement notable pour les sites de type phénolique, conduit à d'importantes variations des valeurs du ratio carboxylique/phénolique au cours de la dilution. De plus, l'analyse de solutions modèles d'acétate de sodium et de phénol, à différents facteurs de dilution, a confirmé ces résultats, i.e. une augmentation des densités en sites, notamment phénoliques, lorsque la dilution devient importante. La force ionique et les changements conformationnels ne semblent pas être responsables de cette augmentation de la densité en sites. Par conséquent, dans cette étude, la limite pour une modélisation correcte a été définie comme étant une concentration totale en sites acides de 0.04 meq.

L'analyse d'échantillons naturels prélevés sur La Seine, sans traitement de préconcentration ou d'extraction, a montré qu'une modélisation de MON non-concentrées était possible, même à des teneurs faibles en COD (valeur moyenne de 3.6 mg.l⁻¹), à cause des densités apparemment élevés en sites acides de ces échantillons. En effet, les valeurs de ratio carboxylique/phénolique obtenues sont proches de celles déterminées par Ritchie *et al.* (2003), et donc, ne semblent pas être perturbées par une densité élevée en sites acides de type phénolique comme celles obtenues pour l'AFLR et l'AHLR à des teneurs en COD comparables. En fait, les valeurs de densités en sites acides déterminées pour ces MO naturelles, sont beaucoup plus fortes que la limite définie, ce qui peut sans doute expliquer ce phénomène.

Ces résultats mettent en exergue le défi qu'est l'analyse correcte des propriétés d'acidité de solutions à faibles concentrations en carbone organique. Cependant, les analyses d'échantillons naturels prélevés sur La Seine, en différents sites et à différentes périodes, donc regroupant un ensemble de MON d'origines et de concentrations variées, a prouvé qu'il était possible de modéliser le comportement vis-à-vis du proton d'échantillons non-traités, à cause de leurs fortes teneurs en sites acides.

IV.D/ Evolution de PROSECE: adaptation au fitting de courbes de quenching de fluorescence:

IV.D.1/ Problématique:

Parmi les nombreuses propriétés physico-chimiques des matières organiques naturelles, leurs propriétés optiques et plus particulièrement de fluorescence peuvent être étudiées afin de caractériser ces MON. Ainsi, il a été montré que l'évolution du rapport de fluorescence $R_{a,c}$ pouvait être reliée à l'état de maturité des MON (IV.B/). L'étude des spectres 2D d'émission, d'excitation, et synchrones ou des matrices 3D émission-excitation peut ainsi être menée afin d'identifier les structures de composés organiques d'un échantillon. En effet, les MON sont constituées de groupements fonctionnels présentant des propriétés de fluorescence caractéristiques, nommés fluorophores, montrant des pics de fluorescence sur les spectres. L'intensité de fluorescence d'un fluorophore, pour une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission, est proportionnelle à sa concentration, suivant la loi de Beer-Lamber, caractérisé par un rendement quantique (ψ). Alors que les molécules de structure simples, telles que la tyrosine, conduisent à des spectres 2D ou 3D facilement analysables (un ou plusieurs pics identifiables), les spectres obtenus pour les MON sont nettement plus complexes. Leur interprétation l'est donc aussi. Par contre, compte tenu des améliorations techniques réalisées au cours des 10 dernières années, l'obtention de spectres de fluorescence est très rapide, souvent inférieure à la minute, même pour une matrice 3D. Ce type d'analyse peut donc être utilisé pour étudier un grand nombre d'échantillons (Mounier *et al.*, 1999a, 1999b).

De nombreux facteurs influencent l'intensité de fluorescence résultant de l'excitation d'une MON. Ils se signalent par une extinction ou au contraire une exaltation, voire un déplacement du pic de fluorescence. Ainsi, il a été montré que des ions, notamment le proton ou certains métaux paramagnétiques, possèdent un pouvoir d'extinction de fluorescence lorsqu'ils sont complexés par la MON (Patel *et al.*, 2002). En effet, le rendement quantique du complexe (MON-métal) est souvent inférieur à celui de la MON seule. Il est à noter que le rendement quantique du complexe est tout à fait indépendant de la valeur de la constante de complexation entre le fluorophore considéré et le métal. Ce phénomène d'extinction est appelé "quenching de fluorescence". Cette technique peut être utilisée pour étudier les propriétés de complexation ou d'acidité d'une MON, ou plus généralement de toute molécule possédant à la fois des propriétés de fluorescence et de complexation (Cao *et al.*, 2004 ; Esteves da Silva *et al.*, 2002 ; Smith et Kramer, 2000).

Par réciprocité, il n'est pas possible d'utiliser cette technique pour des molécules complexantes mais ne possédant pas de propriétés de fluorescence, telles que l'EDTA. Les groupements complexants d'une MON peuvent être distingués en 4 types suivant qu'ils sont:

- (α) complexants et fluorescents
- (β) complexants non-fluorescents
- (γ) non-complexants fluorescents
- (δ) non-complexants non-fluorescents

De ce fait, l'intensité de fluorescence d'une MON (I_{MON}) non-complexée résulte de la somme des intensités de fluorescences des groupes (α) et (γ), suivant l'équation:

$$I_{MON} = \sum_{i=1}^a I_i + \sum_{j=1}^c I_j = \sum_{i=1}^a \psi_{Li} \times [L_i] + \sum_{j=1}^c \psi_{Lj} \times [L_j] \quad (\text{eq. IV.4})$$

où: I_i et I_j sont les intensités des fluorophores de type (α) et (γ)

ψ_{Li} et ψ_{Lj} leurs rendements quantiques
 L_i et L_j leurs concentrations libres

Remarque:

ψ_{Li} et ψ_{Lj} ne sont pas exactement les rendements quantiques des fluorophores (α) et (γ) (notés Φ_{Li}), mais englobent également l'intensité de la radiation excitatrice (I_o), le coefficient d'adsorption molaire (ϵ), le coefficient d'appareillage (K), la longueur du trajet optique (l), puisque la loi de Beer-Lambert est de la forme:

$$I_i = K.I_o.l.\epsilon.\Phi_{Li} \times [L_i] = \psi_{Li} \times [L_i]$$

Les paramètres I_o , ϵ , K et l étant constants au cours d'une expérience de quenching de fluorescence, dans la suite de cette étude le terme "rendement quantique" sera utilisé pour définir ψ_{Li} et non Φ_{Li} .

La capacité complexante de la MON, L_T , est quant à elle exprimée par la somme des concentrations des groupes (α) et (β), suivant l'équation:

$$L_T = \sum_{i=1}^a [L_{iT}] + \sum_{k=1}^b [L_{kT}] \quad (\text{eq. IV.5})$$

où: L_{iT} et L_{kT} sont les concentrations totales des groupements complexants de type (α) et (β)

Lorsque cette MON est complexée par un métal M , l'expression de son intensité de fluorescence prend la forme suivante:

$$I_{MON} = \sum_{i=1}^a \psi_{Li} \times [L_i] + \sum_{i=1}^a \psi_{MLi} \times [ML_i] + \sum_{j=1}^c \psi_{Lj} \times [L_j] \quad (\text{eq. IV.6})$$

où: ML_i sont les concentrations des fluorophores de type (α) complexés
 ψ_{MLi} leurs rendements quantiques

Puisque le dernier terme de cette expression est indépendant de la complexation de la MON par M , l'équation IV.6 peut se résumer à:

$$I_{MON} = \sum_{i=1}^a \psi_{Li} \times [L_i] + \sum_{i=1}^a \psi_{MLi} \times [ML_i] + \text{constante} \quad (\text{eq. IV.7})$$

Lors d'une titration d'une MON par un métal M , la fluorescence diminue jusqu'à atteindre une valeur minimale équivalente à: $I_{min} = \sum_{i=1}^a \psi_{MLi} \times [L_{iT}] + \text{constante}$. Dans certains cas, cette valeur peut être nulle, ce qui signifie que tous les groupements fluorescents sont complexants (i.e. $c = 0$), et que les rendements quantiques des complexes ML_i sont nuls. On parle alors d'une extinction totale de la fluorescence. Cependant, il est rare d'atteindre une extinction totale de la fluorescence. L'intensité finale, obtenue en fin de titration, est donc la somme des intensités des fluorophores de type (γ) et des complexes fluorescents de type (α). Or, la caractérisation de la structure exacte et des propriétés (fluorescence, complexation, ...) de ces groupements, donc de leur rendements quantiques, est impossible. Il est donc très difficile de différencier les contributions de ces deux groupes dans l'intensité finale, ainsi que dans l'intensité initiale.

L'analyse des données expérimentales issues d'une expérience de quenching de fluorescence, nécessite donc la mise au point d'un modèle chimique représentant les propriétés

de complexation et de fluorescence de la MON analysée, ainsi que la définition d'hypothèses quant aux types de groupements (α , β , γ et/ou δ) présents. Le plus souvent, la quantité de fluorophores non-complexants (type (γ)) est supposée nulle, comme cela a été observé sur des substances humiques isolées (Boussemart, 1989), ou du moins non distinguée des fluorophores complexés de type (α). Une autre hypothèse pourrait être de supposer que les rendements quantiques de fluorescence des groupements (α) complexés sont nuls et donc que l'intensité finale est seulement due aux fluorophores (γ).

La majorité des modélisations appliquées sont basées sur une représentation discrète des interactions MON – métaux (ou proton) (Cabaniss et Shuman, 1986 ; Esteves da Silva *et al.*, 1998 ; Ryan et Weber, 1982 ; Seritti *et al.*, 1994 ; Smith et Kramer, 1998 ; Smith et Kramer, 2000), bien que Grimm *et al.* (1991) aient utilisé une distribution continue. Il s'agit donc de définir un set de sites complexants-fluorescents susceptible de représenter ces interactions. Chaque site est caractérisé par au moins quatre paramètres: une concentration (L_{iT}), une constante de complexation (pK_i), un rendement quantique du ligand libre (ψ_{Li}) et du ligand complexé (ψ_{MLi}). Donc, par rapport à la modélisation de données expérimentales issues de mesures par ISE ou par DPASV, le nombre de paramètres à optimiser est doublé. Ceci explique pourquoi une majorité des modélisations appliquées sur les données expérimentales ne définisse qu'un seul type de site.

Indéniablement, ces considérations soulignent le caractère quelque peu arbitraire de l'exploitation des courbes de quenching de fluorescence. Par exemple, la question se pose de savoir s'il est possible ou non de déterminer les propriétés de groupements de type (b), i.e. seulement complexants.

Cependant, cette technique présente différents avantages pour l'analyse de MON. Elle est nettement plus rapide que les mesures par DPASV par exemple, plus facile que les mesures par ISE, technique dont elle partage la fenêtre analytique. Cette technique est également complémentaire aux mesures électrochimiques puisqu'elle permet d'analyser la spéciation du ligand et non celle du métal. En ce sens, le quenching de fluorescence a été utilisé pour de nombreuses études réalisées au sein du laboratoire (RCMO/PROTEE). L'objectif de ce chapitre est donc la mise en place d'une méthode d'optimisation des paramètres de complexation et de fluorescence, basée sur l'utilisation de *PROSECE*, plus fiable que les traitements de données actuellement utilisées.

IV.D.2/ Mise en place du système chimique – évolution de *PROSECE*:

a/ Définition du système chimique:

Le système chimique définissant les propriétés de complexation et de fluorescence d'une MON, en présence d'un métal M , peut s'explicitier sous la forme d'un *tableau d'équilibre* (II.D.2.c.2/).

Supposons une MON décrite par deux catégories de fluorophores (de type (α)), notés L_1 et L_2 , s'associant à M pour former les complexes 1:1 ML_1 et ML_2 également fluorescents, soit 3 *composants principaux* et 2 *composés*, 5 *espèces* chimiques au total. Le *tableau d'équilibre* décrivant le système chimique est le suivant:

	M	L_1	L_2	
M	1	0	0	
L_1	0	1	0	
L_2	0	1	1	
ML_1	1	1	0	K_1
ML_2	1	0	1	K_2

Ce tableau ne fait pas intervenir les propriétés de fluorescence de L_1 , L_2 , ML_1 et ML_2 , respectivement caractérisées par les rendements quantiques ψ_{L1} , ψ_{L2} , ψ_{ML1} et ψ_{ML2} . En tout point de la courbe de titration de la MON, l'intensité de fluorescence mesurée I peut s'exprimer sous la forme:

$$I = I_{L1} + I_{L2} + I_{ML1} + I_{ML2} = \psi_{L1} \times [L_1] + \psi_{L2} \times [L_2] + \psi_{ML1} \times [ML_1] + \psi_{ML2} \times [ML_2] \quad (\text{eq. IV.8})$$

Le fitting de la courbe expérimentale obtenue nécessite donc l'optimisation des paramètres de complexation L_{1T} , L_{2T} , K_1 et K_2 , mais aussi des rendements quantiques ψ_{L1} , ψ_{L2} , ψ_{ML1} et ψ_{ML2} , soit 8 paramètres en tout. Ce nombre de paramètres est trop important pour qu'ils puissent être correctement optimisés par des programme simples tels que l'outil *solveur* d'*Excel*, d'autant plus que la spéciation exacte du métal doit être prise en compte.

b/ Modification de l'algorithme d'optimisation de PROSECE:

PROSECE, dans la version explicitée au chapitre II.D.2/ et en Annexe II.1, ne permet pas de résoudre directement ce problème. En effet, il a été développé pour optimiser des paramètres de complexation, i.e. intervenant directement dans le *tableau d'équilibre* défini, à partir du fitting de données expérimentales, comme par exemple la concentration libre en proton, la concentration électrochimiquement labile en Cd, ou encore la concentration en un ligand non-complexé. Le fitting des données issues d'un quenching de fluorescence a donc nécessité quelques modifications. Elles ont porté sur: (i) l'intégration, dans le processus d'optimisation, des rendements quantiques, et (ii) la prise en compte de l'intensité de fluorescence comme donnée mesurée à fitter par le logiciel.

La première modification (i) a consisté à ajouter à la matrice *Sim*, utilisée pour représenter le simplex sur lequel travaille l'algorithme d'optimisation (II.D.2.e/ étape2), les rendements quantiques, donc à les faire apparaître comme des variables à ajuster. Sans prise en compte des propriétés de fluorescence, il y a 4 paramètres à optimiser, le simplex est donc constitué de 5 points, i.e. la matrice *Sim* est de la forme:

5 lignes (2 concentrations totales en *composants principaux* à optimiser: L_{1T} , L_{2T} et 2 constantes de stabilité K_1 et K_2)
 × 5 colonnes (3 *composants principaux* et 2 constantes)

soit, pour l'initialisation:

<i>Sim</i>	M_T	L_{1T}	L_{2T}	K_1	K_2
1	0	0	0	0	0
2	0	$0.1 \times [L_{1T}]$	0	0	0
3	0	0	$0.1 \times [L_{2T}]$	0	0
4	0	0	0	$0.1 \times \log(K_1)$	0
5	0	0	0	0	$0.1 \times \log(K_2)$

où: $[L_{1T}]$ et $[L_{2T}]$ sont les valeurs initiales des nombres de mole des sites L_1 et L_2
 $[K_1]$ et $[K_2]$ sont les valeurs initiales de leurs constantes de complexation

Remarque:

Théoriquement, le processus d'optimisation est indépendant du simplex de départ, i.e. quelque soit les valeurs dans la matrice *Sim* initiale, l'optimum du simplex (les valeurs des paramètres optimisés) doivent être identiques. La matrice *Sim* initiale pourrait donc être générée aléatoirement.

En pratique, après plusieurs essais, la genèse de *Sim* telle qu'elle est présentée dans ce paragraphe c'est avérée la plus pertinente et surtout la plus répétable, puisqu'elle n'introduit pas de facteur aléatoire. De plus, une modification de l'ordre de 10% des valeurs initiales des concentrations et/ou constantes à optimiser

semble adaptée, d'autant que le simplexe est modifié, i.e. que cette proportion peut s'accroître suivant la direction prise par le simplexe.

La prise en compte des rendements quantiques (ψ_{L1} , ψ_{L2} , ψ_{ML1} et ψ_{ML2}), en vue de leur optimisation, fait passer le simplexe de 5 à 9 points. La matrice **Sim** initiale est alors de la forme:

Sim	M_T	L_{IT}	L_{2T}	K_1	K_2	ψ_{L1}	ψ_{L2}	ψ_{ML1}	ψ_{ML2}
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	$0.1 \times [L_{IT}]$	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	$0.1 \times [L_{2T}]$	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	$0.1 \times \log(K_1)$	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	$0.1 \times \log(K_2)$	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	$0.1 \times \psi_{L1}$	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	$0.1 \times \psi_{L2}$	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	$0.1 \times \psi_{ML1}$	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	$0.1 \times \psi_{ML2}$

où: ψ_{L1} , ψ_{L2} , ψ_{ML1} et ψ_{ML2} sont les valeurs initiales des rendements quantiques des espèces fluorescentes définies

A part accroître la taille du simplexe, et donc le nombre de paramètres à ajuster, cette modification de l'algorithme d'optimisation est donc assez simple, et ne fait qu'allonger un peu la durée des calculs par *PROSECE*. En plus des matrices **A**, **K**, **C**, **C_{tot}** (II.D.2.e/), un vecteur **Q** a été défini, constitué des valeurs initiales des rendements quantiques ψ_{L1} , ψ_{L2} , ψ_{ML1} et ψ_{ML2} .

La deuxième modification (ii) réalisée sur le code de *PROSECE*, consiste à prendre en compte l'ajustement de ces rendements quantiques, et donc leur influence sur l'intensité résultante. Pour cela, la **fonction comparebis** utilisée dans le code de *PROSECE* (Annexe II.1) a été modifiée pour calculer la différence non pas entre des concentrations mesurées à des concentrations calculées, mais entre les intensités de fluorescence mesurées et celles calculées à partir de l'équation IV.8.

Une fois la spéciation calculée (II.D.2.e/ étape 3), à partir des valeurs de L_{IT} , L_{2T} , K_1 et K_2 modifiées par le nouveau point du simplexe défini (II.D.2.e/ étapes 4 et 5), l'intensité de fluorescence I_{calc} est définie pour les N_{exp} points expérimentaux (équation IV.8) en utilisant les valeurs de rendement quantiques ψ_{L1} , ψ_{L2} , ψ_{ML1} et ψ_{ML2} modifiées par le nouveau point du simplexe. La nouvelle **fonction comparebis** créée permet de calculer le *bias* suivant l'expression:

$$bias = \sum_{i=1}^{N_{exp}} abs(I_{mes,i} - (\psi_{L1} \times [L_1] + \psi_{L2} \times [L_2] + \psi_{ML1} \times [ML_1] + \psi_{ML2} \times [ML_2])) = \sum_{i=1}^{N_{exp}} abs(I_{mes,i} - I_{calc,i})$$

(eq. IV.9)

Le processus d'optimisation (II.D.2.e/ figure II.7) est ensuite itéré jusqu'à minimiser la valeur du *bias* et donc à optimiser les valeurs des paramètres inconnus pour fitter au mieux les données expérimentales.

La généralisation à N ligands complexants et fluorescents (type (α)) revient simplement à modifier le simplexe et la matrice **Sim** en conséquence, ainsi qu'à transformer les équations IV.8 et IV.9, respectivement en:

$$I = \sum_{i=1}^N (I_{Li} + I_{MLi}) = \sum_{i=1}^N (\psi_{Li} \times [L_i] + \psi_{MLi} \times [ML_i]) \quad (\text{eq. IV.10})$$

$$bias = \sum_{i=1}^{N_{exp}} abs \left(I_{mes,i} - \left(\sum_{i=1}^N (\psi_{Li} \times [L_i] + \psi_{MLi} \times [ML_i]) \right) \right) = \sum_{i=1}^{N_{exp}} abs(I_{mes,i} - I_{calc,i}) \quad (\text{eq. IV.11})$$

Il est également tout à fait envisageable de prendre en compte la spéciation des éléments chimiques mis en jeu, i.e. les interactions avec les autres ions du milieu tels que Cl^- , et également d'optimiser les paramètres de ligands complexants non-fluorescents (type (β)) ou fluorescents non-complexants (type (γ)).

IV.D.3/ Exemples de modélisation:

a/ Expérience simulée à 2 ligands de type (α):

Afin de tester cette évolution de *PROSECE*, une expérience de quenching de fluorescence a été simulée. Au vue des résultats obtenus dans l'étude théorique effectuée au chapitre **II.E**/, deux ligands (type (α)) complexants et fluorescents ont été définis, notés L_1 et L_2 . Les valeurs de K_1 , K_2 , L_{1T} , L_{2T} ont respectivement été fixées à: 10^{10} et 10^8 , 30 nM et 300 nM. Les rendements quantiques de L_1 , ML_1 , L_2 et ML_2 ont été définies de manière à avoir $\psi_{Li} > \psi_{MLi}$, i.e. une diminution de la fluorescence, et $\psi_1 > \psi_2$. Les valeurs de ψ_{L1} , ψ_{L2} , ψ_{ML1} et ψ_{ML2} ont donc été fixées à: $10^{9.5}$, 10^9 , $10^{8.5}$ et 10^8 .

Une titration a été simulée, par 25 ajouts logarithmiques de M , sur une gamme de concentrations en métal total de 1 à 457 nM. En chaque point de cette titration, la spéciation chimique a été calculée à l'aide de MINEQL. A partir des concentrations en L_1 , ML_1 , L_2 et ML_2 , les intensités de fluorescence ont ensuite été calculées suivant l'équation **IV.8**. Les valeurs obtenues sont représentées sur la figure **IV.18** (\diamond).

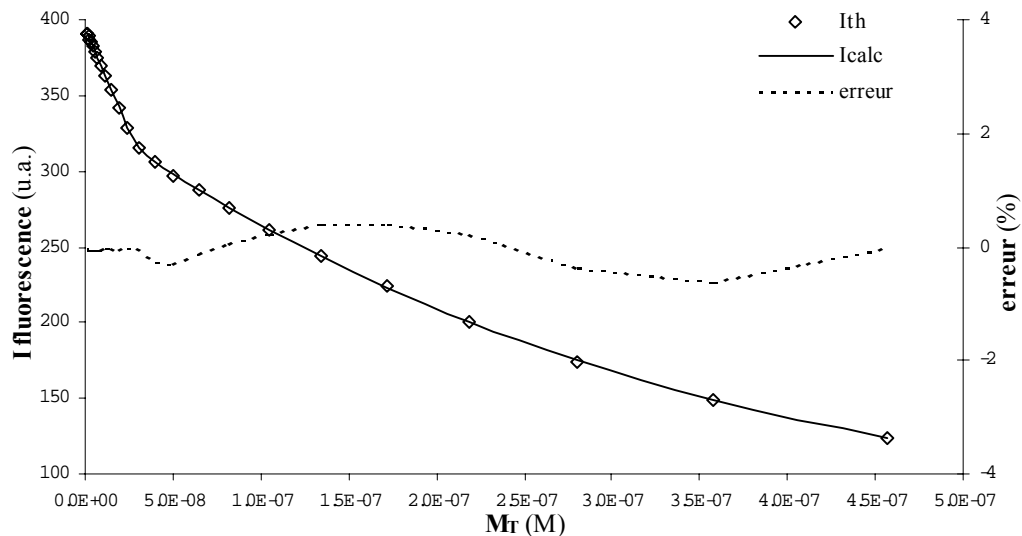


Figure **IV.18**: Modélisation par *PROSECE* d'une titration simulée de quenching de fluorescence pour 2 ligands

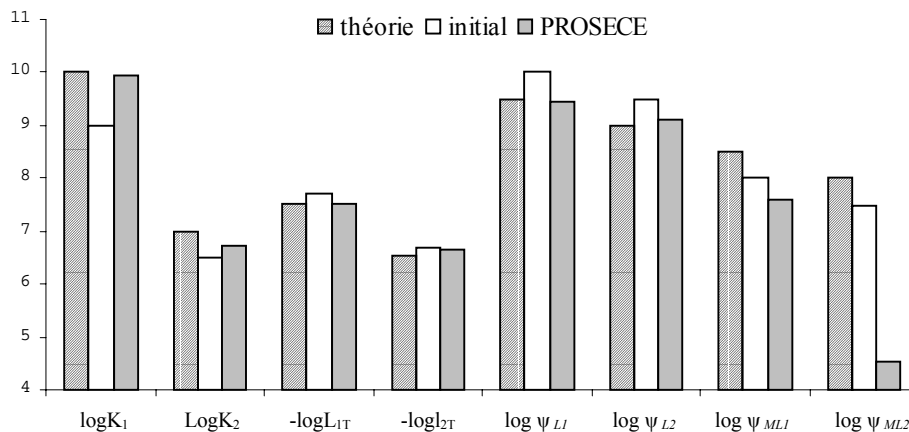


Figure **IV.19**: Valeurs de paramètres théoriques, avant (initial) et après (*PROSECE*) l'optimisation

Une fois le système chimique mis en forme pour *PROSECE*, les valeurs initiales de K_1 , K_2 , L_{1T} , L_{2T} , ψ_{L1} , ψ_{L2} , ψ_{ML1} et ψ_{ML2} ont été fixées à: 10^9 et $10^{6.5}$, 20 nM, 200 nM, 10^{10} , $10^{9.5}$, 10^8 et $10^{7.5}$. La courbe de quenching obtenue une fois l'optimisation de ces 8 paramètres terminées, ainsi que l'erreur sur l'intensité, sont représentés sur le graphique **IV.18**. Le fitting semble correct puisque l'erreur moyenne sur I est de 0.14 %. La comparaison des valeurs obtenues par rapport aux valeurs théoriques et initiales est représentée sur la figure **IV.19**. Les valeurs optimisées par *PROSECE* sont proches des valeurs théoriques (différences inférieures à 4 %), sauf pour le rendement quantique de l'espèce ML_2 .

Les modifications apportées au code de *PROSECE* semblent ainsi permettre une détermination correcte des paramètres de complexation et de fluorescence. Cependant, il serait utile de réaliser une étude théorique, comme celle faite dans le chapitre **II.E/**, spécifique aux expériences de quenching de fluorescence, pour estimer les possibilités (par exemple distinguer ou non des ligands de type (α), (β) ou (γ)) mais aussi les limites de cette modélisation.

b/ Quenching de fluorescence sur une MON:

Le même type de modélisation a été appliquée à un échantillon naturel, issu d'un prélèvement réalisé par Rudy Nicolau (doctorant au laboratoire PROTEE) sur l'Eygoutier, rassemblant les eaux de ruissellement de l'agglomération toulonnaise. Cet échantillon a été ultra-filtré à 0.2 μm , afin d'éliminer la fraction particulaire. 20 ml de filtrat, 30 ml d'eau mQ, thermostatée à 25°C tamponnée à pH 7.8 (solution de borax) et de force ionique ajustée à 0.1 M (NaNO_3), ont ensuite été titrés par une solution standard de Cu^{2+} de 2 μM à 70 μM . Les spectres 2D d'excitation (λ_{em} : 435 nm, λ_{ex} : 200 à 400 nm) ont été mesurés par un spectro-fluorimètre Hitachi F4500. La figure **IV.20** (\diamond) représente l'évolution de l'intensité de fluorescence (λ_{em} : 435 nm, λ_{ex} : 250 nm) en fonction des ajouts de cuivre.

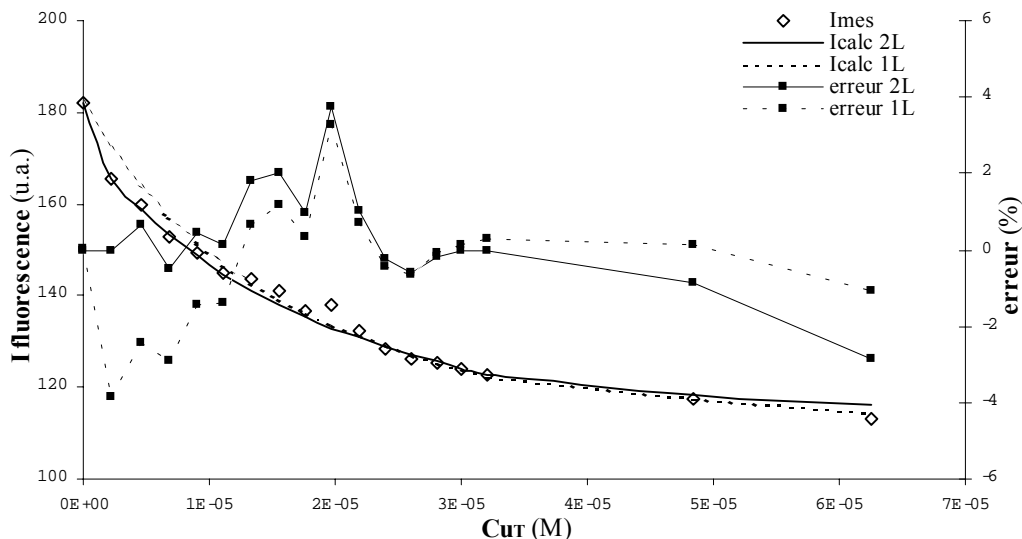


Figure **IV.20**: Modélisation (1 et 2 ligands de type (α)) par *PROSECE* d'une expérience de quenching de fluorescence réalisée sur un échantillon naturel par ajouts de Cu^{2+}

Pour fitter ces données expérimentales, un modèle à un ligand a d'abord été défini. Compte tenu de l'hétérogénéité évidente des propriétés des MON, ce modèle peut paraître un peu simpliste. Pour autant, une majorité d'études visant à définir les propriétés de complexation de MON par quenching de fluorescence reposent généralement sur la définition d'un, voire deux sites. En effet, la gamme de concentrations en métal balayée dépasse rarement 2 ordres de grandeur, puisqu'il est difficile d'observer un quenching suffisamment stable et reproductible pour des concentrations ajoutées en métal inférieures à 1 μM , et qu'au dessus de 100 μM il n'y a plus de complexation observable des métaux et de la MON. Les sites étudiés par ce type de

technique sont donc le plus souvent concentrés (L_{iT} entre 5 et 50 μM) mais faiblement complexants ($\log(K_i) < 6$). Ils correspondent donc aux sites faibles identifiables en DPASV (IV.A/), mais généralement mal caractérisés par cette technique. L'ISE et la spectroscopie de fluorescence permettant d'analyser des solutions de MON 10 voire 100 fois plus concentrées (plus de 50 $\text{mg}_{\text{MON}}\cdot\text{l}^{-1}$), ces sites faibles sont donc mieux caractérisés puisque leur concentration (L_{iT}) augmente donc le produit $K_i \times L_{iT}$ également.

L'initialisation des valeurs des paramètres inconnus a consisté à fixer d'abord les valeurs de K et L_T . Ainsi, la concentration a été fixée au milieu de la gamme de concentration en cuivre balayée, i.e. $3.5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Concernant la constante, elle a été fixée à 10^6 pour être dans la gamme des valeurs habituellement déterminée par cette technique analytique (Cabaniss et Shuman, 1986 ; Esteves da Silva *et al.*, 1998 ; Ryan et Weber, 1982 ; Seritti *et al.*, 1994). Les valeurs initiales des rendements quantiques ψ_L et ψ_{ML} ont été ensuite calculées à partir des intensités initiale (I_{ini}) et finale (I_f) mesurée. Pour ce calcul, l'hypothèse a été faite que tous les sites étaient complexés en fin de titration, donc $\psi_{ML} = (I_f / L_T)$, et qu'en début de titration aucun site n'est complexé, d'où $\psi_L = (I_{ini} / L_T)$. Une fois cette initialisation réalisée, l'optimisation de ces 4 paramètres a été effectuée. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV.7, la courbe $I_{calc} = f(\text{Cu}_T)$ est représentée sur la figure IV.20. Avec un *bias* de 0.238, correspondant à une erreur moyenne sur I de 1.2 %, l'utilisation d'un modèle à un ligand semble être adapté à la représentation des interactions MON-Cu analysées. Cependant, l'observation de la figure IV.20, et plus particulièrement de la courbe d'erreur de cette modélisation à 1 ligand montre que le fitting n'est pas correct pour les concentrations en cuivre inférieures à 10 μM . En effet, dans cette zone, la courbe calculée $I = f(\text{Cu}_T)$ est au dessus des valeurs expérimentales, ce qui sous-entend une sous-estimation de l'intensité de complexation de la MON analysée. L'existence d'un deuxième type de sites, plus complexants et moins concentrés, apparaît donc évident.

1 ligand	K	L_T (M)	ψ_L	ψ_{ML}	<i>bias</i>
initiale	10^6	3.5×10^{-5}	10^8	10^7	
optimisée	$10^{5.1}$	1.02×10^{-5}	$10^{7.25}$	$10^{7.05}$	0.238

2 ligands	K_1	L_{1T} (M)	ψ_{L1}	ψ_{ML1}	K_2	L_{2T} (M)	ψ_{L2}	ψ_{ML2}	<i>bias</i>
initiale	10^7	9.3×10^{-7}	$10^{7.6}$	$10^{7.2}$	$10^{5.1}$	9.3×10^{-6}	$10^{7.4}$	10^7	
optimisée	$10^{7.08}$	9.74×10^{-7}	$10^{7.58}$	$10^{7.19}$	$10^{5.01}$	9.27×10^{-6}	$10^{7.40}$	$10^{7.01}$	0.162

Tableau IV.7: Résultats de l'optimisation des paramètres de complexation et d'optimisation par fitting des données expérimentales de la figure IV.20

Pour vérifier cette hypothèse, les données ont été fittées à l'aide d'un modèle à 2 ligands. Deux sites de type (α) ont donc été définis. L'initialisation des paramètres de caractérisant ces deux sites, a été faite en prenant en compte les résultats déjà obtenus. Ainsi, la valeur de la concentration totale en sites L_{Tot} ($L_{1T} + L_{2T}$) a été initialisée à la concentration optimisée en site obtenue pour le modèle à un ligands, i.e. 1.02×10^{-5} M. La constante du deuxième site, K_2 , a été fixée à la valeur de K optimisée, i.e. $10^{5.1}$. L_{1T} et L_{2T} ont été fixées respectivement à 10% et 90% de L_{Tot} . Comme dans le cas précédent, les valeurs des rendements quantiques ont été initialisées pour avoir $\psi_{L1} \cdot L_{1T} + \psi_{L2} \cdot L_{2T} \sim I_{ini}$ et $\psi_{ML1} \cdot L_{1T} + \psi_{ML2} \cdot L_{2T} \sim I_f$.

L'optimisation de ces 8 paramètres par PROSECE a conduit aux valeurs résumées dans le tableau IV.7, et à la courbe correspondante sur la figure IV.20. Le *bias* (0.162, i.e. 0.9 % d'erreur sur I), bien qu'inférieur à celui obtenu pour le modèle à un ligand, ne permet pas a priori de départager ces deux modélisations. Par contre, l'observation des courbes $I_{calc} = f(\text{Cu}_T)$ montre clairement que le modèle à deux ligands permet de fitter correctement la zone de concentrations en cuivre inférieures à 10 μM .

IV.D.4/ Conclusions:

Cette étude, bien qu'incomplète, a permis de montrer que *PROSECE* peut également être utilisé pour fitter des courbes de quenching de fluorescence, et donc optimiser non seulement des paramètres de complexation mais aussi des paramètres de fluorescence, i.e. des rendements quantiques. Ainsi, les interactions d'un échantillon naturel vis-à-vis du cuivre ont pu être représentées à l'aide d'un modèle à 2 sites complexants et fluorescents (type (α)), chacun étant caractérisé par 4 paramètres.

La relative simplicité des mesures de fluorescence, associée à leur rapidité, rend cette technique intéressante pour comparer les propriétés de complexation d'un grand nombre d'échantillons. Cependant, les sites ainsi caractérisés ne sont pas ceux qui complexent le plus fortement les métaux dans l'environnement en modifiant ainsi leur spéciation. Les sites très complexants peu concentrés ne peuvent être analysés que par des techniques plus sensibles telles que la DPASV.

Une étude théorique approfondie, comme celle réalisée dans le chapitre **II.E/**, serait souhaitable pour pouvoir définir les limites de *PROSECE*, et améliorer les conditions de titrations (type et nombre d'ajouts, gamme de concentration balayée, fitting de l'évolution d'un ou plusieurs pics de fluorescence, voire d'un spectre 3D, ...). La comparaison des résultats obtenus par cette technique à ceux obtenus par potentiométrie (ISE) serait également intéressante. En effet la potentiométrie permet d'analyser les mêmes types de sites complexants (acides), avec la même fenêtre analytique, mais cette fois par analyse de la spéciation du métal (proton) et non des ligands complexants. Ces deux techniques d'analyse sont complémentaires à la DPASV en vue d'une caractérisation la plus complète possible des propriétés de complexation de matières organiques naturelles.

IV.E/ Analyse des propriétés de complexation et d'acidité de MON issues d'eaux côtières:

Cette étude s'intègre dans les objectifs du Groupement De Recherche MONALISA (*Matière Organique Naturelle en milieu Salé*) associant différents laboratoires nationaux et internationaux, et en particulier PROTEE (USTV) et le DEL-PC (IFREMER). Ce GDR a débuté en Octobre 2003, les premiers prélèvements ont été réalisés en février et mars 2004, les résultats obtenus sont donc au stade préliminaire.

IV.E.1/ Contexte - Objectifs:

L'influence de la MON sur la spéciation de contaminants métalliques ou organiques n'est plus à démontrer. L'étude de ses propriétés de complexation et d'acidité est donc un enjeu majeur dans la compréhension de son rôle vis-à-vis du transport de ces micro-polluants et donc de leur impact dans un écosystème donné. La grande variabilité des conditions physico-chimiques rencontrées en milieu estuarien ou côtier rend l'étude de ces propriétés difficile. Pour autant, elle est inévitable si l'on veut mettre en place un modèle la représentant.

L'objectif principal du GDR MONALISA repose sur une caractérisation aussi précise que possible de l'ensemble des propriétés de MON issues d'un écosystème côtier, permettant de définir des relations entre leurs caractéristiques analysables par les différentes techniques utilisées, et leurs propriétés complexantes modifiant la spéciation des principaux contaminants métalliques, i.e. Cd, Cu et Pb. C'est donc un travail ambitieux, qui a nécessité la collaboration de laboratoires spécialisés dans diverses techniques d'isolation, d'analyse et de caractérisation. La zone de prélèvement privilégiée pour ce travail a été choisie dans la Rade de Toulon, car cette

zone fait l'objet de mesures régulières d'IFREMER, et constitue le site d'étude d'un projet EcoDyn (*Étude intégrée de l'impact des transferts de contaminants en milieu côtier méditerranéen*) en cours de réalisation par le laboratoire PROTEE associé à d'autres collaborateurs.

Compte tenu des résultats déjà obtenus au cours de ce travail de thèse, les outils mis en place en termes d'analyse et de modélisation des propriétés d'acidité et de complexation ont donc été sollicités pour tenter de préciser le comportement de la MON vis-à-vis des métaux traces considérés. L'utilisation de ces outils ne doit donc évidemment pas se concevoir isolément mais doit être reliée aux isolations/analyses/caractérisations/modélisations réalisées simultanément par exemple par ultrafiltration et osmose inverse, spectroscopie de fluorescence (E. Parlanti, LCPC, Bordeaux), dialyse-radioéléments, IR, RMN (J.M. Garnier, CEREGE, Aix-Marseille III), pseudo-polarographie (I. Pižeta et D. Omanović, IRB, Zagreb, Croatie), DGT, GFAAS, ASV et CSV (J.L. Gonzalez et B. Boutier, DEL-PC, IFREMER).

IV.E.2/ Prélèvements du 10/03/04 – Bassin d'Arcachon:

a/ Concentration sur nano-membrane de la MON:

La principale difficulté de l'étude de la MON en milieu côtier ou estuarien vient de sa faible concentration dans le compartiment dissous. En effet, les teneurs en COD dans ces eaux sont généralement inférieures à 2 mg.l⁻¹. Associée à des salinités fortes, sa caractérisation, voire même son isolation est donc assez complexe. Par exemple, ses propriétés de complexation sont plus difficilement analysables, donc modélisables, car la spéciation des métaux traces est aussi sous contrôle des chlorures, qui bien que nettement moins complexants que les sites de la MON, entrent en compétition avec ces derniers de par la concentration très forte en ions Cl⁻ dans le milieu.

L'étude des interactions d'échantillons "bruts" (filtrés à 0.45 ou 0.22 µm), avec les métaux traces, en vue d'une caractérisation par des paramètres de complexation et/ou d'acidité (tels que ceux des *quasi-particules*) apparaît donc très difficile sans au préalable une étape de préconcentration ou d'isolation. Bien qu'en apparence indispensable, le choix de cette dernière étape est délicat puisqu'il doit modifier le moins possible les caractéristiques de la MON, tout en permettant d'augmenter sa concentration, voire même de l'extraire complètement de son milieu chimique d'origine. D'autres techniques d'étude, telles que la RMN, nécessitent également une concentration forte en COD.

Les premiers tests réalisés dans le cadre du GDR ont donc consisté à mettre au point une technique de préconcentration suffisamment fiable. Parmi l'ensemble des techniques d'extraction actuellement utilisées, la filtration tangentielle sur nano-membranes a semblé une des plus efficaces. En effet, le laboratoire LCPC de Bordeaux, partenaire de ce GDR, s'est récemment doté d'un osmoseur "demi échelle" permettant de concentrer la MON à partir de grands volumes (i.e. plusieurs hectolitres). Habituellement, ce type de matériel est utilisé pour dessaler l'eau de mer, et il permet de retenir presque complètement tous les ions. Ce n'est pas tout à fait l'objectif de ce travail puisque seule la MON doit être concentrée, sans augmentation notable de la salinité. Les nano-membranes, possédant un seuil de coupure supérieur à l'osmose classique, de l'ordre de 100 Da, devraient permettre d'atteindre ce but. Les ions, plus petits, devraient passer à travers la membrane, alors que seule la MON, constituée de macro-molécules nettement plus grosses (Buffle, 1988), devrait être retenue. Ainsi, idéalement, la concentration de 200 l d'une eau de mer en 20 l, devrait conduire à une augmentation de la teneur en COD d'un facteur 10, sans accroissement notable de la salinité, et sans perte notable en COD.

La première expérience de concentration a été réalisée par E. Parlanti (LCPC) et S. Mounier (PROTEE), dans les locaux du LCPC à bordeaux, les 2 et 3 février 2004. 80 l d'eau prélevée sur la Bassin d'Arcachon (salinité initiale de 28), ont été filtrés en ligne sur des cartouches Whatman Polycap 75TF à 0.45 μm . Ce volume a ensuite été nano-filtré jusqu'à 5 L de rétentat sur une nano-membrane, en contrôlant constamment la salinité et le pH, et régulièrement les propriétés de fluorescence en rapport avec le COD. 30 l d'eau ultra-pure ont été ensuite rajoutés pour limiter l'augmentation de la salinité, puis en fin d'expérience pour l'abaisser à une valeur de conductivité correspondant à une salinité affichée de 12.1.

L'étude des spectres de fluorescence, faite par E. Parlanti, a montré qu'il n'y avait pas de modification importante des propriétés de fluorescence de la MON, si ce n'est un léger déplacement vers les grandes longueurs d'ondes. Ceci laisse supposer une perte de petites molécules, ce qui semble logique compte tenu de la technique utilisée. Cette perte n'est pas très importante pour ce type d'échantillon, prélevé en période hivernale, donc représentatif d'une MON mature, constituée principalement de macro-molécules de grande taille. Pour autant, ce phénomène pourrait s'avérer problématique pour des prélèvements estivaux, i.e. en période d'activité biologique forte, productrice de MON juvénile et de petite taille (résultats du chapitre IV.B/).

b/ Etudes chimiques de l'échantillon osmosé:

b.1 Concentrations en majeurs:

Les concentrations en cations et anions majeurs ont été mesurées par Rudy Nicolau (Doctorant au laboratoire PROTEE) par chromatographie ionique. Les résultats obtenus (C_{mes}) ont été comparés aux concentrations théoriques (C_{th}) basées sur la loi de DITTMAR, pour une eau à 12.1 de salinité. Notons qu'il est évident que sur l'eau ainsi nano-filtrée, on ne peut pas rigoureusement utiliser la loi de DITTMAR, puisqu'il est improbable que les concentrations en cations et anions varient de la même manière au cours de l'étape de préconcentration, donc que leurs proportions relatives soient conservées. La salinité mesurée de 12.1 n'est donc qu'une indication de la concentration en sels dissous.

A partir des concentrations mesurées, les rapports (en %): $R = C_{\text{mes}}/C_{\text{th}} \times 100$ ont été calculés pour chaque ions. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau IV.8.

ions	[] (M)	R (%)	commentaire
Cl^-	6.7×10^{-2}	36	il y a donc a priori moins de Cl^- que la concentration théorique
Br^-	7.4×10^{-5}	26	idem Cl^-
SO_4^{2-}	1.4×10^{-1}	1481	on observe environ 15 fois plus de sulfates
Na^+	9.0×10^{-2}	56	idem Cl^-
K^+	2.8×10^{-3}	83	idem Cl^-
Mg^{2+}	7.1×10^{-2}	387	on observe environ 4 fois plus de Mg
Ca^{2+}	1.6×10^{-2}	452	idem Mg^{2+}

Tableau IV.8: Concentrations en ions majeurs mesurées sur l'échantillon osmosé

Les ions divalents semblent nettement plus retenus sur la membrane. Ce phénomène est a priori normal car les ions di- voire tri-valents, plus gros, passent moins bien à travers les nano-membranes que les ions mono-valents. Ce n'est pas a priori un problème puisqu'il suffit d'en tenir compte pour les calculs de spéciation faits ultérieurement sur ce type d'échantillon osmosé, sauf si la structure de la MON a aussi été notablement influencée par cette évolution de la composition chimique du milieu.

b.2/ Propriétés d'acidité –titrations acido-basiques

Une des caractéristiques principales de la MON repose sur les propriétés d'acidité des groupements fonctionnels qui la constituent. Ils peuvent avoir un rôle prépondérant puisqu'un certain nombre d'entre eux (environ 1%) est susceptible d'interagir par complexation, plus ou moins fortement avec les métaux à l'état de trace présents dans l'environnement. Compte tenu de l'hétérogénéité structurelle de la MON, il est difficilement concevable de la séparer en différentes macro-molécules organiques de structures identifiables. La technique la plus courante est donc basée sur une étude globale de ses propriétés acido-basiques, à l'aide de micro-titrations, puis une modélisation des interactions analysées, modélisation qui peut être soit discrète (représentation par un nombre fini de sites échangeurs de protons) ou continue (représentation par une distribution continue des sites).

Le protocole utilisé pour titrer les fonctions acides des échantillons issus de La Seine (**IV.B/**) a été repris pour cette MON. Théoriquement, l'analyse de ses propriétés d'acidité devrait être d'autant plus facile que la concentration en COD atteinte après préconcentration (22.3 mg.l⁻¹) est suffisamment élevée.

Pour autant, un précipité blanc se forme à pH basique, empêchant une titration acido-basique correcte. En effet, la formation de ce précipité rend non seulement impossible l'interprétation de la courbe de titration, mais elle perturbe aussi les mesures ultérieures faites avec la micro-électrode de pH utilisée. Une série d'analyses a été menée pour tenter de caractériser le gel formé. Ces mesures ont montré qu'il était principalement constitué d'oxy-hydroxydes formés à partir des cations majeurs divalents, en concentrations nettement plus élevées de par leur rétention plus grande par la nano-membrane que les ions monovalents. La formation de ces oxy-hydroxydes a également entraîné de la matière organique, la teneur en COD dans le surnageant n'atteignant plus que 19.8 mg.l⁻¹.

Supposant qu'une fois ce gel formé le surnageant pourrait être analysé correctement, une expérience de micro-titration acido-basique a été réalisée sur ce dernier. Hélas, un nouveau gel se forme.

Il semble donc indispensable de trouver une solution permettant d'éliminer ou de limiter sa formation pour les prochains prélèvements. Plusieurs techniques ont été imaginées dans cet objectif, reposant soit sur un traitement ultérieur du rétentat filtré par la nano-membrane, soit sur une modification du processus de pré-concentration.

Dans le premier cas, des résines échangeuses d'ions (de type chelex) peuvent être utilisées pour éliminer, ou tout au moins diminuer notablement les concentrations en cations divalents, apparemment responsables du précipité. A priori, ce processus permettrait de ne pas perdre de MON. Sinon, la MON concentrée pourrait être extraite par des résines de type XAD-8, protocole se rapprochant alors de l'isolation d'acides fulviques et humiques des eaux marines. Il apparaît cependant moins intéressant, car il est préférable d'analyser l'ensemble de la MON et non pas des sous-fractions isolées par des protocoles différents. Enfin, un sac à dialyse de 100 ou 500 Da pourrait être utilisé pour éliminer les ions, sans perdre de MON. Cette solution nécessiterait cependant d'être très vigilant sur les éventuelles contaminations organiques générées par ces systèmes, voire parallèlement sur la perte des plus petites molécules organiques initialement présentes dans l'échantillon osmosé.

Dans le second cas, il faudrait trouver une ou plusieurs techniques plus efficaces que les nano-membranes, i.e. permettant soit de préconcentrer la MON sans modification majeure de la composition de l'échantillon, donc sans retenir préférentiellement certains ions, soit au contraire de dessaler complètement l'échantillon. En ce sens, une osmose inverse pourrait être utilisée, couplée à un apport en eau mQ. Par un suivi continu de la salinité et des teneurs en COD du rétentat (théoriquement presque nulles), il devrait être possible de contrôler les pertes en ions, et de suivre la pré-concentration en COD.

b.3/ Titrations logarithmiques des propriétés de complexation:

b.3.1/ Expériences réalisées:

L'analyse des propriétés de complexation de la MON nano-filtrée, vis-à-vis de Cd et Pb, a été menée par titration logarithmique et mesure par DPASV. Le protocole expérimental utilisé est le même que celui explicité au chapitre III.C/.

Ainsi, 4 titrations logarithmiques de 40 ml d'échantillon, ont été réalisées respectivement:

- par ajouts de Cd à pH naturel (i.e. seulement tamponné par les ions présents dans l'échantillon osmosé),
- par ajout de Cd à pH avec tampon acétique,
- par ajouts de Pb à pH naturel,
- par ajouts de Pb à pH avec tampon acétique.

Chaque expérience est constituée de 30 ajouts (tableau III.2) de solutions standard (1, 10, 100 et 100 μM), balayant ainsi une gamme de concentration en Cd ou Pb ajouté de 5×10^{-10} M à 5×10^{-6} M. Pour chaque ajout, 3 mesures de DPASV sont effectuées, soit un total de 93 voltamogrammes par expérience à traiter. Pour les titrations réalisées à pH naturel, où l'intensité de complexation de la MON est supposée être la plus forte, le temps d'équilibre après chaque ajout a été porté à 2 heures, au lieu de 1 heure pour les titrations à pH avec tampon acétique.

Durant ces périodes d'équilibre, le pH a été mesuré, échantillonné toutes les 10 s. Seule la valeur mesurée en fin d'équilibre a été utilisée ultérieurement pour la modélisation par PROSECE. Les variations de pH observées au cours de ces 4 expériences sont tracées sur la figure IV.21. Bien que présentant des allures assez semblables, avec des amplitudes différentes, l'interprétation des variations des courbes observées à un même pH (par exemple "Cd pH naturel" et "Pb pH naturel", figure IV.21) semble difficile. En effet, de nombreux paramètres contrôlent ou influencent la valeur du pH. Par exemple, la complexation des sites de la MON par Cd (ou Pb), libère certainement des protons initialement associés à ces sites, et donc diminue le pH. L'acidité des solutions standard ajoutées, nécessaire à leur conservation, modifie sans doute également le pH, bien que les volumes ajoutés soient très faibles. Il convient donc, non pas forcément d'essayer de simuler ces variations, mais d'en tenir compte pour l'optimisation, afin de calculer correctement la spéciation chimique.

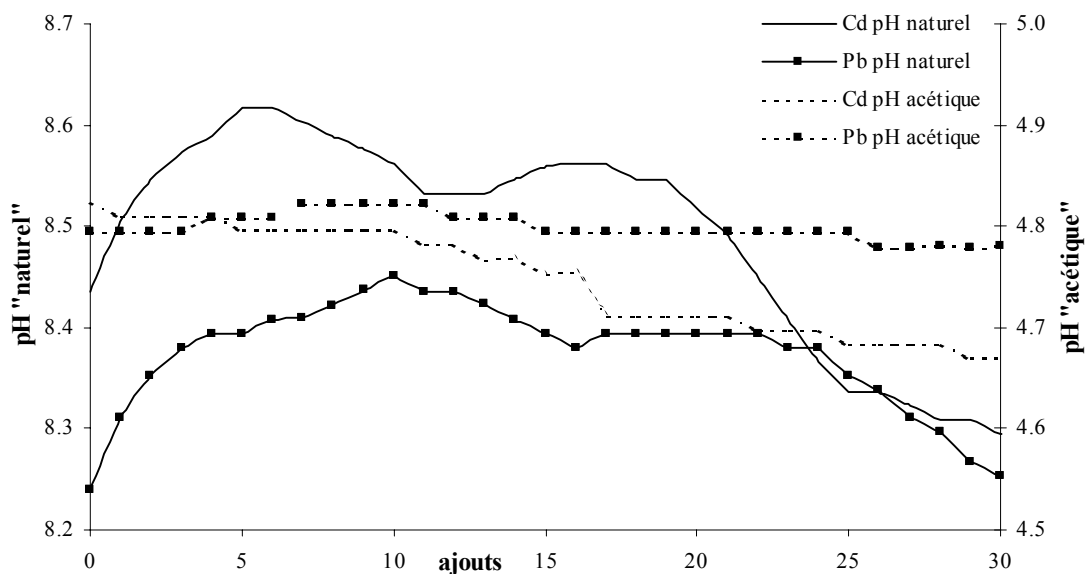


Figure IV.21: variations de pH mesurées au cours des expériences de titrations logarithmiques

b.3.2/ Traitement des voltamogrammes:

Chaque voltamogramme obtenu a été traité suivant le protocole explicité au chapitre **III.B.4.c/**. La ligne de base au niveau du massif de pics de Cd et Pb a donc été fittée par une fonction polynôme du 3^{ème} degré. Puis, chaque pic a été représenté à l'aide d'une fonction en $1/\cosh^2$. Alors que la modélisation par deux pics (un pour Cd et un pou Pb) des voltamogrammes obtenus pour la titration logarithmique par ajouts de Cd à pH naturel n'a pas posé de problème, il n'en a pas été de même pour les autres expériences. En effet, sauf pour les premiers ajouts, le fitting par deux pics n'a pas permis de correctement représenter le massif de pics observé sur les voltamogrammes. Dans un premier temps, la fonction en $1/\cosh^2$ a été mise en cause. Pour autant, les autres fonctions définies au chapitre **III.B.4.c/** n'ont pas amélioré la modélisation. Une observation plus précise des voltamogrammes obtenus en fin de titration a permis de mettre en évidence l'existence d'un troisième pic, i.e. d'un pic de Cd et de deux pics de Pb. L'apparition de ce troisième pic est évident sur le graphique **IV.22**.

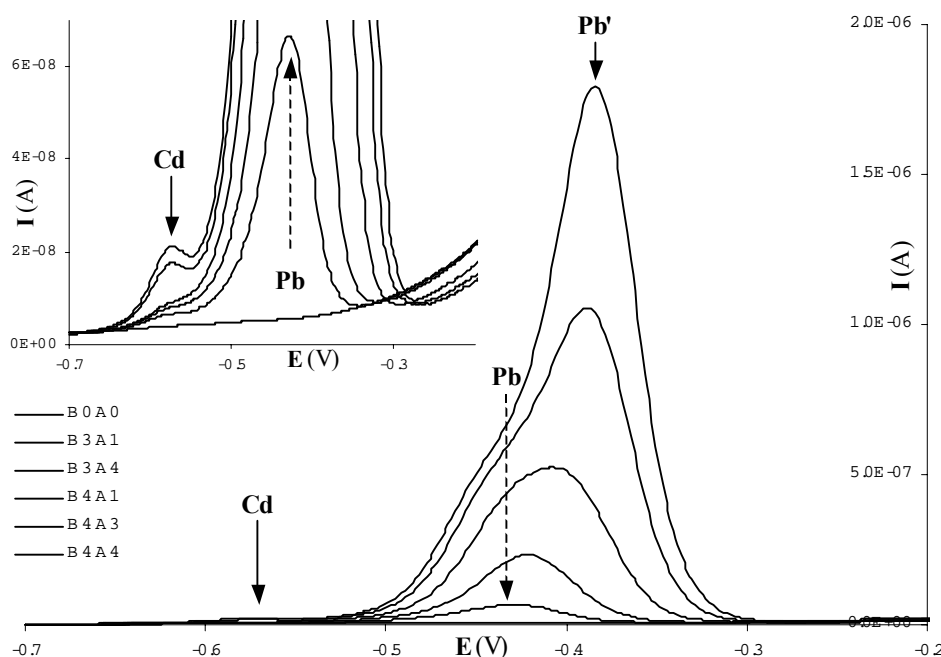


Figure **IV.22**: Evolution du massif de pic (Cd+Pb) au cours de la titration de l'échantillon osmosé, à pH naturel, par ajouts de Pb en mode logarithmique (Bi : n° de burette, Ai : n° d'ajout, tableau **III.2**)

Le fitting de ces voltamogrammes a consisté à optimiser les paramètres des fonctions en $1/\cosh^2$ de trois pics (*Cd*, *Pb* et *Pb'*), après définition de la ligne de base. Pour exemple, le fitting du voltamogramme, obtenu pour la 3^{ème} mesure DPASV de l'ajout 3 de la burette 4 (1000 μ M) de Pb à l'échantillon osmosé à pH naturel, est représenté sur la figure **IV.23**.

L'erreur (figure **IV.23**, \blacklozenge), inférieure à 10 % sur l'ensemble du massif de pics donc attestant d'une modélisation relativement bonne, a une allure pour le moins suspecte. En effet, compte tenu de la variabilité assez faible (généralement inférieure à 2 % avec l'appareillage utilisé) de la mesure sur *I*, au cours du balayage de potentiel en DPASV, la courbe d'erreur devrait avoir une forme aléatoire, bornée par -2 % et +2 %, dans le cas d'une modélisation correcte, ce qui n'est pas le cas. Non seulement les bornes d'erreurs sont plus élevées, mais son allure globale se rapproche d'une sinusoïde. Or, si la modélisation était incorrecte (i.e. que le type de fonction utilisée n'était pas en adéquation avec le signal mesuré), l'erreur n'aurait sans doute pas une allure répétable. Ce phénomène s'apparente plutôt à un bruit sinusoïdal ajouté à la mesure, qui, bien que nettement diminué en amplitude et accru en fréquence, ressemble clairement à celui observé sur les premières mesures de DPASV réalisées avec ce stand de mesure (figure **III.8A**, **III.B.4.b/**). Les interférences électriques alors identifiées n'ont donc, semble t-il, pas totalement disparu, malgré les précautions prises. Alors qu'il semble difficile de les éliminer totalement lors

de la mesure, leur élimination mathématique lors du traitement des voltammogrammes, semble plus plausible. Pour cela, l'outil utilisé (solveur, Excel) n'est assez performant, il faudrait avoir recours à une modélisation sous Octave ou Matlab. Faute de temps, celle-ci n'a pas pu être mise au point, mais une pré-étude est en cours avec Rolland Redon, physicien au laboratoire PROTEE, spécialiste du traitement de données.

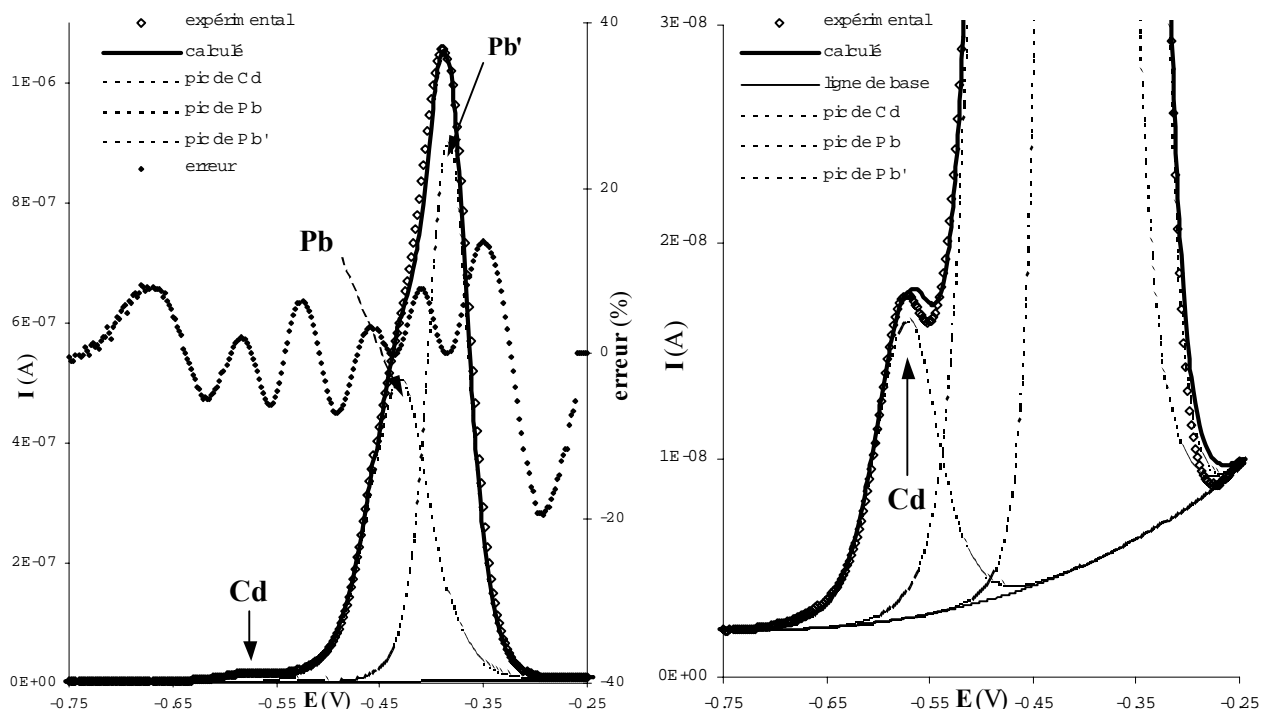


Figure IV.23: Fitting d'un voltammogramme par 3 fonctions en $1/\cosh^2$ représentant les pics de Cd, Pb et Pb'

Les analyses faites dans la suite de ce chapitre sont donc basées sur les résultats de cette déconvolution mathématique des voltammogrammes par trois fonctions en $1/\cosh^2$.

L'origine de la formation simultanée de deux pics de Pb (et non pas du simple déplacement d'un pic), clairement identifiés sur les voltammogrammes, n'est pas pour le moment clairement établie. Elle caractérise certainement deux types de Pb labiles, phénomène qui, à ma connaissance, n'a pas été observé pour ce métal. Si l'on se réfère aux résultats similaires couramment observés pour le cuivre (Boussebart, 1989; Boussebart *et al.*, 1993; Menargues, 1989), le pic (Pb) pourrait être la conséquence de la présence d'ions chlorures ($[Cl^-] = 6.7 \times 10^{-2}$ M), générant des complexes $PbCl_i^{(2-i)+}$, électrochimiquement labiles, mais de potentiel plus négatif. Lorsque la concentration en Pb augmente, le pic (Pb') représentant des formes également labiles du plomb mais moins fortement complexées (ex. $Pb(NO_3)_i^{(2-i)+}$, $Pb(SO_4)_i^{(2-2i)+}$, ...) voire même le plomb libre Pb^{2+} , donc de potentiel de réoxydation plus positif, apparaîtrait, jusqu'à dépasser le pic (Pb) en fin de titration. La figure IV.24 représente les évolutions des proportions en pics (Pb) et (Pb') au cours des titrations de l'échantillon osmosé par ajouts logarithmiques de Pb à pH naturel (figure IV.24A) et à pH tamponné acétique (figure IV.24B).

Comme le montrent ces figures, la variation de la proportion en ces deux pics semble influencée par le pH, i.e. par l'état de complexation du plomb par la MON, et sans doute également par la répartition du Pb entre ces différentes formes inorganiques, par exemple par la présence ou non d'hydroxydes. La position de ces deux pics varie peu pour les ajouts de Pb à pH acétique, mais nettement plus à pH naturel. Ceci caractérise sans doute une modification au cours des ajouts de la spéciation du plomb inorganique au sein des deux catégories identifiées respectivement par les pics Pb et Pb', donc de la labilité des complexes, modification d'autant plus importante que le pH est élevé. La signification et l'origine exacte de ces phénomènes restent imprécises. Elles demanderaient une étude complémentaire, qui pourrait par exemple être

faite par pseudo-polarographie, technique utilisée au sein du GDR MONALISA par Dario Omanović (Omanović *et al.*, 2003).

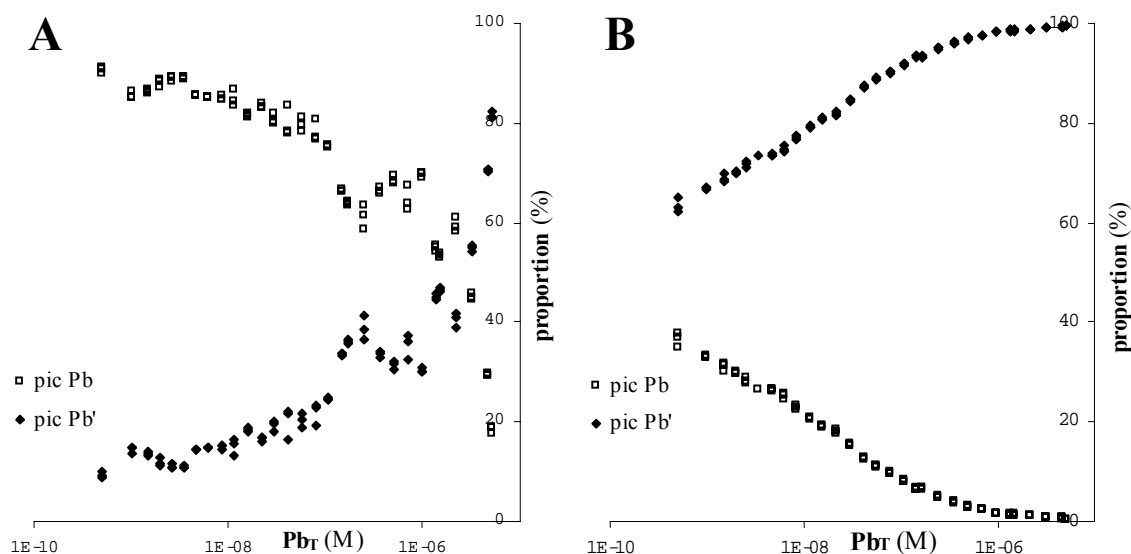


Figure IV.24: Variations des proportions en pics (*Pb*) et (*Pb'*) lors des titrations de l'échantillon par ajouts de Pb en mode logarithmique, à pH naturel (A) et tamponné acétique (B)

b.3.3/ Analyse des résultats obtenus:

La définition exacte de la nature des complexes électrochimiquement labiles formant les pics *Pb* et *Pb'* étant difficile, ils ont été intégrés sur chaque voltamogramme, puis leur aire a été sommée pour permettre de calculer la concentration en Pb labile, i.e. non complexé à la MON. La concentration en Cd labile, quand à elle, a été déterminée en intégrant le pic correspondant au cadmium. Pour chaque expérience et vis-à-vis de chaque métal, la constante de l'appareil S_{app} , reliant l'aire du pic à la concentration labile (eq. III.10, III.B.4.c.2.3/) a été estimée par régression linéaire des derniers points des titrations, pour lesquels on peut supposer que la concentration totale en ligand analysable a été dépassée. L'hypothèse d'une réponse équivalente (S_{app}) pour les deux pics de Pb a été faite, mais n'a pas pu être vérifiée.

Les concentrations labiles en cadmium et plomb ainsi obtenues pour les quatre titrations logarithmiques réalisées sont représentées sur la figure IV.25, suivant le même formalisme que celui utilisé pour les titrations de l'AFSR (figure IV.2, IV.A.4.a/). Sur cette figure, les droites représentent les relations " $pM = f(pM_T)$ ", i.e. une absence de complexant. Plus les points expérimentaux s'écartent de cette droite, plus l'intensité de complexation est forte.

Comme cela était prévisible, la MON étudiée est plus complexante vis-à-vis des deux métaux à pH naturel (figures IV.25A et IV.25B, ■) qu'à pH tamponné acétique (figures IV.25A et IV.25B, □). Cependant, la variation de l'amplitude de complexation n'est pas la même pour les deux métaux. En effet, alors que le plomb est très nettement moins complexé lorsque le pH devient plus acide (figure IV.25B, ■ et □), les variations sont plus faibles pour le cadmium (figure IV.25A, ■ et □). Comme pour l'AFSR, la MON analysée dans cette étude complexe plus fortement le plomb que le cadmium, quelque soit le pH.

Concernant les effets de compétition entre ces deux métaux, vis-à-vis des sites de complexation de la MON, ils peuvent être estimés par l'étude des variations des concentrations en métal non-titrant (figures IV.25A et IV.25B, × et +) en fonction des ajouts de métal titrant, variations comparées aux droites hachurées indiquant les concentrations totales initiales en métal non-titrant. Il est à noter que ces concentrations totales initiales en Cd et Pb sont élevées, nettement plus fortes que celles habituellement détectables dans une eau naturelle marine. Elles reflètent sans doute la plus grande rétention des ions divalents, donc des métaux traces, par la nano-membrane utilisée pour préconcentrer la MON dans cette étude, phénomène déjà observé

avec les cations divalents majeurs (IV.E.2.b.1/). A cela il faut ajouter la complexation des cations par la MON, cette dernière étant en concentration nettement plus élevée que dans l'échantillon initial.

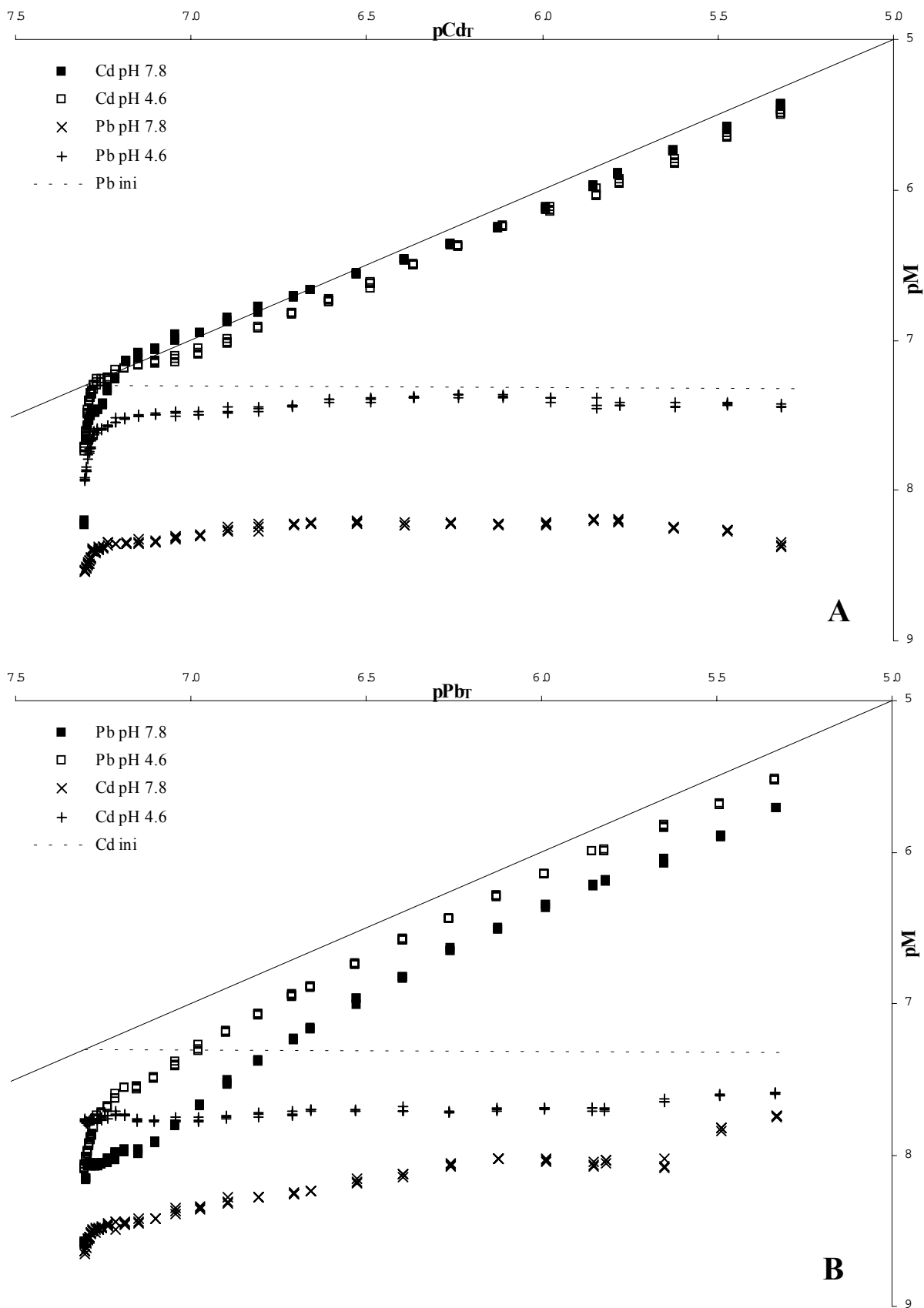


Figure IV.25: Courbes $pM = f(pM_T)$ obtenues pour les titrations logarithmiques réalisées sur l'échantillon osmosé par ajouts de Cd (A) et Pb (B) à pH naturel et tamponné acétique

L'étude de ces courbes montre que, alors qu'à pH naturel le plomb semble très peu décomplexé par les ajouts de cadmium (figure **IV.25A**, ×), une fraction importante est rapidement décomplexée à pH tamponné acétique (figure **IV.25A**, +). Ceci indique sans doute la présence de sites complexants spécifiques au plomb sur la MON analysée, ne libérant le plomb que lorsque le pH est acide. Concernant le cadmium, il semble lui aussi spécifiquement complexé à pH naturel (figure **IV.25B**, ×), bien que la proportion de cadmium lié à ces sites spécifiques soit plus faible que pour le plomb, mais contrairement à ce dernier cette proportion reste assez importante à pH plus acide (figure **IV.25B**, +). Sur la MON étudiée il y a donc probablement des sites spécifiques au cadmium, moins influencés par la compétition des protons que ceux du plomb.

Cependant, il faut noter que l'allure de la courbe de titration par ajouts de plomb à pH naturel (figure **IV.25B**, ■), dans la zone des concentrations totales en Pb inférieures à 10^{-7} M est suspecte. En effet, elle ne présente pas la courbure marquée habituellement obtenue (figure **IV.2B** □, **IV.A.4.a/**), qui est au contraire observable à pH tamponné acétique (figure **IV.25B**, □). De plus, le fait que la courbe de titration par ajouts de cadmium à pH naturel (figure **IV.25A**, ■) soit tangente à la droite " $pM = f(pM_T)$ " est anormal. Ces deux phénomènes indiquent sans aucun doute que le temps d'équilibre entre chaque ajout est insuffisant pour que la complexation/décomplexation des métaux traces par la MON soit à l'équilibre. Initialement défini à 1 heure, au regard des résultats obtenus sur l'AFSR (**IV.A/**), ce temps d'équilibre devrait être allongé, au moins pour les premiers ajouts de métaux à pH naturel. En effet, la composition chimique de l'échantillon osmosé (tableau **IV.8**), proche de celle d'une eau de mer, est complexe, i.e. qu'elle présente une concentration élevée en chlorures et des concentrations accrues en cations et anions divalents (plus fortement retenus sur la nano-membrane). Ces espèces constituent pour les métaux (anions majeurs) et pour la MON (cations majeurs) des éléments compétiteurs diminuant l'intensité des interactions MON-métaux traces et également leur vitesse d'association/dissociation. Ceci entraîne donc une limitation en termes d'analyse de la fraction de métal sous forme de complexes organiques inertes, mais également d'une modélisation ultérieure des données expérimentales obtenues.

Une modélisation par *PROSECE*, à l'aide d'un *chimio-type* constitué de deux *quasi-particules* de type II et deux de type III (**II.C.1/**) a été initiée. Le système chimique a été défini en prenant en compte l'ensemble des cations et anions majeurs dont les concentrations ont été mesurées, ainsi que leurs réactions d'associations notamment avec le cadmium et le plomb, à partir des constantes thermodynamiques définies dans la base de données du logiciel MINEQL. Ainsi, 16 *composants principaux* et 62 *composés*, caractérisés par autant de *constantes* et de *réactions d'association*, ont été définis sous la forme d'un tableau d'équilibre (**II.D.2.c/**). La définition de l'ensemble de ces espèces chimiques complique la spéciation chimique du système et donc sa résolution par le module de *PROSECE* (**II.D.2.c/**) en chaque point expérimental. Elle est pourtant nécessaire pour correctement caractériser les interactions MON-métaux traces. Faute de temps, la modélisation des 353 points expérimentaux par le *chimio-type* défini n'a pas pu être achevée. Pour autant, les premiers calculs d'optimisation réalisés corroborent les difficultés présagées par l'analyse des courbes de titrations obtenues. En effet, compte tenu de l'allure étrange de certaines courbes et de la présence d'anions inorganiques fortement concentrés dans l'échantillon, ces courbes sont très difficiles à fitter, et n'ont pas permis pour le moment de paramétrer correctement le *chimio-type* caractérisant les interactions de la MON analysée vis-à-vis de Cd et Pb.

IV.E.3/ Analyse critique des résultats obtenus, évolutions expérimentales et analytiques à prévoir:

Ces résultats, bien que partiels, amènent plusieurs réflexions. Expérimentalement, la technique d'extraction du COD basée sur l'utilisation d'un osmoseur équipé d'une nano-membrane, entraîne un certain nombre de problèmes. En effet, la sélectivité apparente de cette membrane à 100 Da pour les ions bi- ou tri-valents modifie indubitablement le rapport des concentrations des espèces chimiques majeures de l'échantillon nano-filtré. Théoriquement, ces modifications de la composition ionique peuvent être facilement prises en compte, puisque les concentrations des cations et anions en cause sont facilement analysables. Ces concentrations sont ensuite intégrables au calcul de spéciation, afin de définir la fraction de métal (Cd ou Pb) sous forme de complexes inorganiques. Pour autant, la rétention préférentielle des ions, et plus particulièrement des cations, tels que le calcium ou le magnésium, a certainement une influence non-négligeable non seulement sur l'état de complexation des sites présents sur la MON ainsi isolée, mais également sur sa conformation. De plus, la formation du gel à pH basique, identifié comme étant principalement constitué d'oxy-hydroxydes entraîne non seulement de la MON mais rend également impossible l'analyse des propriétés d'acidité de l'échantillon osmosé.

La présence d'anions inorganiques en concentrations importantes, et plus particulièrement de Cl⁻ et SO₄²⁻, diminue également l'amplitude de la complexation des métaux par la MON. En effet, ils s'associent à ces métaux, pour former des complexes labiles, diminuant la fraction de métal organique par compétition. Même s'ils n'ont pas d'influence sur la complexation des sites forts (i.e. $\log K_i > 9$) présents en faibles concentrations (de l'ordre de quelques nM) sur la MON, ces anions masquent la complexation des sites plus concentrés (100 nM à 1 μM) mais moins complexants ($\log K_i < 5$), pourtant analysables par exemple sur un AFSR (IV.A.4.b/). En effet, les calculs de spéciation effectués par PROSECE au cours des essais de modélisation des données expérimentales obtenues (IV.E.2.b.3.3/) montrent que la proportion de Cd et Pb sous forme de complexes $M(\text{Cl})_i^{(2-i)+}$ et $M(\text{SO}_4)_j^{(2-2j)+}$ est très variable mais souvent importante. D'une manière générale, ces complexes représentent de 80 à 95 % de la fraction de métal labile, la proportion de complexes chlorures étant nettement plus faible que celles des sulfates. De plus, pour la titration réalisée à pH naturel par ajouts de Cd, leur proportion par rapport à la quantité totale de Cd passe de 17 %, pour les premiers ajouts, à 94 % à la fin de la titration. De même, pour les ajouts de Pb, leur proportion passe de 10 % par rapport à la concentration totale en Pb, à 66 %. Ces anions sont donc très influents, principalement sur la spéciation du cadmium. Toutefois, il est intéressant de noter que, même dans ces conditions, ces métaux sont bien complexés par la MON à faibles concentrations, et donc que la MON a un rôle non-négligeable sur leur spéciation dans un milieu naturel.

Compte tenu des concentrations naturelles en COD d'eaux côtières ou marines, un processus d'isolation de la MON, visant à la préconcentrer, est tout de même indispensable. En effet, outre les problèmes déjà mentionnés, l'utilisation d'une nano-membrane a entraîné des pertes importantes de COD, donc de MON (de l'ordre de 80%), lors du traitement de 220 l d'eau prélevée dans la rade de Toulon en mars 2004. Cette perte de COD importante s'explique sans doute par la présence à cette saison d'une proportion importante de macro-molécules de taille réduite, résultant d'une activité biologique plus forte qu'en hiver (IV.B.4/), donc d'une MON globalement plus petite que celle échantillonnée sur le Bassin d'Arcachon. Il faut donc trouver une solution technique permettant de retenir la MON, sans trop préconcentrer sélectivement les cations et anions divalents. En ce sens, une nouvelle campagne de prélèvements est prévue en juin pour tester une osmose inverse directement sur l'échantillon.

Simultanément à cette modification du protocole de pré-concentration, l'utilisation de résines échangeuses d'ions semble nécessaire, comme cela a été montré dans la partie IV.E.2.b.2/. Ces techniques devraient permettre de minimiser l'effet des ions divalents, dans l'hypothèse où ces derniers seraient à nouveau retenus préférentiellement, en les échangeant avec des protons.

Dans tous les cas, il conviendra d'estimer les rendements en COD pour ces techniques, mais aussi de déterminer les contaminations éventuelles qu'elles génèrent en réalisant des blancs.

Concernant les propriétés de complexation, et leur étude par DPASV, l'augmentation du temps d'équilibre entre chaque ajout de métal, pendant une titration logarithmique, apparaît inévitable. Elle devrait permettre de mieux analyser les interactions MON-Cd et Pb. Toutefois, il serait peut être souhaitable de l'associer à l'utilisation préalable d'une résine échangeuse d'anions, permettant d'éliminer les anions majeurs. Alors, la complexation de la MON serait moins perturbée par leur compétition vis-à-vis des métaux traces. L'analyse de ces propriétés serait donc beaucoup plus proche de celles réalisées sur les acides fulviques et humiques extraits. Pour autant, dans l'état actuel des investigations, il a été montré que même en présence de concentrations élevées en cations divalents, en chlorures et en sulfates, la proportion de cadmium et de plomb initialement complexés par la MON est loin d'être négligeable. De plus, la fraction de métal complexé par des sites spécifiques semble importante à pH naturel.

Une fois caractérisée par un *chimio-type*, les paramètres des MON ainsi étudiées pourront être utilisés afin de les représenter dans le milieu naturel, et donc de préciser leur rôle vis-à-vis du transport des métaux traces en zone côtière.

CONCLUSION GENERALE

Les différentes études menées au cours de cette thèse ont toutes été axées sur l'analyse du rôle de la MON sur la spéciation des métaux traces, et plus précisément sur la caractérisation de ses interactions multiples et compétitives par des paramètres de complexation et d'acidité facilement transposables dans des modèles biogéochimiques, à l'aide de différentes techniques analytiques et de modélisation.

La comparaison des différents modèles chimiques actuellement utilisés pour des études similaires a permis de choisir le modèle qui semblait le plus adapté à la détermination des paramètres de complexation permettant de simuler les différentes interactions d'une MON. Ainsi, un modèle basé sur la définition d'une distribution discrète de sites a été défini. Connaissant les limites de ce type de modélisation, abondamment discuté dans la littérature, le concept de *quasi-particules*, développé par Sposito (1981, 1994), a été préféré à celui de sites de complexation classiques habituellement utilisés pour modéliser les propriétés de complexation ou d'acidité de MON, ou plus généralement d'échantillons naturels. En effet, bien que les sites soient également des entités mathématiques, donc ne représentant pas des structures chimiques exactes de la MON, ils ne peuvent simuler qu'un seul type d'interaction (par exemple MON-Cu²⁺) puisqu'ils ne sont définis que par une seule constante (K_{CuMON}). Au contraire, une *quasi-particule* peut être affectée de nombreuses propriétés. Ainsi, par l'utilisation d'une telle entité, il est possible de représenter simultanément les interactions d'un site présent sur une MON vis-à-vis du proton, de métaux traces, de cations majeurs, ... en caractérisant simplement chacune de ces interactions par une constante d'association propre. Dans ce cas, les phénomènes de compétition entre ces différents cations sont nécessairement pris en compte. Au contraire, pour représenter ces interactions par des sites classiques, il faut définir autant de sites qu'il y a d'interactions, et dans ce cas il n'y a aucun lien mathématique entre ces différents sites. Pour permettre de correctement définir les différentes interactions spécifiques ou non-spécifiques analysables sur une MON, elle a été représentée par un *chimio-type*, constitué de différents types de *quasi-particules*: (I) spécifiques au proton, (II) s'associant aux métaux traces et au proton, (III) spécifiques à un seul métal.

Une fois ce modèle de complexation mis en place, au vu des logiciels d'optimisation actuellement existants, il a semblé indispensable de développer un programme permettant non seulement de calculer la spéciation chimique d'un système donné mais également d'optimiser un grand nombre de paramètres de complexation, d'acidité, ... par modélisation de données expérimentales. En effet, le *chimio-type* permettant de simuler les propriétés de complexation et d'acidité d'une MON est nécessairement constitué de nombreux paramètres (concentration, constantes de stabilité, ...) qu'il faut optimiser simultanément. En ce sens, un Programme d'Optimisation et de Spéciation Chimique dans l'Environnement (*PROSECE*) a été créé.

Afin de le valider, il a été comparé théoriquement aux différentes techniques de traitement de données habituellement utilisées dans ce type d'études.

- (i) Les résultats obtenus montrent que l'utilisation d'un algorithme d'optimisation non-linéaire, tel que *PROSECE*, est nettement plus efficace que les techniques de linéarisation, pourtant encore utilisées dans une majorité de travaux.
- (ii) Il a été prouvé que le mode de titration choisi, i.e. la répartition des ajouts de solutions standard de métaux à une solution, avait une influence indiscutable sur la justesse des paramètres optimisés.

Ainsi, un mode d'ajouts logarithmiques (i.e. incréments constants en $\log(M_T)$) a conduit aux résultats les plus justes. Il conviendra donc de mettre en place une technique analytique de titration des interactions MON-métaux, basée sur ce mode d'ajouts.

Pour permettre d'analyser les interactions MON-métaux et MON-proton, en vue de leur modélisation par un *chimio-type*, deux techniques d'analyse ont été développées.

Considérant les possibilités des techniques voltamétriques, et leur adéquation particulière à l'analyse des associations MON-métaux traces, la Differential Pulse Anodic Stripping Voltametry (DPASV) a été préférée dans cette thèse. Cette technique permet de mesurer simultanément les concentration en Cd, Pb et Cu labiles que l'on peut assimiler aux concentrations en métaux libres et complexés par des ligands inorganiques faibles.

La première étape de ce travail a donc consisté à optimiser les paramètres contrôlant ces mesures de concentrations totales en métaux traces d'échantillons naturels. En effet, lorsqu'ils sont acidifiés ($\text{pH} < 2$), la concentration mesurée en métal est assimilable à la concentration totale, puisque les interactions MON-métaux sont rendues négligeables par compétition avec les protons en excès. Une technique spécifique d'ajouts dosés et de traitement des voltamogrammes obtenus a été mise au point afin de déterminer ces concentrations totales le plus rigoureusement possible.

Une fois cette analyse mise au point, la titration des interactions MON-métaux a été abordée. Compte tenu des résultats obtenus par le mode de titration logarithmique, ce dernier a donc été adopté. Pour ce faire, un stand de mesure spécifique a été élaboré, ce qui a entraîné de nombreuses adaptations et difficultés techniques à résoudre, en vue d'une automatisation des titrations d'échantillons naturels par Cd et Pb, celles-ci durant plus de 48 h. Une fois ce mode de titration développé, compte tenu de l'allure des voltamogrammes et plus particulièrement du recouvrement systématique des pics de réoxydation de Cd et Pb, un traitement mathématique des voltamogrammes a été mis en oeuvre. Une méthode de déconvolution des pics a permis de déterminer le plus précisément possible les concentrations en métaux labiles. Basée sur une régression polynomiale de la ligne de base, et d'une modélisation des pics de Cd et Pb à l'aide de fonctions en $1/\cosh^2$, reposant sur une approche théorique de la mesure électrochimique de ces métaux. Par différence aux concentrations totales en métaux, la proportion de métal sous forme de complexes organiques électrochimiquement inertes est déterminable. C'est par traitement mathématique, via *PROSECE*, des courbes de titrations ($[M_{\text{labile}}] = f([M_{\text{T}}])$) ainsi obtenues qu'il sera possible de simuler les interactions MON-métaux ainsi analysées.

L'analyse des sites acides analysables sur une MON a été réalisée à partir d'une titration acido-basique. Pour cela, un stand de mesure a été mis en place, permettant de réaliser des micro-dosages d'échantillons naturels par ajouts de solutions standard d'acide et de base. Les courbes de titrations obtenues ont été traitées mathématiquement, par comparaison à une courbe de dosage d'une eau ultra-pure, pour déterminer l'acidité totale de l'échantillon, i.e. la concentration totale en sites acides analysables, estimer la répartition des sites de types carboxylique et phénolique, et calculer la concentration totale en proton. En effet, contrairement aux analyses faites avec les métaux, il n'existe pas de technique analytique permettant directement d'atteindre cette concentration, il faut donc avoir recours à son estimation par l'analyse des données expérimentales.

Ces techniques analytiques et le modèle chimique mis au point ont été appliqués pour l'analyse des propriétés de différentes matières organiques naturelles et extraites (i.e. acides fulviques et humiques standard), d'origines variées (eaux douces, estuariennes, marines). Les résultats obtenus ont montré que:

- (i) le modèle chimique mis en place, basé sur l'utilisation de *quasi-particules* de type (II), peut effectivement permettre de simuler les propriétés de complexation de MON vis-à-vis de Cd et Pb, mais également la compétition de ces deux métaux, ceci même avec une technique de traitement de données moins élaborée que *PROSECE*, i.e. un couplage du logiciel de spéciation *MINEQL* à un simplex modulé (*Multisimplex 2.1*).

- (ii) l'analyse des propriétés d'acidité de MON au cours d'une année entière d'échantillonnage sur La Seine (programme Seine Aval2), propriétés modélisées par un set de *quasi-particules* de type (I), permet de suivre le comportement de la MON étudiée. Ces résultats, couplés à des mesures de fluorescence et de concentrations en COD, POC, *chlorophylle a* et phaeopigments, ont permis d'interpréter les variations en termes d'origine, de composition et de réactivité, et donc d'un peu mieux appréhender le rôle de la MON dans un écosystème estuarien, donc soumis à des variations importantes de ses conditions physico-chimiques et biologiques.
- (iii) la teneur en COD d'un échantillon a une influence notable sur les propriétés d'acidité caractérisées lors de la modélisation des courbes de dosage acido-basique, influence observée sur des MON extraites mais aussi sur des mélanges de molécules acides simples (acétate, phénol). En effet, lorsque cette teneur diminue, les densités en sites acides déterminées augmentent, nettement plus pour les sites de type phénolique que ceux de type carboxylique. Ainsi le ratio carboxylique/phénolique décroît lorsque la concentration en COD, donc en MON, diminue. Ce phénomène, dont l'origine exacte n'a pas pu être déterminée, entraîne une limitation pratique du nombre de moles totale en sites acides, définie à 0.04 meq, en dessous de laquelle les résultats sont biaisés.
- (iv) le logiciel *PROSECE*, initialement conçu pour optimiser des paramètres de complexation et/ou d'acidité, peut également permettre de modéliser des courbes de quenching de fluorescence, et donc caractériser des fluorophores complexants naturels en optimisant leur concentration, leur constante de complexation et leurs rendements quantiques. Ceci devrait permettre d'analyser un peu plus rigoureusement les données expérimentales obtenues par cette technique analytique, cette dernière étant complémentaire à la DPASV de par sa fenêtre analytique différente et l'analyse de la spéciation du ligand et non du métal.
- (v) la caractérisation des propriétés de complexation de MON d'origine marine, dans le cadre du GDR MONALISA, indispensable pour appréhender leur rôle vis-à-vis des contaminants métalliques, semble possible à partir des techniques analytiques développées dans ce travail. Cette étude, encore à ses débuts, nécessite une extraction de la MON minimisant ses modifications, afin d'analyser correctement les interactions MON-métaux et MON-proton sans les perturbations générées par la présence de sels d'origine marine à des concentrations élevées.

Ces résultats ont aussi permis de valider le modèle chimique et les techniques d'analyses utilisés sur quelques échantillons d'eaux naturelles et matières organiques extraites. Il reste donc à les appliquer de manière systématique à d'autres échantillons naturels, afin de caractériser leurs propriétés de complexation et d'acidité. Toutefois, l'étude des interactions de la MON n'étant pas toujours aisée, ce travail de thèse n'a évidemment pas pu résoudre tous les problèmes d'analyse et de modélisation, mais il a tenté une nouvelle approche et a apporté quelques solutions dans un espoir d'analyse la plus rigoureuse possible.

Dans le futur, il serait intéressant de pouvoir soit comparer, soit compléter les résultats obtenus par ces techniques avec ceux d'autres types de techniques analytiques, voire d'autres types de modélisation des propriétés de la MON, comme par exemple le modèle continu NICCA-Donnan, s'appliquant à d'autres types de fenêtres analytiques.

LISTE DES ANNEXES:

Annexe **II.1**: Code du logiciel *PROSECE* et des fonctions annexes (Octave-Linux)

Annexe **II.2**: Garnier C., Pižeta I., Mounier S., Benaïm J.Y., Branica M., 2004a, Influence of the type of titration and of data treatment methods on metal complexing parameters determination of single- and multi-ligand systems measured by stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 505, 263-275

Annexe **III.1**: Section d'un projet, programmé sous GPES, pour réaliser une titration en mode logarithmique: premier ajout (20 μ L) de la burette1 (1 μ M), mesures de Chronopotentiométrie-pH et DPASV

Annexe **III.2**: Feuille de calcul Excel développée pour la déconvolution des pics de DPASV

Annexe **IV.1**: Garnier C., Mounier S., Benaïm J.Y., 2004b, Metal logarithmic scale titration as a tool for complexing ligand distribution determination: an application by DPASV, *Environmental Technology*, 25, 589-599

Annexe **IV.2**: Garnier C., Mounier S., Benaïm J.Y., 2004c, Influence of dissolved organic carbon content on modelling natural organic matters acid-base properties, *Water Research*, under the press

ANNEXE II.1:

Code du logiciel *PROSECE* et des fonctions annexes (Octave-Linux)

PROSECE: PRogramme d'Optimisation et de SpEciation Chimique dans l'Environnement

```
'----- PRogramme d Optimisation et de SpEciation Chimique dans l Environnement
(PROSECE) -----'

clear all
clear

global Nc  Ns Co K Kini Ntot Ctot Nsmes Ncmes  Nexp Nexpbis dillution VT simmin simmax
          ttmin ttmax compteurnewton

load calcul1/Ntot; %molarité des composants principaux
load calcul1/Nc; %nombre de composants principaux
load calcul1/Ns; %nombre d espèces chimiques (i.e. composants principaux + composés)
load calcul1/Ncmes; %nombre de composants principaux mesurés
load calcul1/Nsmes; %nombre de composés mesuré
load calcul1/cmcs; %concentrations des composants/composés mesurés (Ncmes+Nsmes)
load calcul1/cini; %concentrations libres initiales des composants principaux
load calcul1/sim; %matrice simplex (variations sur K et Ntot de l'ordre de 10%)
load calcul1/simplex; %nombre de points (lignes) du simplex
load calcul1/Nexp; %nombre de points expérimentaux
load calcul1/Nexpbis; %nombre de points expérimentaux utilisés pour l optimisation
                    (<=Nexp)
load calcul1/VT; %volume total pour chaque point expérimental (utilisé pour la
                    dillution)
load calcul1/Co; %matrice des alpha
load calcul1/Kini; %matrice des K (réaction d'association)
load calcul1/iterationlimite;
load calcul1/stdlimite;

'***** INITIALISATION *****'

global Nquantinc Nconstinc

more off
ignore_function_time_stamp="all" ;

'---- composants de base ----'
ligne=zeros(1,Nc);
ligne=ligne+1;
dillution=1./VT*ligne;
Ctot=Ntot.*dillution; %calcul les Ctot à partir des Ntot et de la dillution

'----- composees et constantes d equilibre associees -----';
% créé une matrice des constantes (Nexp,Ns) à partir du vecteur Kini
K=zeros(Nexp,Ns);
for i=1:Ns-Nc
                    K(:,Nc+i)=Kini(i);
end;
K=K*log(10);
Kmodif=zeros(Nexp,Ns); %matrice prenant en compte la modification de K pour le calcul
                    de mixture

'----- composition initiale des mixtures -----'
c=zeros(Nexp,Nc);
c(:,:)=cini(:,:);
cmin=zeros(Nexp,Nc);
cmin(:,:)=cini(:,:);

'----- quantites ou constantes a optimiser (sim,simplex) -----'
% dans cet exemple x qte=[composant]tot et y constantes sont a trouver:
```



```

% le simplexe est donc forme de x+y+1 points
% taille du simplexe, sa position initiale suit: x+y+1 points (q,k) dans R^Ns

'***** FIN D INITIALISATION *****'

'***** RECHERCHE DE NOUVEAU DES COMPOSITIONS SOUS LA CONJECTURE *****'

'--- recherche des compositions d equilibre pour la premiere experience---'
T=equil(c(1,:), K(1,:),Ctot(1,:));
c(1,:)=T;
'--- recherche des compositions d equilibre pour les autres experiences ---'
for i=2:Nexp
T=equil(T, K(i,:),Ctot(i,:));
c(i,:)=T;
end

'--- calcul des compositions d equilibre des composés ---'
mix=mixture(c,K);

'***** comparaison avec l experience *****'
ttt=zeros(1,simplex);
ttt(1)=comparebis(mix,cmes);

'***** OPTIMISATION DE LA CONJECTURE *****'
motionarret=1e-5; %precision de l optimisation
% On a suppose que la conjecture n etait pas trop mauvaise et que
% l on pouvait garder les compositions comme reference
% Sinon reinitialiser composition a chaque tour de boucle
% et ramener le simplexe en 0.

motion=1;old_imax=0;color='4';old_imin=0;
for i=1:simplex %calcul l erreur pour tous les points du simplexe sauf le premier
compteurnewton=0;
Kmodif(:,Nc+1:Ns)=ones(Nexp,1)*(K(1,Nc+1:Ns)+sim(i,Nc+1:Ns)); %modifie la matrice
Kmodif pour tenir compte des dK du simplexe
ttt(i)=comparebis(mixture(modif(c,sim(i,:)),Kmodif),cmes); %calcul le vecteur
erreur pour chaque point du simplexe
if compteurnewton>0
printf("Mauvaise sortie de Newton: %d ",compteurnewton);
end
end
ttt;
tttini=ttt;
iteration=0;
ttmin=0;
ttmax=0;
simmin=zeros(1,Ns);
simmax=zeros(1,Ns);
deviationstandard=mean(std(sim)./abs(mean(sim)+1E-20)*100);
resdeviationstandard=deviationstandard;

while ((iteration<iterationlimite) && (log10(deviationstandard)>stdlimite)) % tant que
la deviation standard du simplexe n'est pas suffisamment faible ou que le nombre d
iterations ne depasse pas le nombre limite
[tmax, imax]=max(ttt); %cherche l erreur max
[tmin, imin]=min(ttt); %cherche l erreur min
iteration=iteration+1;
ttmin(iteration)=tmin;
simmin(iteration,:)=sim(imin,:);
ttmax(iteration)=tmax;
simmax(iteration,:)=sim(imax,:);
%sim(imax,:)
printf("nombre d'iterations: %d ",iteration);
printf("Erreur = %f ..... ",tmax); % affiche l erreur max
if imax~=old_imax % ce point ne vient-il pas d etre cree ?
cof=1.2; %1.2
printf("deplacement du point %d du simplexe de ", imax);% le point symetrique
else
cof=0.5; %0.5
printf("recul et reduction du simplexe, deplacement du point %d de ",imax); %la
taille diminue pour eviter l oscillation

```

```

end
new_point=1/(simplex-1)*((1+cof)*sum(sim)-(1+cof*simplex)*sim(imax,:));
for j=1:Nc-1 %toutes les concentrations sauf HT
    if (Ntot(1,j)+new_point(j))<0 %pour eviter les mauvaises sorties de Newton (i.e.
Ntot+modif<0)
        new_point(j)=-Ntot(1,j)+1E-18;
        printf("Concentration optimisée <0 pour l'espèce n°: %d ",j);
    end
    j=j+1;
end
motion=norm(new_point-sim(imax,:)); printf("%f\n",motion);% calcul du déplacement
sim(imax,:)=new_point; % modification du simplex
c=modif(c,sim(imax,:)); %concentrations à l'équilibre pour imax
Kmodif(:,Nc+1:Ns)=ones(Nexp,1)*(K(1,Nc+1:Ns)+sim(imax,Nc+1:Ns)); %modifie la
matrice Kmodif pour tenir compte des dK du simplex
ttt(imax)=comparebis(mixture(modif(c,sim(imax,:)),Kmodif),cmes);
if compteurnewton>0
    printf("Mauvaise sortie de Newton: %d ",compteurnewton);
    compteurnewton=0;
end
end
ttt
old_imax=imax;
deviationstandard=mean(std(sim)./abs(mean(sim)+1E-20)*100);
resdeviationstandard(iteration)=deviationstandard;
printf("déviatiOn standard moyenne de sim = %f ",deviationstandard);
end

'-PRogramme d Optimisation et de SpEciation Chimique dans l Environnement (PROSECE)--'

'----- Affichage des résultats -----'

'Composition d équilibre'
c=modif(c,sim(imin,:));
Kmodif(:,Nc+1:Ns)=ones(Nexp,1)*(K(1,Nc+1:Ns)+sim(imin,Nc+1:Ns)); %modifie la matrice
Kmodif pour tenir compte des dK du simplex
mix=mixture(c,Kmodif);

'Erreur residuelle'
comparebis(mix,cmes);

'Nombre d iterations'
iteration;

'Constantes et concentrations optimisees:'
' à ajouter aux quantites totales (mole)'
resAjNtot=sim(imin,1:Nc);
' à ajouter aux constantes d activations (logK)'
resAjK=sim(imin,Nc+1:Ns)/log(10);

'Sauvegarde'

save calcul1/resdeviationstandard resdeviationstandard
save calcul1/resiteration iteration;
save calcul1/resmotion motion;
save calcul1/ressimmin simmin;
save calcul1/ressimmax simmax;
save calcul1/resttmin ttmin;
save calcul1/resttmax ttmax;
save calcul1/resmix mix;
save calcul1/resAjNtot resAjNtot;
save calcul1/resAjK resAjK;
save calcul1/resttt ttt;
save calcul1/ressim sim;

```

fonction comparebis: calcul du *bias* entre les valeurs expérimentales et calculées par *PROSECE* (par exemple le pH) (II.D.2.e)

```

function n=compare(c,cmes) % '***** COMPARAISON THEORIE-MESURES *****'

global Nc Ns Ncmes Nsmes Nexpbis Nexp compteurnewton

```

```

n=0;
for i=1:Nexpbis
    n=n+norm(log(c(i,Nc-Ncmes+1:Nc+Nsmes))-log(cmes(i,:)));
end

```

fonction E: calcul de l'écart au bilan de masse (II.D.2.c.4/)

```

function R=E(C,Kloc,Ctotloc)

global Co
Mfp=2.e-16;

RR=Ctotloc-exp(log(C)*Co'+Kloc)*Co;
R=RR.*(abs(RR./Ctotloc)>Mfp*max(abs(Co*diag(C)))./Ctotloc);

```

fonction equil: calcul de l'équilibre, i.e. de la spéciation chimique par minimisation de l'écart au bilan de masse calculé par la fonction *E* (II.D.2.c.4/)

```

function C=equil(Cloc,Kloc,Ctotloc)

global Co compteurnewton
peu=1e-60;
amortissement=0.5;
itermax=1000; %normalement 1000
arret=1e-13;
more off
ignore_function_time_stamp="all" ;

R=E(Cloc,Kloc,Ctotloc);
CCloc=Cloc;itr=0;
while ((max(abs(R))>arret) && (itr<itermax))
    itr=itr+1;
    R=E(CCloc,Kloc,Ctotloc);
    CCloc=CCloc+amortissement*R/(((exp(log(CCloc)*Co'+Kloc))'*(1 ./CCloc)).*
Co)'*Co);
    CCloc=max(CCloc,peu);
    if itr>999 %normalement 999
        compteurnewton=compteurnewton+1;
    end
end
C=CCloc;

```

fonction mixture: calcul des concentrations en *composés S* à partir des concentrations en *composants principaux C* calculés par la fonction *equil*

```

function mix=mixture(C,Kloc)

global Co compteurnewton

mix(:,:)=exp(log(C)*Co'+Kloc);

```

fonction modif: modifie les concentrations et les constantes inconnues, à partir du simplex, puis recalcul l'équilibre

```

function newcomp=modif(composition,modifications)

global Nexp Nc Ns Ntot Ctot K dillution compteurnewton
compteurnewton=0;

for i=1:Nexp
    KK=K(i,:);
    KK(Nc+1:Ns)=KK(Nc+1:Ns)+modifications(Nc+1:Ns);
    NNtot=Ntot(i,:)+modifications(1:Nc);
    CC=NNtot.*dillution(i,:);
    newcomp(i,:)=equil(composition(i,:), KK,CC);
end

```

ANNEXE II.2:

Garnier C., Pižeta I., Mounier S., Benaïm J.Y., Branica M., 2004a, Influence of the type of titration and of data treatment methods on metal complexing parameters determination of single- and multi-ligand systems measured by stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 505, 263-275

ANNEXE III.1:

Section d'un *projet*, programmé sous GPES, pour réaliser une titration en mode logarithmique: premier ajout (20 µL) de la burette1 (1 µM), mesures de Chronopotentiométrie-pH et DPASV

```
;A1,B1
Burette!DoseVolume(1,.020)
Dataset!AutoNum = 1
Dataset!AutoReplace("x")

AutomaticElectrode("OFF")
DIO!SetByte("P1","A","6")
Utility!Delay = 120
Repeat(5)
    DIO!SetByte("P1","A","1")
    Utility!delay=1
    DIO!SetByte("P1","A","5")
Endrepeat
DIO!SetByte("P1","A","7")
Procedure!Method = CM
Procedure!Open("C:\Autolab\Cédric\Procédure\CPavecph3300s")
Procedure!Start
Dataset!SaveAs("C:\Autolab\Cédric\Résultats\MON\Cd\MONALISA160204\CP
B1A01Mx")
DIO!SetByte("P1","A","5")
Repeat(3)
    AutomaticElectrode("OFF")
    DIO!SetByte("P1","A","7")
    Utility!Delay = 200
    DIO!SetByte("P1","A","5")
    AutomaticElectrode("ON")
    Procedure!Method = VA
    Procedure!Open("C:\Autolab\Cédric\Procédure\DPASV pH8 600s")
    Procedure!Start
    Dataset!SaveAs("C:\Autolab\Cédric\Résultats\MON\Cd\MONALISA160204\VA
B1A01Mx")
EndRepeat
```

ANNEXE III.2: Feuille de calcul Excel développée pour la déconvolution des pics de DPASV

Modélisations des pics de DPASV

Résultats

Parametres d'optimisation

	Cd	Pb	Pb ²⁺			
E	-0.576	-0.470	-0.441	575.6	469.7	441.0
I	3.776E-09	7.598E-09	4.811E-09	8.42	8.12	8.3
P	0.062	0.049	0.024	62.1	48.8	23.7

limites	Emin	Emax	
total	-0.700	-0.340	bias solveur
Cd	-0.700	-0.55	3.288
Pb	-0.55	-0.420	
Pb ²⁺	-0.420	-0.340	

	Cd	Pb	Pb ²⁺
lmax			
mes	3.986E-09	8.017E-09	8.060E-09
calc	3.986E-09	8.018E-09	8.060E-09
bias	0.0	0.0	0.0
bias A	0.0		

ligne de base	A	B	C	D
Eminmin	-0.740	-0.74	-0.740	-0.740
Eminmax	-0.700	-0.700	-0.700	-0.700
Emaxmin	-0.340	-0.34	-0.340	-0.340
Emaxmax	-0.290	-0.29	-0.290	-0.290

	E	I	PCd	Emin	Emax	Aire calc
Cd	-0.576	3.776E-09	0.062	-0.700	-0.550	1.829E-10
	-0.576	0.000	0.062	-0.700	-0.550	0.000
	-0.576	8.42297	62.063244	-0.700	-0.550	

	E	I	PPb	Emin	Emax	Aire calc
Pb	-0.470	7.598E-09	0.049	-0.550	-0.420	4.232E-10
	-0.470	7.59814E-09	0.048840718	-0.55	-0.42	4.23216E-10
	-0.470	469.70605	48.840718	-0.55	-0.42	

	E	I	PPb	Emin	Emax	Aire calc
Pb ²⁺	-0.441	4.811E-09	0.024	-0.420	-0.340	4.701E-11
	-0.441	4.81076E-09	0.023705818	-0.420	-0.34	4.70078E-11
	-0.441	440.96166	23.705818	-0.420	-0.34	

Total	Aire calc	Aire mes	bias solveur	bias Atot	bias pictot
	6.531E-10	6.53139E-10	3.288	0.0	163.4
	6.531E-10	6.53139E-10	3.288257235	0.001472127	163.4108085

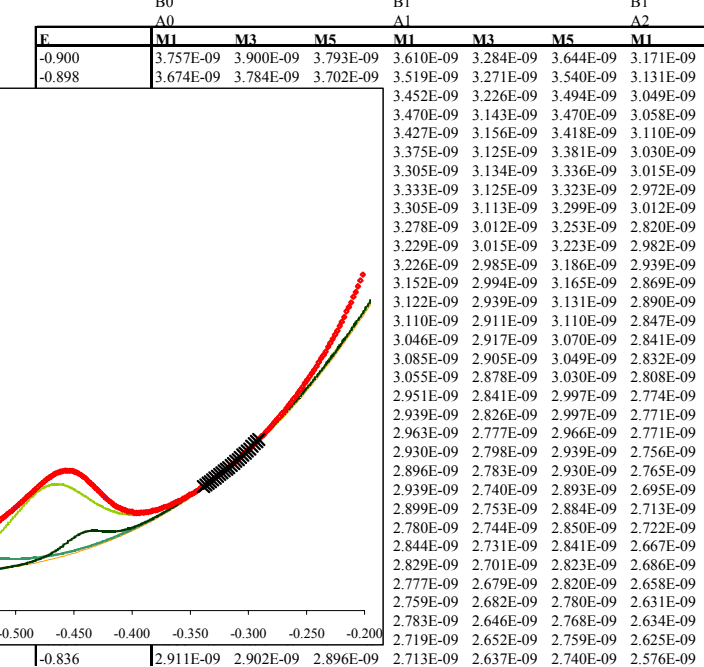
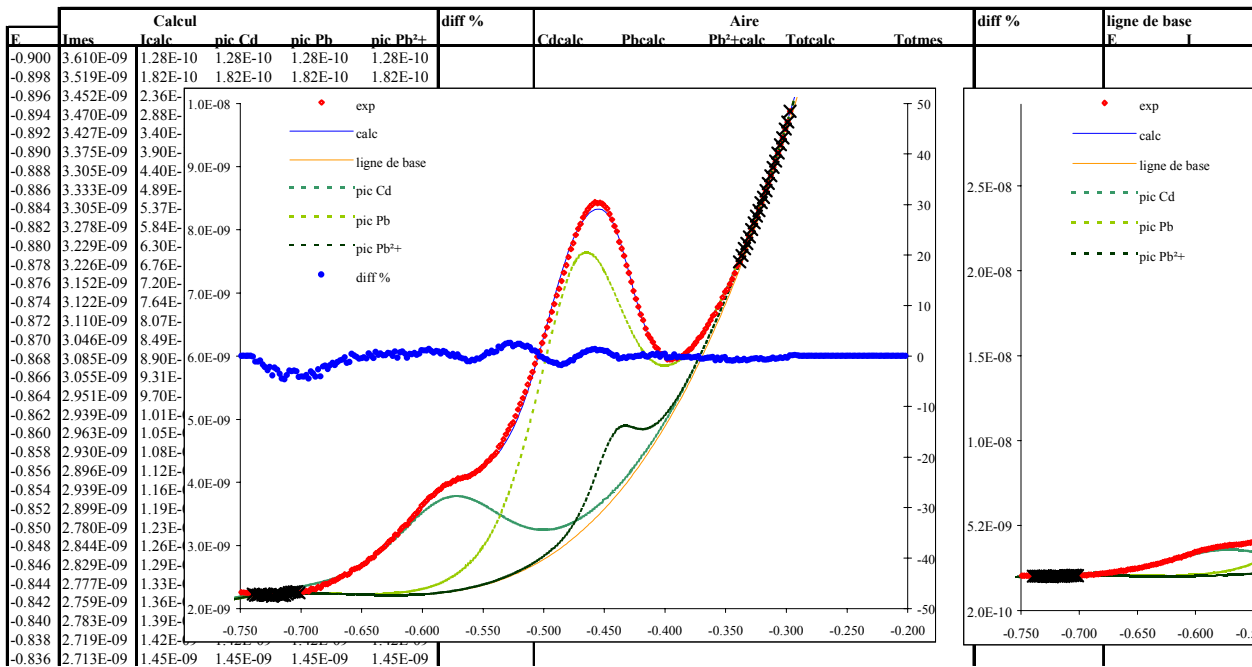
ligne de base	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Eminmin	-0.740	-0.740	-0.740	-0.740	-0.740	-0.740	-0.740	-0.740	-0.740
Eminmax	-0.700	-0.700	-0.700	-0.700	-0.700	-0.700	-0.700	-0.700	-0.700
Emaxmin	-0.340	-0.340	-0.340	-0.340	-0.340	-0.340	-0.340	-0.340	-0.340
Emaxmax	-0.290	-0.290	-0.290	-0.290	-0.290	-0.290	-0.290	-0.290	-0.290

	E	I	PCd	Emin	Emax	Aire calc
Cd	-0.575	3.707E-09	0.068	-0.700	-0.550	1.637E-10
	-0.575	3.793E-09	0.068	-0.700	-0.550	1.751E-10
	-0.575	3.800E-09	0.068	-0.700	-0.550	1.735E-10
	-0.575	3.776E-09	0.062	-0.700	-0.550	1.829E-10
	-0.575	3.910E-09	0.061	-0.700	-0.550	1.942E-10
	-0.575	4.134E-09	0.061	-0.700	-0.550	1.980E-10
	-0.575	4.007E-09	0.060	-0.700	-0.550	2.016E-10

	E	I	PPb	Emin	Emax	Aire calc
Pb	-0.473	4.770E-09	0.069	-0.550	-0.420	1.752E-10
	-0.473	4.870E-09	0.069	-0.550	-0.420	1.843E-10
	-0.473	4.891E-09	0.069	-0.550	-0.420	1.841E-10
	-0.473	4.770E-09	0.069	-0.550	-0.420	1.752E-10
	-0.473	7.598E-09	0.049	-0.550	-0.420	4.232E-10
	-0.473	7.805E-09	0.048	-0.550	-0.420	4.342E-10
	-0.473	8.077E-09	0.048	-0.550	-0.420	4.371E-10
	-0.473	8.568E-09	0.048	-0.550	-0.420	5.002E-10

	E	I	PPb	Emin	Emax	Aire calc
Pb ²⁺	-0.439	4.207E-09	0.026	-0.420	-0.340	2.631E-13
	-0.439	4.278E-09	0.026	-0.420	-0.340	9.137E-13
	-0.439	4.277E-09	0.026	-0.420	-0.340	5.725E-14
	-0.439	4.811E-09	0.024	-0.420	-0.340	4.701E-11
	-0.439	4.795E-09	0.024	-0.420	-0.340	4.473E-11
	-0.439	5.046E-09	0.024	-0.420	-0.340	4.320E-11
	-0.439	5.616E-09	0.025	-0.420	-0.340	8.766E-11

Total	Aire calc	Aire mes	bias solveur	bias Atot	bias pictot
	3.392E-10	3.603E-10	4.383	0.0	182.9
	3.392E-10	3.577E-10	4.453	0.0	185.2
	3.392E-10	3.567E-10	3.979	0.3	173.2
	6.531E-10	6.783E-10	3.288	0.0	163.4
	6.783E-10	6.783E-10	3.131	0.0	157.6
	7.894E-10	7.894E-10	3.401	0.0	169.3



ANNEXE IV.1:

Garnier C., Mounier S., Benaïm J.Y., 2004b, Metal logarithmic scale titration as a tool for complexing ligand distribution determination: an application by DPASV, *Environmental Technology*, 25, 589-599

METAL LOGARITHMIC SCALE TITRATION AS A TOOL FOR COMPLEXING LIGAND DISTRIBUTION DETERMINATION : AN APPLICATION BY DPASV

TITRATION EN MODE LOGARITHMIQUE COMME METHODE DE DETERMINATION D'UNE DISTRIBUTION DE LIGANDS : UNE APPLICATION PAR DPASV

Cédric GARNIER*, **Stéphane MOUNIER** AND **Jean Yves BENAÏM**

Laboratoire PROTEE, Université du SUD – Toulon - Var, BP 20132, 83957 La Garde Cedex, FRANCE

ABSTRACT

A new logarithmic scale titration is proposed for the characterisation of natural organic matter-trace metals interactions in natural systems. The Suwannee River Fulvic Acid complexation with Cd and Pb ions has been analysed by this technique, using Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV) for labile metal concentrations measurement. Results of titrations have been modelled by four ligands. Their complexing properties (C_{Li} , K_i^{Cd} , K_i^{Pb}) have been determined by a non-linear optimisation based on the speciation program MINEQL, coupled with a simplex. These ligands were called "very weak, weak, strong and very strong" with respect to their complexing constants (K_i^{Cd} , K_i^{Pb}) ranging from 10^4 to 10^{11} . The obtained ligands concentrations (C_{Li}) are respectively 1.9 μ M, 150 nM, 25.1 nM and 21.1 nM for a 7.9 ppm carbon content. Moreover, this model takes account of the pH dependency and metals competition respectively by experiments at pH 7.8 and 4.6, and by definition of stability constants for each ligand toward each analysed metal. As a conclusion, the authors suggest a systematic use of the logarithmic scale titrations when full characterisation of the metal-organic matter interactions is necessary.

Keyword: Cadmium; Lead; Organic ligands; Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry; Logarithmic scale titrations

RESUME

Une nouvelle technique d'ajouts en mode logarithmique est proposée pour la caractérisation des interactions entre les métaux traces et la matière organique (MO) dans les milieux naturels. Ainsi, la complexation des ions métalliques Cd et Pb par l'Acide Fulvique Suwannee River (AFSR) a été analysée par cette technique d'ajout, en utilisant la méthode analytique Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV) pour mesurer les concentrations en Cd et Pb labiles. Les titrations réalisées ont été modélisées par quatre types de ligands, dont les propriétés de complexation (C_{Li} , K_i^{Cd} , K_i^{Pb}) ont été déterminées par une optimisation non-linéaire basée sur le programme de spéciation MINEQL couplé à un simplex. Ces ligands ont été nommés « très faible, faible, fort et très fort » au regard de leurs constantes de complexation (K_i^{Cd} , K_i^{Pb}) réparties entre 10^4 et 10^{11} . Les concentrations (C_{Li}) en ligands obtenues sont respectivement de 1,9 μ M, 150 nM, 25,1 nM et 21,1 nM pour une concentration en carbone de 7,9 ppm. De plus, ce modèle prend en compte la compétition entre les métaux traces, vis-à-vis de la MO, en attribuant à chaque ligand une constante de complexation vis-à-vis de chaque métal étudié. La dépendance vis-à-vis du proton est estimée à partir d'expériences réalisées à pH 7,8 et 4,6. Comme conclusion, les auteurs suggèrent l'utilisation de titrations en mode logarithmique pour une complète caractérisation des interactions entre les métaux traces et la matière organique.

Mots-clés: Cadmium; plomb; ligands organiques; Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry; titration en mode logarithmique

INTRODUCTION

De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer les interactions entre les métaux traces et la matière organique naturelle (MON). Elles conditionnent souvent la toxicité et/ou la biodisponibilité de ces métaux vis-à-vis des microorganismes. La MON est hautement hétérogène du point de vue structural et donc de ses sites complexants. En effet, de part les nombreuses origines de la MON (biologique, pédogénique, anthropique), il a été montré que seuls environ 20% sont des molécules organiques de structures et donc de réactivité analysables. Les autres composantes de la MON sont des macro-polymères, de grandes tailles, comportant un nombre important de groupements fonctionnels, de propriétés difficilement identifiables et caractérisables [1,2]. En ce sens, une majorité d'études visant à modéliser les propriétés de la MON ne tiennent pas compte de la structure exacte de ses groupements complexants mais les représentent par des entités mathématiques (sites, ligands, ...) [3-6]. Ces dernières permettent alors de simuler les propriétés de la MON vis-à-vis des éléments analysés : proton, métaux traces, cations majeurs, ... Chacune de ces entités simule les propriétés d'une classe de groupements fonctionnels de la MON, présentant des propriétés voisines. La plupart des approches portent sur l'estimation de la capacité complexante de la MON (C_L) et la constante de complexation (K) associée à un équilibre thermodynamique 1:1 entre le ligand considéré et le métal [7-9]. Ainsi, dans une étude récente [10] compilant l'ensemble des données de complexation par les métaux traces (Cu, Cd, Pb, Zn) et la MON, les auteurs ont montré que le comportement des ions métalliques dans les eaux naturelles peut être expliqué par une grande variété de K et C_L . Compte tenu de la diversité des techniques d'analyse utilisées (ASV, CSV, ISE, quenching de fluorescence, DGT...) et des modélisations appliquées (modèles continus ou discrets), les propriétés de complexation obtenues sont en effet difficilement comparables. D'autant que les auteurs mentionnent rarement la teneur en carbone organique dissous (COD) de leurs échantillons, représentant la quantité de MON, laquelle varie de quelques ppm à quelques centaines de ppm de C [11]. Les sites complexants détectables dépendent aussi de la gamme de concentration analysable (fenêtre analytique) par la technique utilisée.

Les techniques voltammétriques sont souvent utilisées afin d'estimer la spéciation des métaux par la MON. Elles sont suffisamment sensibles pour déterminer la quantité de ligands organiques complexant naturellement les métaux traces. Parmi ces méthodes, deux sont fréquemment utilisées, la DPASV et la CSV. La première permet de mesurer, grâce à la formation d'un amalgame sur une goutte de mercure lors d'une étape de préconcentration, une intensité proportionnelle à la concentration en métal labile (Cu, Pb, Cd ou Zn). Cette dernière est la somme de la concentration en métal libre et des

concentrations en complexes métalliques électrochimiquement labiles à la goutte (par approximation, l'ensemble des complexes inorganiques : $CdCl_2$, $CdCO_3$...) [12]. La CSV est quant à elle basée sur la formation d'un complexe entre le métal et un ligand prédéfini ajouté à l'échantillon puis l'adsorption de ce complexe à la surface de la goutte. Cette technique est plus sensible que la DPASV et elle permet de doser un grand nombre de métaux ne formant pas d'amalgames (Co, Ni, Cr, U, V...) [7,13]. Cependant la CSV ainsi que la DPASV « à compétition de ligand » dépendent des valeurs de constantes de stabilité de la littérature, i.e. les propriétés de complexation et d'adsorption des ligands ajoutés vis-à-vis des métaux, ne sont utilisables que dans des conditions précises (gamme de pH, tampon, type d'analyse...) et ont une fenêtre analytique restreinte [14].

Le but de cette étude est de présenter une nouvelle méthode de détermination des propriétés de complexation de la MON vis-à-vis du cadmium et du plomb, permettant d'améliorer la prédiction de la spéciation des métaux traces et de la MON dans un milieu naturel. Cette méthode est basée sur des ajouts réalisés en mode logarithmique (i.e. ajouts dosés à incréments constants en pM_T) et la mesure de la concentration en métal labile par DPASV, ceci afin de couvrir la plus large fenêtre analytique possible. Des graphiques log-log ont été préférés aux représentations classiques $[M_{labile}] = f([M_T])$ car ils permettent de mieux appréhender l'amplitude de la complexation MON-métaux ainsi que la justesse de la modélisation, sur toute la fenêtre analytique. Le modèle d'équilibre développé pour traiter les données expérimentales, reposant sur un modèle discret de complexation MON-métal 1:1 à plusieurs sites, est basé sur un calcul d'optimisation des propriétés de complexation de ces sites, utilisant MINEQL, pour le calcul de spéciation, et un simplex modulé (MultiSimplex 2.1) pour l'optimisation. Ces sites sont des entités mathématiques, caractérisées par des paramètres de complexation, indépendantes de la structure chimique exacte des MON étudiées.

MATERIELS ET METHODES

Matériel

Les voltammogrammes sont enregistrés sur un voltamètre Autolab (Eco Chemie) connecté à une électrode à goutte de mercure statique (SMDE, Stand Metrohm 663VA, surface de goutte : $0,52mm^2$). La cellule voltamétrique est en verre, thermostatée à $25 \pm 0,1^\circ C$, et les solutions sont agitées dans la cellule à l'aide d'une tige en PTFE tournant à la vitesse de 2000 tr/min. Les potentiels sont donnés en prenant comme référence une électrode Ag/AgCl (AgCl saturé à 3M KCl) et une électrode auxiliaire en graphite. Le système est installé sous une hotte à flux laminaire et contrôlé par le logiciel EAS2 (Eco Chemie). Les valeurs de pH sont déterminées par un pHmètre PHM Meterlab et une électrode de verre

combinée PHC3001-9 Radiometer étalonnée à l'aide de tampons Hanna Instrument de pH 4,01, 7,01, 10,01.

Réactifs

Tous les réactifs sont stockés dans des bouteilles Nalgene préalablement nettoyées pendant au moins 4 jours dans HNO₃ 10% puis rincées abondamment à l'eau MilliQ. L'eau ultrapure MilliQ a été utilisée pour le rinçage et la préparation des solutions. Les solutions de Cd²⁺ et Pb²⁺ à 1, 10, 100 et 1000 μM ont été préparées à partir de Cd(NO₃)₂·4H₂O et Pb(NO₃)₂ (Merck, pour analyses). Le tampon borax ([HNO₃] = 0,581 M, [Na₂B₄O₇] = 0,355 M) a été préparé à partir d'HNO₃ 70 % (J.T. Baker) et Na₂B₄O₇·10H₂O (Merck, pour analyses), le tampon acétique ([CH₃CO₂H] = 1 M, [CH₃CO₂Na] = 1 M, [NaNO₃] = 5M) à partir de CH₃CO₂Na (Merck, pour analyses) et de CH₃CO₂H (Prolabo, pour analyses). La solution d'acide fulvique (7,9 mg.l⁻¹ en COD), analysée en DPASV, a été préparée à partir d'Acide Fulvique Suwannee River (AFSR 1S101F, IHSS) maintenue à pH 7,8 par le tampon borax ou à pH 4,6 par le tampon acétique. Toutes les solutions sont à la même concentration en NaNO₃ (0,1 M) afin de maintenir la force ionique constante durant les analyses, et sont conservées dans le noir à 4°C.

Procédures Analytiques

Les concentrations initiales en métaux ont été déterminées, après digestion sous UV de la solution brute d'Acide Fulvique Suwannee River, en DPASV par ajouts dosés. Ces valeurs sont nécessaires à la détermination de la spéciation.

Il est généralement admis que la cinétique de complexation des métaux traces avec la matière organique dans les eaux de mer est lente, notamment lors d'étude portant sur des compétitions de ligands. Par exemple, quand de l'EDTA est ajouté à des eaux de mer, le temps d'équilibre a été estimé à 24 h. Une majorité d'études utilisent donc des temps d'équilibre de l'ordre de 24 h [7]. Cependant quelques travaux ont montré des processus de complexation plus rapides. Des cinétiques de complexation vis-à-vis du cadmium de l'ordre de 10 mn sur des eaux naturelles ont ainsi été mises en évidence [16].

Dans nos conditions d'analyse, des expériences complémentaires ont permis de montrer qu'une heure de repos est suffisante à la cinétique de complexation entre AFSR et Cd. Ce phénomène peut être en partie expliqué par l'utilisation de NaNO₃ comme électrolyte, ce dernier entrant peu en compétition avec les métaux traces vis-à-vis de la MON [17].

De ce fait, après 50 min sous agitation à 2000 tr/min puis 10 min de purge sous N₂ saturé en eau et agitation, quatre gouttes de mercure sont éjectées, l'étape de réduction se faisant sur la cinquième. Les conditions d'analyse sont listées dans le tableau 1.

Les titrations, effectuées en mode logarithmique, ont été dupliquées pour Cd et Pb afin d'estimer la

reproductibilité. Chaque expérience dure approximativement 36 h.

L'étude de l'adsorption des acides fulviques et humiques sur une goutte de mercure durant un dépôt en ASV, a montré que les acides fulviques ne sont pas adsorbés sur l'Hanging Mercury Drop Electrode (HMDE) pour des potentiels inférieurs à -0,6 V [18]. En effet, à ces potentiels, la goutte est chargée négativement, donc seuls les groupes positifs (comme les groupes amines) sont attirés. Or, ces derniers sont beaucoup moins présents sur les acides fulviques que sur les acides humiques. Ceci est corrélé à un ratio N/C faible. Comme le ratio N/C de l'AFSR est de 0,014, inférieur à celui décrit par les auteurs (0,027), cet acide fulvique ne devrait pas s'adsorber sur l'électrode au potentiel de dépôt utilisé. Ceci est confirmé par des voltamogrammes ne présentant pas d'anomalies particulières (multi-pics, distorsion de la ligne de base, ...).

Modélisation (MINEQL-Simplex)

Concept des quasi-particules:

Deux catégories principales de modèles ont été développées afin de simuler la complexation de la MON avec les métaux traces [19]. La première repose sur une distribution continue de ligands. Elle passe donc soit par la définition d'une fonction de type : $K=f(C_L)$ [20,21], soit par l'établissement de fonctions d'équilibre différentielles (DEF) [22].

La seconde catégorie réunit les modèles discrets. Dans cette étude, les propriétés de complexation de la MON ont été représentées par une distribution discrète de sites reposant sur la définition de quasi-particules. Le concept de quasi-particules a été proposé par Sposito [21], et diffère du « Humic Ion-Binding Models V » [24]. Une quasi-particule est une entité virtuelle seulement définie par quelques propriétés comme des constantes de stabilité vis-à-vis des métaux traces et/ou du proton, des caractéristiques de fluorescence, mais ce n'est pas une molécule ou un site réel. Une seule quasi-particule présente les caractéristiques d'un site complexant vis-à-vis de plusieurs métaux, avec une constante de complexation propre à chaque métal. L'utilisation d'un ensemble de quasi-particules comme modèle de complexation permet de caractériser les différentes interactions de la MON avec son environnement (acidité, complexation vis-à-vis des métaux traces, compétition du proton, des autres métaux, des éléments majeurs, ...).

L'hypothèse de complexation utilisée pour ce travail est basée sur un modèle de complexation 1:1 entre les métaux et des quasi-particules représentant les ligands de la MON. Une modélisation non-linéaire a été préférée aux techniques de linéarisation [25,26]. En effet, ces dernières sont difficilement applicables aux modèles multi-ligands [27]. Elles nécessitent de tronquer les données, issues du dosage d'une MON, en séries de données recouvrant les intervalles de concentrations C_L attendues. Une étude, comparant les différentes méthodes de traitement de données [28], a montré que les simulations non-linéaires

permettent de nettement améliorer les résultats obtenus, en traitant l'ensemble des données et donc en éliminant le caractère arbitraire qu'est la division d'une courbe en sous-sections quasi-linéaires [27].

Modélisation des propriétés de complexation:

Lorsque le nombre de quasi-particules (ou de ligands) définies est inférieur ou égal à deux, il existe une solution analytique à l'équation $f(M_T, M) = 0$ résultant du système d'équations bilan. On peut donc obtenir une équation du type:

$$M=f(M_T, K_i, C_{Li}) \quad (i)$$

avec:

M, M_T : concentrations en métal labile et métal total

C_{Li}, K_i : capacités complexantes et constantes de stabilité du ligands i .

Le calcul de la spéciation chimique de M est donc trivial. La modélisation consiste alors, par un calcul itératif utilisant un algorithme d'optimisation (par exemple le solveur d'Excel), à optimiser les valeurs (K_i, C_{Li}) à partir des points expérimentaux en minimisant le biais, représentant la somme des erreurs relatives entre l'expérience et la modélisation (Eq. ii):

$$bias = \sum abs(pM_{exp} - pM_{calc}) \quad (ii)$$

avec:

M_{exp}, M_{calc} : concentrations en métal labile expérimentale et calculée

A l'inverse, lorsque le nombre de ligands définis est supérieur à 2, il n'existe pas de solution analytique à l'équation $f(M_T, M) = 0$. La modélisation des données expérimentales issues des titrations en mode logarithmique, repose alors sur l'utilisation d'un programme permettant le calcul de la spéciation des espèces chimiques, ici MINEQL, pour des conditions prédéfinies (i.e. M_T, C_{Li}, K_i^M) par résolution des équations de bilan de masse [29]. MINEQL est ensuite couplé à un programme de Simplex modulé (MultiSimplex 2.1) permettant d'optimiser les valeurs de K_i^M et C_{Li} , afin qu'elles reproduisent au mieux les mesures expérimentales. Le calcul de spéciation tient compte des interactions entre les métaux traces et les ligands inorganiques du système chimique définis.

Ainsi, dans le cas d'un modèle à N quasi-particules, les valeurs initiales de chaque paramètre de complexation ($K_i^{Cd}, K_i^{Pb}, C_{Li}, i = 1 \text{ à } N$) sont préalablement définies ainsi que leurs domaines de variations. $3N+1$ expériences, de K_i^M et C_{Li} différentes, sont alors établies par le Simplex. Chacune est traitée par MINEQL permettant le calcul de $3N+1$ valeurs de biais. Par la suite, de nouveaux sets de paramètres sont calculés (simplex) et simulés (MINEQL) jusqu'à ce qu'un optimum soit atteint. Cet optimum est dépendant des données expérimentales, la variabilité de la mesure par DPASV n'étant pas négligeable. Le set de paramètres de complexation ($K_i^{Cd}, K_i^{Pb}, C_{Li}$) finalement obtenu, définissant les quasi-particules du modèle, est celui qui modélise au mieux le comportement de la MON étudiée lors de titrations logarithmiques par le cadmium et du plomb.

Principe des Ajouts en Mode Logarithmique

La caractérisation des ligands complexants présents sur une matière organique naturelle est dépendante de la justesse des données expérimentales provenant du dosage de l'échantillon par le métal considéré. En effet, il a été montré qu'il était difficile de déterminer plus de deux groupes de ligands à partir d'un jeu de données expérimentales obtenues par DPASV ou CSV [12]. De plus ces travaux estiment qu'il est nécessaire d'avoir des rapports K_i/K_j supérieurs à 10 pour distinguer correctement plusieurs ligands. Ceci est principalement dû à l'importance du facteur $K \times C_L$ sur la détection d'une courbure dans le tracé de $[M]=f(M_T)$ (Fig. 1), identifiable uniquement lorsque $K \times C_L > 1$ [25]. Ainsi il sera impossible de détecter un groupement ligand de $C_L = 10 \text{ nM}$ et $\log K = 6$. Donc dans le cas du cadmium, les constantes de complexation rencontrées étant plus faibles qu'avec Cu ou Hg, la détermination des ligands est rendue plus difficile [3-6].

Il est donc nécessaire de balayer une large gamme de concentrations en métal, par une ou plusieurs techniques d'analyse [30], afin d'avoir une résolution maximale de la complexation du métal par les groupements ligands constituant la MON, que ce soit pour des C_L de l'ordre du nM ou du μM (i.e. les sites actifs dans les gammes de concentrations en métaux du milieu naturel). Parmi les techniques analytiques couramment utilisées, la DPASV à l'avantage de permettre de balayer une large gamme de concentration en métal, donc en ligand, au regard de celle analysable par CSV [14], tout en conservant une limite de détection en accord avec les concentrations naturelles en métaux traces, contrairement aux électrodes sélectives. De plus, le dosage d'une MON par un métal peut être effectué à l'aide de différentes techniques d'ajouts. La plus courante repose sur des ajouts en mode linéaire (incrément constants en M_T). Elle peut donc être réalisée automatiquement, à l'aide d'une burette délivrant toujours le même volume de solution standard de métal. Au contraire, la technique d'ajouts en mode logarithmique, proposée dans cette étude, consiste à ajouter à la solution analysée des volumes de solutions standards correspondant à des incréments constants en pM_T lors de la titration. Pour cela, quatre solutions standards de métal (1, 10, 100 et $1000 \mu\text{M}$), sont nécessaire pour couvrir une gamme de pM_T compris entre 9 et 5,5. L'automatisation des expériences reste possible mais elle nécessite d'utiliser 4 burettes différentes. Par rapport aux ajouts en mode linéaire, il a été montré que le mode logarithmique permettait d'accroître considérablement la justesse des paramètres de complexation modélisable à partir de données expérimentales, ceci quelque soit le type de modélisation utilisée pour traiter ces données [28]. Cette technique d'ajout, couplée aux mesures par DPASV a donc été sélectionnée car elle permet d'accroître la précision sur la définition des propriétés de complexation de matières organiques naturelles, par essence très hétérogènes donc

contenant un grand nombre de sites de propriétés différentes.

Traitement Mathématique des Voltamogrammes Obtenus par DPASV

Comme l'AFSR n'a pas montré d'adsorption significative sur l'HMDE, la modélisation de la ligne de base et des pics (Cd, Pb) a pu être réalisée.

Définition de la ligne de base:

Lors d'un dosage d'une MON par Cd ou Pb, la ligne de base dans la gamme de potentiel d'oxydation de ces 2 métaux est non linéaire, notamment à cause du recouvrement de ces deux pics. La prise en compte de cette non-linéarité est donc nécessaire pour intégrer correctement les pics [31].

Pour chaque voltamogramme une ligne de base est définie par un polynôme du 3^{ème} degré, à partir de cinquante points expérimentaux situés en dehors de l'intervalle de potentiel des pics de Cd et Pb.

Modélisation des pics de Cd et de Pb par des gaussiennes:

Dans nos conditions d'analyse, quand les concentrations en métaux sont faibles et la ligne de base peu perturbée on peut modéliser les pics de Cd et Pb par deux gaussiennes suivant l'équation (iii).

$$I_M = I_M^{\max} \cdot e^{-\left(\frac{(E-E_M)^2}{\sigma_M}\right)} + (A \cdot E_M^3 + B \cdot E_M^2 + C \cdot E + D) \quad (\text{iii})$$

avec:

I_M : intensité due au métal M au potentiel E

I_M^{\max} : valeur maximum d' I_M

E_M : potentiel où I_M atteint la valeur I_M^{\max}

σ_M : terme proportionnel à l'WHHM (Half-Width at Half-Maximum)

A, B, C, D: constantes du polynôme du 3^{ème} degré

Après définition de la ligne de base pour le voltamogramme donné, les paramètres I_M^{\max} , E_M et σ_M sont optimisés afin de modéliser la courbe $I=f(E)$. Toutefois, lors du dosage d'une MON par le Cd, le pic du Pb est modélisé par une gaussienne, intégré, puis l'aire du pic de Cd est calculée suivant l'équation (iv).

$$A_{Cd} = A_T^{\text{exp}} - A_{Pb}^{\text{mod}} \quad (\text{iv})$$

avec:

A_{Cd} : aire calculée de Cd,

A_{Pb}^{mod} : aire du pic de Pb modélisé,

A_T^{exp} : somme des aires des pics expérimentaux (Cd, Pb).

En effet, modéliser le pic de Cd par une gaussienne n'est possible que lorsque $[Cd] < 30\text{nM}$. Lors du dosage d'une MON par Pb, on applique le même protocole en permutant Cd et Pb dans les équations précédentes.

En DPASV, l'intensité du signal mesuré (A_M) est proportionnelle à la concentration en métal labile (M). L'équation $A_M = S_{\text{app}} \cdot M$ définit S_{app} comme étant la sensibilité de l'appareil. Comme le notent Scarano et al. [14], la déviation standard de S_{app} peut

atteindre 25%, du fait même des variations instrumentales. Il est donc nécessaire de déterminer ce coefficient à chaque expérience, à partir des derniers points du dosage (i.e. $[M]_T > 1\mu\text{M}$). En effet, pour ces points on peut supposer que l'on a atteint ou dépassé la capacité complexante totale mesurable de la MON, on a alors:

$$A_M = S_{\text{app}}' \cdot M_T, \text{ avec } S_{\text{app}}' \sim S_{\text{app}}$$

RESULTATS ET DISCUSSION

Titration logarithmiques d'AFSR par Cd et Pb

La Fig. 2 représente un exemple de traitement mathématique d'un voltamogramme obtenu par DPASV. Le voltamogramme présenté est issu du dosage logarithmique d'une solution à 20,3 mg.l⁻¹ d'AFSR par Pb à pH 7,8. Après détermination de la ligne de base, le pic de Cd a été modélisé par une gaussienne. Le pic modélisé de Pb et le pic expérimental total (Pb+Cd) ont ensuite été intégrés pour aboutir à A_{Pb} et A_{Cd} (Eq. iii et iv).

Après traitement de l'ensemble des voltamogrammes et détermination de la sensibilité de l'appareil S_{app} , les courbes $pM=f(pM_T)$ peuvent être tracées (avec: M, M_T : concentrations en métal labile et total; $pX = -\log X$). La figure 3 représente les dosages logarithmiques d'une solution d'AFSR à pH 7,8 par Cd (Fig.3-A) et Pb (Fig.3-B). La relation $pM=pM_T$ représente une titration en absence de complexant (Fig. 3, droite). Plus la courbe expérimentale de dosage s'en écarte, plus la complexation du métal par la MON est importante, i.e. plus le produit $K \times C_L$ est élevé. En comparant les courbes pM du Cd (Fig. 3A) et du Pb (Fig. 3B), il apparaît que le Pb se complexé plus avec l'AFSR que le Cd. Les phénomènes de compétition durant les titrations par Cd et Pb peuvent être appréciés en comparant les concentrations initiales en métaux (Fig.3, lignes horizontales en pointillé) et les courbes pM du métal non titré (Fig.3). Ainsi, la concentration en Pb (Fig.3-A) n'atteint pas sa concentration initiale alors que tout le cadmium semble libéré durant la titration d'AFSR par le Pb (Fig. 3-B). L'écartype moyen sur la mesure en métal labile est relativement faible pour les concentrations en Pb et Cd lors des dosages d'AFSR par Pb et Cd respectivement (inférieur à 0,3% en pM). Par contre, au cours des mêmes dosages, il est plus important pour les concentrations en métaux non-ajoutés, i.e. Cd (Fig.3-B) et Pb (Fig.3-A). Ceci est dû à la difficulté d'estimer correctement $S_{\text{app}}^{\text{Cd}}$ durant la titration d'AFSR par Pb et réciproquement. Un effet cinétique non négligeable aux faibles concentrations en métaux est également observable.

Lorsque l'on compare les résultats obtenus lors de dosages à pH 7,8 à ceux effectués à pH 4,6 (données non communiquées), la complexation AFSR-métaux est plus faible lorsque le pH est plus acide. Ceci est un effet de la compétition entre les métaux et le proton vis-à-vis des groupements complexants présents sur l'AFSR.

Modélisation de la Complexation d'AFSR

Les données expérimentales, issue des titrations en mode logarithmique de l'AFSR à pH 7,8 par Cd et Pb, ont été modélisées par quatre quasi-particules dont les caractéristiques de complexation (i.e. K_i^{Cd} , K_i^{Pb} , C_{Li}) ont été optimisées par les calculs couplés MINEQL-MultiSimplex. Ces quasi-particules sont définies à l'aide des dénominatifs « très fort, fort, faible et très faible » au regard de leurs constantes de complexation (tableau 2A). La Fig. 4 représente les courbes expérimentales et modélisées de ces titrations. Les biais moyens obtenus pour cette modélisation sont respectivement de 0,47 et 0,37 pour le dosage logarithmique d'AFSR par Cd et Pb, soit une erreur moyenne sur la concentration en métal labile de 4,2 et 3,2 %. L'écartype sur la mesure en Cd et Pb labile lors des dosages d'AFSR (Fig.3 A et B) et l'erreur relative sur la modélisation de ces données par les quatre quasi-particules (Fig. 4) suivent une distribution uniforme sur toute la fenêtre analytique, indiquant une modélisation correcte sur l'ensemble de la gamme de titration. Lorsque ces mêmes données sont modélisées par seulement deux quasi-particules (tableau 2B), les biais moyens sont alors respectivement de 1,69 et 0,39, soit 13,3 et 3,4% d'erreur moyenne sur la concentration en métal labile. Les interactions AFSR-métaux sont moins bien modélisées, notamment pour les faibles concentrations ($pM_T > 7,5$) donc dans la gamme des ligands forts ($C_L < 100$ nM). Un modèle à deux quasi-particules n'est pas adapté pour modéliser les propriétés de complexation de cette MON vis-à-vis de Cd et Pb conjointement, dans la fenêtre analytique choisie.

Les résultats obtenus (tableau 2A) pour le modèle à quatre quasi-particules confirment les premières impressions émises lors de l'étude des courbes de titrations d'AFSR par les deux métaux. Les constantes de stabilité d'AFSR vis-à-vis du plomb sont plus fortes que pour le cadmium, ce qui est en accord avec la littérature [3-5,32].

En outre, au vue des valeurs de constantes de stabilité et des capacités complexantes (C_L corrigée de la [AFSR]), la quasi-particule « très fort » est proche des sites forts, représentant les ligands organiques, habituellement déterminés par des modèles à un ou deux ligands en CSV et compétition de ligands [4-6,32]. L'utilisation de quatre quasi-particules pour la modélisation des dosages logarithmiques permet d'affiner la caractérisation des propriétés de complexation de l'AFSR par trois types de ligands supplémentaires.

L'étude présentée ici tient compte non seulement des interactions métaux-ligands inorganiques mais aussi de la compétition entre les différents métaux traces vis-à-vis des sites de complexation de la MON en définissant pour chaque quasi-particule une constante de stabilité par métal. Cependant, un effet de compétition entre les deux métaux vis-à-vis de la MON, matérialisé par les différences de constantes de stabilité des quatre-quasiparticules (tableau 2A), n'a pu après simulation expliquer complètement les

variations des concentrations en métal non titré observées lors des dosages d'AFSR (Fig. 3).

De nombreuses études ont montré qu'il y avait compétition entre les protons et les métaux traces pour la complexation des sites ligands d'une MON [1,33,34]. Un travail similaire a donc été réalisé à partir des titrations d'AFSR par Pb et Cd à pH 4,6. Le but était d'obtenir la variation des constantes de stabilité en fonction du pH. En effet, les constantes conditionnelles (K_{cond}) sont directement reliées au pH suivant les relations (v) à (vi).

$$K_{cond} = \frac{[ML]}{[M][L]} = \frac{[ML]}{\alpha[M_{free}]\alpha'[L_{free}]} = \frac{K_{th}}{\alpha\alpha'} \quad (v)$$

$$\alpha = 1 + \sum_i K_i \cdot [L_i] \quad (vi)$$

$$\alpha' = 1 + \sum_j \frac{[H]^j}{\prod_j K_{a_j}} + \sum_n K_n \cdot [M_n] \quad (vii)$$

avec:

$[M_{free}]$, $[L_{free}]$: concentrations en M et L libres (par opposition aux $[M]$ et $[L]$ labiles),

L_i : ligand inorganique complexant M,

K_{a_j} : j^{ème} constante d'acidité de L,

M_n : cation (majeur, métal trace...) complexant L, en compétition avec M.

L'utilisation du logiciel de calcul des équilibres MINEQL permet, après définition des espèces du milieu, de déterminer la spéciation du métal dans l'échantillon, donc de calculer α (Eq. vi). L'estimation de α' (Eq. vii) est plus difficile puisqu'il représente la spéciation du ligand, ici l'AFSR, dans le milieu, i.e. les interactions de L avec les cations majeurs, les autres métaux traces et le proton (phénomènes de compétition avec M vis-à-vis des sites de complexation de L). Les constantes de stabilité MON-majeurs sont généralement plus faibles que les constantes MON-métaux [1], et conséquemment l'effet de compétition vis-à-vis du métal M est négligeable, d'autant que l'électrolyte utilisé est $NaNO_3$ [17]. De plus, le modèle développé dans cette étude prend en compte les compétitions entre Cd et Pb. Les facteurs influençant principalement α' sont donc le pH et les pKa de L (i.e. de ces sites de complexation). En théorie, quand le pH diminue, α' augmentant, les K_{cond} diminuent aussi, d'autant plus vite que les pKa des sites sont élevés (Eq. vii).

La modélisation a consisté à optimiser les valeurs des constantes de stabilité (K_i^{Cd} , K_i^{Pb}) pour les dosages d'AFSR par Cd et Pb réalisés à pH 4,6, en conservant les valeurs de C_{Li} déterminées à partir des données à pH 7,8 (tableau 2A). Les valeurs des constantes de stabilité conditionnelles des quasi-particules, pour le Pb et le Cd, ont diminué lors du passage de pH 7,8 à 4,6 (tableau 2A). Ce phénomène est moins marqué pour la quasi-particule « très fort » dont les propriétés de complexation restent fortes quel que soit le pH. Donc même à pH acide, l'AFSR conserve des sites de complexation forts vis-à-vis des métaux traces, ces sites semblant plus spécifiques au métal qu'au proton.

Sachant que l'erreur sur la détermination des K est d'autant plus forte que le produit $K \times C_L$ est inférieur à 1 [25], les K_{cond} de ces trois quasi-particules étant très sensibles au pH, les biais moyens obtenus (0,70 et 1,34 respectivement pour les dosages par Cd et Pb) sont moins bons qu'à pH 7,8.

Il a été montré que la détermination des paramètres de complexation était améliorée quand la fenêtre d'analyse encadre, la capacité complexante globale de la MON [35]. Cependant, la difficulté d'estimer correctement la valeur de la sensibilité de l'appareil S_{app} [14] augmente l'imprécision sur les caractéristiques de sites complexants présents sur une MON de C_L supérieure à 1 μM .

Les ajouts logarithmiques permettent donc de déterminer avec justesse des caractéristiques de complexation pour des groupements complexants de C_L inférieur à la μM , i.e. modélisés par les quasi-particules « très fort, fort et faible ».

CONCLUSION

La technique des ajouts logarithmiques, basée sur la mesure des concentrations en cadmium et plomb labiles par DPASV sur une large gamme de $[M]$ (pM_T : 9-5,5), a permis d'observer la complexation entre l'AFSR le Cd et le Pb pour des sites de capacité complexante C_L comprise entre le nM et le μM , contrairement aux autres techniques (CSV, ligand exchange-ASV, ISE...) ayant une fenêtre analytique plus restreinte et/ou une précision non uniforme sur la mesure des $[M]$ dans cette fenêtre.

Cette étude propose donc l'utilisation d'un modèle à quatre quasi-particules pour modéliser des expériences d'ajouts logarithmiques. Ceci corrobore les résultats montrant que plus de deux groupes de

complexes différents peuvent être déterminés à partir de courbes de titrations [36].

Les titrations logarithmiques réalisées à deux pH, et l'utilisation d'un calcul d'optimisation utilisant MINEQL pour la spéciation et un simplex modulé pour l'optimisation des paramètres de complexation, permettent la caractérisation complète des paramètres des quasi-particules simulant l'AFSR (tableau 2A). Ce modèle prend en compte la complexation des métaux traces (Cd et Pb), la compétition entre ces deux métaux ainsi que la dépendance au pH de ce système, dans une gamme de pH naturel. Il apparaît que même à pH acide, l'AFSR conserve des sites complexants forts à des concentrations de l'ordre de la nM. Ces quasi-particules représentent des classes de sites présents sur la MON, mais ne peuvent pas être associées à des structures chimiques exactes, ce qui n'est pas l'objectif d'une telle modélisation [23]. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de déterminer des constantes de stabilité quasi-thermodynamiques, indépendantes du pH, i.e. prenant en compte les phénomènes de compétition métal-proton au niveau des groupements complexants de la MON. Ainsi, l'affectation de constantes d'acidité aux quasi-particules définies dans cette étude complètera ce modèle de MON, le rendant utilisable dans un modèle de transport de contaminants en milieu naturel, comme MOCO-SIAM3D actuellement développé par IFREMER [37].

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le DEL/PC IFREMER et le RCMO/PROTEE, financé par le conseil régional de Provence-Alpes-Côte d'Azur.

REFERENCES

- [1] J. Buffle, Complexation reactions in aquatic systems, Analytical Chemistry, Ellis Horwood, p.692, (1988)
- [2] L. Sigg, W. Stumm, P. Behra, Chimie des milieux aquatiques, Masson, p. 391, (1992)
- [3] F.L.L. Muller, Interactions of copper, lead and cadmium with the dissolved, colloidal and particulate components of estuarine and coastal waters, *Mar. Chem.*, **52**, 245-268, (1996)
- [4] F.L.L. Muller, Evaluation of the effects of natural dissolved and colloidal organic ligands on the electrochemical lability of Cu, Pb and Cd in the Arran Deep, Scotland, *Mar. Chem.*, **67**, 43-60, (1999)
- [5] M.L. Wells, P.B. Kozelka and K.W. Bruland, The complexation of "dissolved" Cu, Zn, Cd and Pb by soluble and colloidal matter in Narragansett Bay, RI, *Mar. Chem.*, **62**, 203-217, (1998)
- [6] H. Xue and L. Sigg, Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in fresh water, *Anal. Chim. Acta*, **363**, 249-259, (1998)
- [7] R.H. Byrne, Specific problems in the measurement and interpretation of complexation phenomena in seawater, *Pure Appl. Chem.*, **68**, 1639-1656, (1996)
- [8] B.T. Hart, Trace metal complexing capacity of natural waters: a review, *Environ. Technol. Letters*, **2**, 95-110, (1981)
- [9] C.M.G. Van Den Berg, *Chemical Oceanography*, Chapter 51: Electroanalytical Chemistry of Sea-water, 9, (1988)
- [10] R.M. Town and M. Filella, Dispelling the myths: Is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters?, *Limnol. Oceanogr.*, **45**, 1341-1357, (2000)
- [11] Mounier S., Braucher R. and Benaïm J.Y., Differentiation of organic matter's properties of the Rio Negro basin by cross flow ultra-filtration and UV-spectrofluorescence, *Water Res.*, **33**, 2363-2373, (1999)
- [12] I. Pižeta and M. Branica, Simulation and fitting of anodic stripping voltammetry data for determination of the metal complexing capacity, *Anal. Chim. Acta*, **351**, 73-82, (1997)

- [13] E.P. Achterberg and C. Braungardt, Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters, *Anal. Chim. Acta*, **400**, 381-397, (1999)
- [14] G. Scarano, E. Bramanti and A. Zirino, Determination of copper complexation in sea water by a ligand competition technique with voltammetric measurement of labile metal fraction, *Anal. Chim. Acta*, **264**, 153-162, (1992)
- [15] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi and J. Smeyers-Verbeke, Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A, Elsevier, Amsterdam, p.867, (1997)
- [16] K.W. Bruland, Complexation of cadmium by natural organic ligands in the central North Pacific, *Limnol. Oceanogr.*, 1992, **37**, 1008-1017, (1992)
- [17] B. Raspor, P. Valenta, H.W. Nürnberg and M. Branica, Application of polarography and voltammetry to speciation of trace metals in natural waters. II Polarographic studies on the kinetics and mechanism of Cd(II)-chelate formation with EDTA, *Thalassia Jugoslavica*, **13**, 79-91, (1977)
- [18] B. Raspor and P. Valenta, Adsorption of humic substances isolated from marine and estuarine sediments, *Mar. Chem.*, **25**, 211-226, (1988)
- [19] D. Dzombak, W. Fish and F.L.L. Morel, Metal-Humate interactions: 1 Discrete ligand and continuous distribution models, *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 669-676, (1986)
- [20] E.M. Perdue and C.R. Lytle, Distribution model for binding of protons and metal ions by humic substances, *Environ. Sci. Technol.*, **17**, 654-660, (1983)
- [21] D.G. Kinniburgh, C.J. Milne, M.F. Benedetti, J.P. Pinheiro, J. Filius, L.K. Koopal and W.H. Van Riemsdijk, Metal ion binding by humic acid: application of the NICA-Donnan Model, *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 1687-1698, (1996)
- [22] C. Huber, M. Filella, R.M. Town, Computer modelling of trace metal ion speciation: practical implementation of a linear continuous function for complexation by natural organic matter, *Computer&Geosciences*, **28**, 587-596, (2002)
- [23] G. Sposito, Trace metals in contaminated waters, *Environ. Sci. Technol.*, **15**, 396-403, (1981)
- [24] E. Tipping and M.A. Hurley, A unifying model of cation binding by humic substances, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **56**, 3627, (1992)
- [25] I. Ružić, Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation, *Anal. Chim. Acta*, **140**, 99-113, (1982)
- [26] G. Scatchard, The attraction of proteins for small molecules and ions, *Anal. N. Y. Acad. Sci.*, **57**, 660-672, (1949)
- [27] W. Fish, D.A. Dzombak and F.M.M. Morel, Metal-Humate interactions: 2 Application and comparison of models, *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 676-683, (1986)
- [28] C. Garnier, I. Pižeta, S. Mounier, J.Y. Benaïm and M. Branica, Influence of the type of titration and of data treatment methods on metal complexing parameters determination of single- and multi-ligand systems measured by stripping voltammetry, *Anal. Chim. Acta*, **505**, 263-275, (2004)
- [29] F.M.M. Morel, Principles of aquatic chemistry, Wiley-InterScience, New York, (1983)
- [30] T. Rozan, B. Gaboury, H. Marsh and Y. Chin, Intercomparaison of DPASV and ISE for the Measurement of Cu Complexation Characteristics of NOM in Freshwater, *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 1766-1770, (1999)
- [31] I. Pižeta, D. Omanović and M. Branica, The influence of data treatment on the interpretation of experimental results in voltammetry, *Anal. Chim. Acta*, **401**, 163-172, (1999)
- [32] P.B. Kozelka and K.W. Bruland, Chemical speciation of dissolved Cu, Zn, Cd, Pb in Narragansett Bay, Rhode Island, *Mar. Chem.*, **60**, 267-282, (1998)
- [33] J.B. Christensen and T.H. Christensen, The effect of pH on the complexation of Cd, Ni and Zn by dissolved organic carbon from leachate-polluted groundwater, *Water Res.*, **34**, 3743-3754, (2000)
- [34] A.P. Robertson and J.O. Leckie, Acid/Base, copper binding, and Cu²⁺/H⁺ exchange properties of a soil humic acid, an experimental and modeling study, *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 786-795, (1999)
- [35] E. Dixon, M. Gardner and S. Parry, Optimised design for complexation capacity titrations, *Chem. Speciation Bioavailability*, **11**, 51-56, (1999)
- [36] W. Verweij and I. Ružić, Analysis of titration curves of lake tjeukemeer water with Cu(II). Identification of the formation of more than two groups of different complexes, *Croat. Chim. Acta*, **70**, 419-434, (1997)
- [37] J.L. Gonzalez, B. Thouvenin, C. Dange, A. Fiandrino and J.F. Chiffoleau, Modeling of Cd speciation and dynamics in the Seine estuary (France), *Estuaries*, **24**, 1041-1055, (2001)

TABLEAUX ET FIGURES

Technique	DPASV	
Conditionnement	time : 30s	potentiel : -1.2V
Déposition	time : 600s	potentiel : -1.0V
Equilibration	time : 10s	potentiel : -1.0V
Potentiels scannés	initial : -1.0V	final : 0.2V
Modulation	amplitude : 0.05V	temps : 0.07s
Potentiel d'intervalle	2mV	
Temps d'intervalle	0.2s	

Tableau 1: Conditions électrochimiques optimales à la détermination de la spéciation des métaux traces par DPASV

A	quasi-particule	très fort	fort	faible	très faible	bias	B	quasi-particule	fort	faible	bias
	C_L nM	21,1	25,1	150	1900			C_L nM	20,3	222	
pH	$\text{Log}K_{Cd}$	9,9	6,8	6,4	4,6	0,47	pH	$\text{Log}K_{Cd}$	8,2	6,4	1,69
7.8	$\text{Log}K_{Pb}$	11,1	7,6	6,8	4,9	0,37	7.8	$\text{Log}K_{Pb}$	9,5	6,5	0,39
pH	$\text{Log}K_{Cd}$	8,8	4,2	4,0	3,4	0,65	pH	$\text{Log}K_{Cd}$	7,6	4,0	0,99
4.6	$\text{Log}K_{Pb}$	9,7	4,6	4,2	3,4	1,21	4.6	$\text{Log}K_{Pb}$	8,8	4,2	1,08

Tableau 2: Paramètres de complexation optimisés pour un modèle à quatre quasi-particules (A, MINEQL-Simplex) et un modèle à deux quasi-particules (B, Excel)

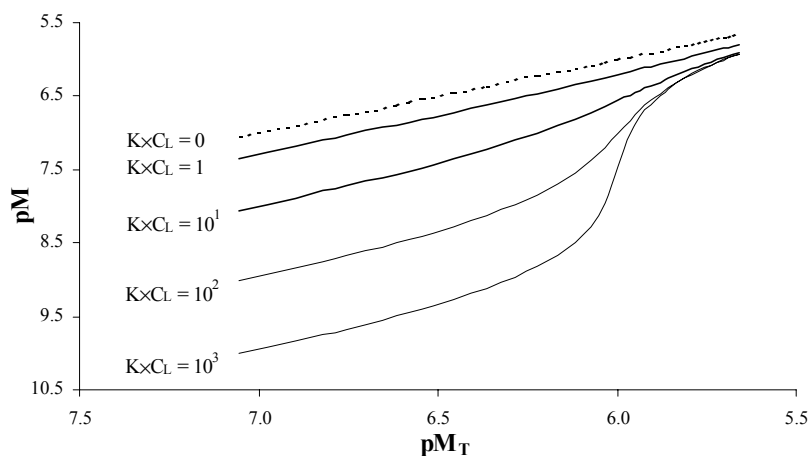


Fig. 1: Effet du produit $K \times C_L$ sur la mesure par DPASV de la concentration en métal labile par rapport à la concentration en métal total

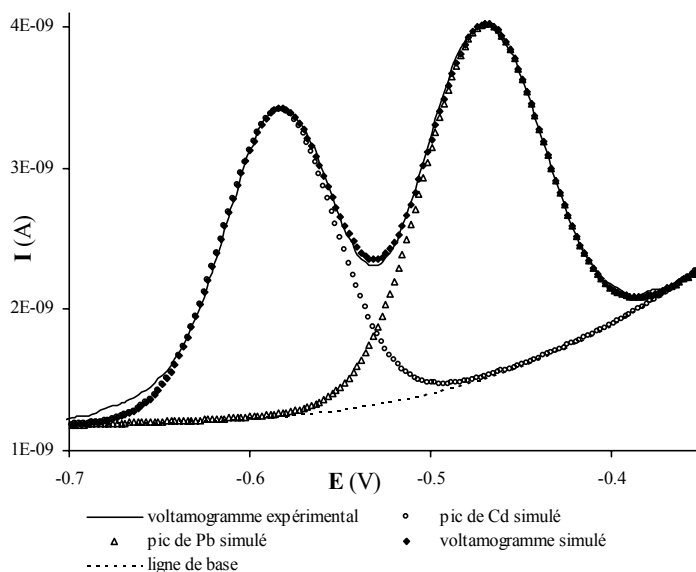


Fig. 2: Modélisation de la ligne de base et des pics sur un voltamogramme ($[Pb]_T = 28.3$ nM, AFSR 20.3 mg.l^{-1} , pH 7,8)

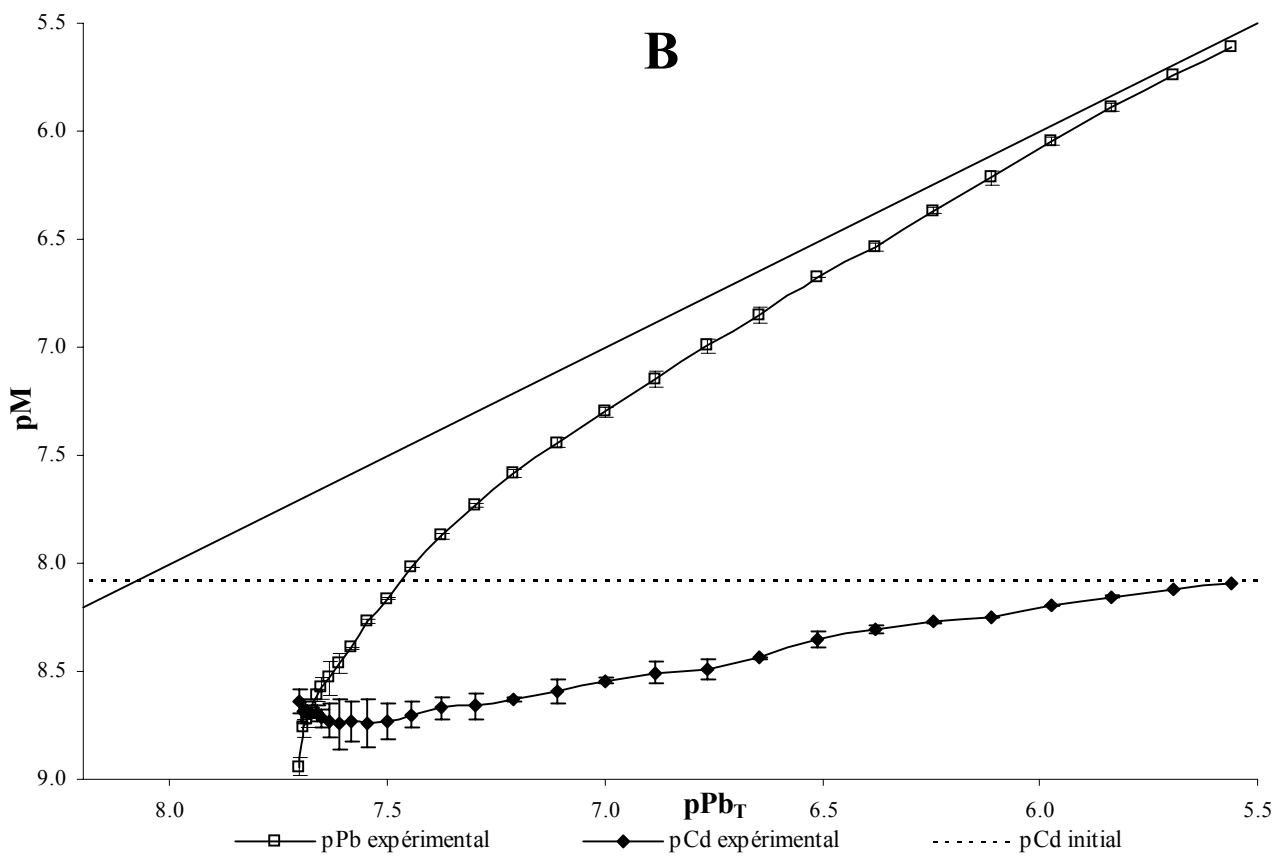
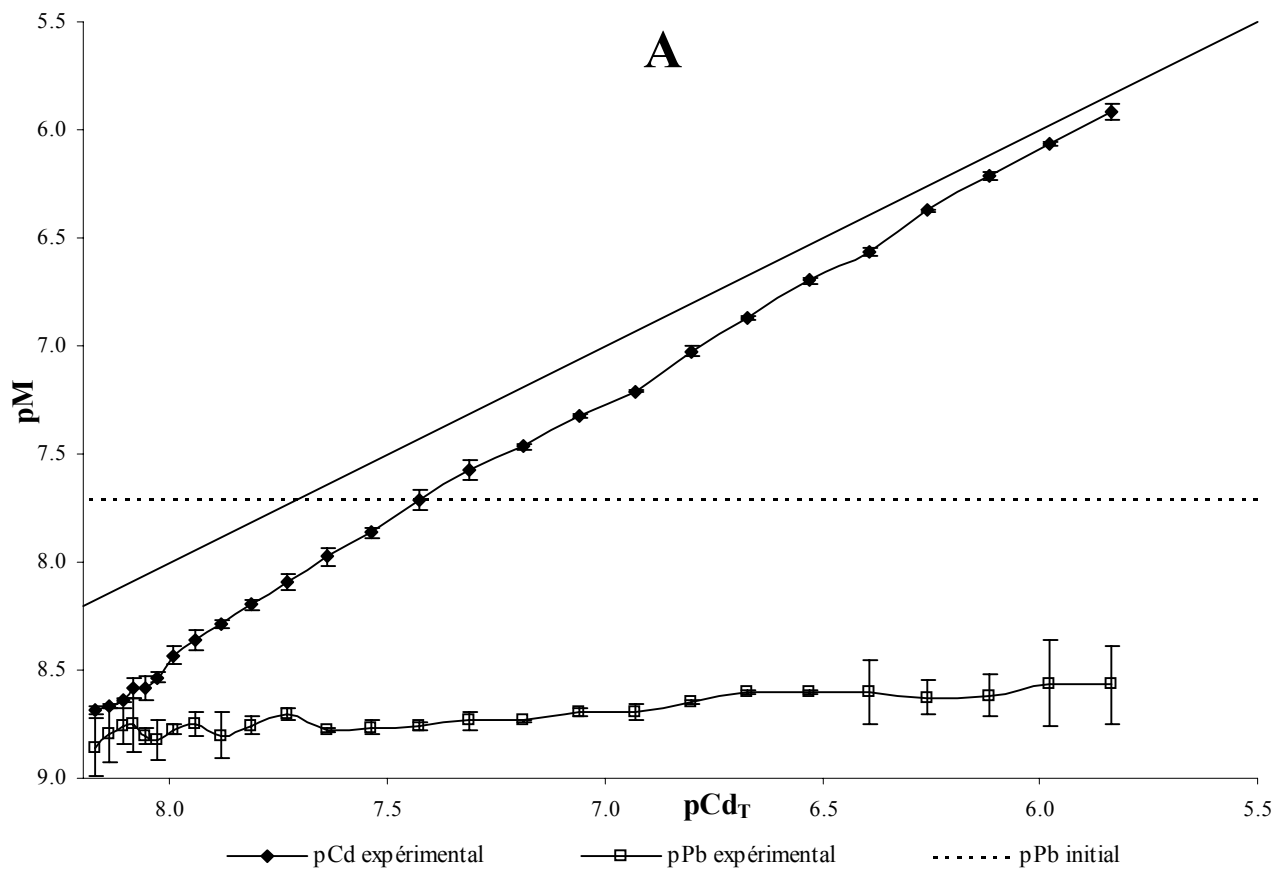


Fig. 3: Titrations logarithmiques d'AFSR par Cd (A) et Pb (B) à pH 7,8

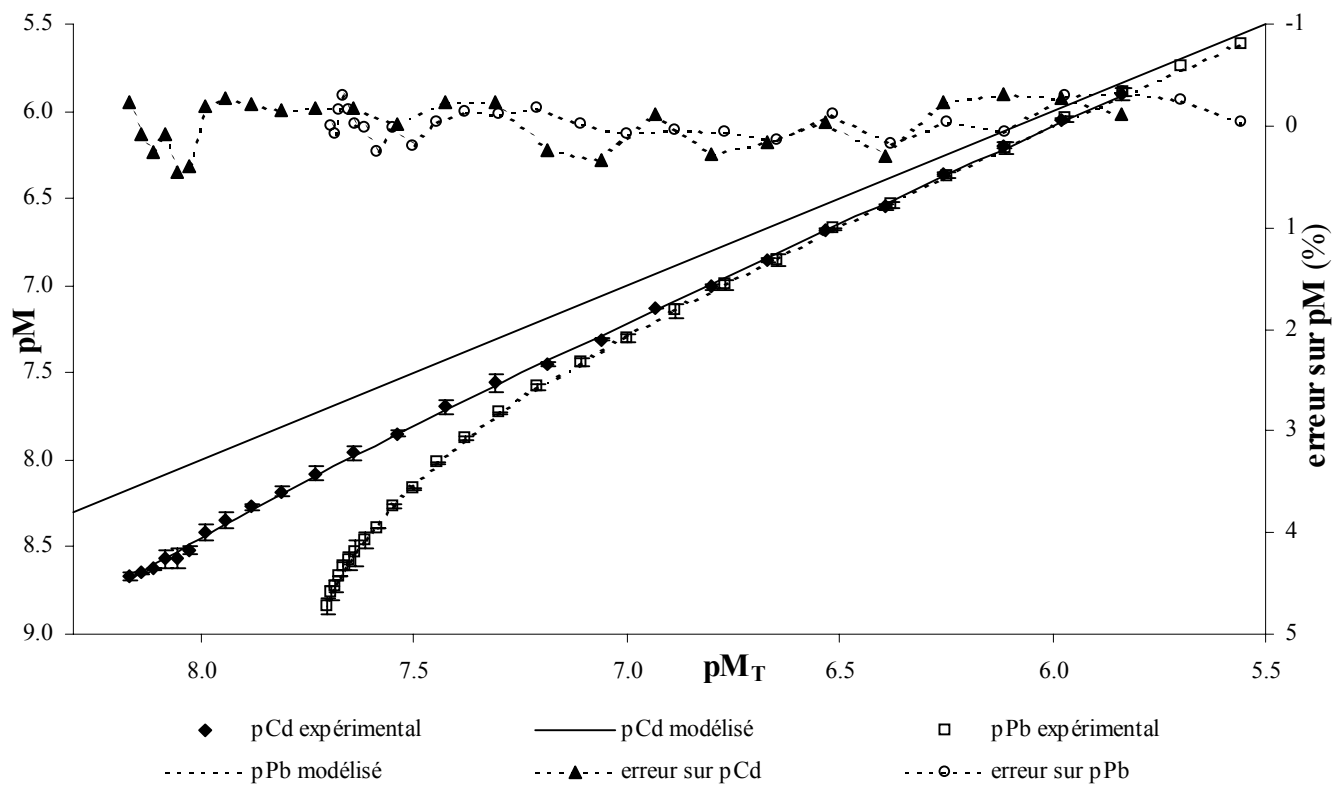


Fig. 4: Modélisation des titrations d'AFSR par Cd et Pb à pH 7,8 par un modèle discret à 4 quasi-particules

ANNEXE IV.2:

Garnier C., Mounier S., Benaim J.Y., 2004c, Influence of dissolved organic carbon content on modelling natural organic matter acid-base properties, *Water Research*, 3685-3692

Influence of dissolved organic carbon content on modelling natural organic matter acid-base properties

Cédric Garnier, Stéphane Mounier, Jean Yves Benaim

RCMO-PROTEE laboratory, University of Toulon and Var - BP 132, 83957 La Garde, France

Abstract

Natural organic matter (NOM) behaviour towards proton is an important parameter to understand NOM fate in the environment. Moreover, it is necessary to determine NOM acid-base properties before investigating trace metals complexation by natural organic matter. This work focuses on the possibility to determine these acid-base properties by accurate and simple titrations, even at low organic matter concentrations. So, the experiments were conducted on concentrated and diluted solutions of extracted humic and fulvic acid from Laurentian River, on concentrated and diluted model solutions of well-known simple molecules (acetic and phenolic acids), and on natural samples from the Seine river (France) which are not pre-concentrated. Titration experiments were modelled by a 6 acidic-sites discrete model, except for the model solutions. The modelling software used, called PROSECE (*Programme d'Optimisation et de Spéciation Chimique dans l'Environnement*), has been developed in our laboratory, is based on the mass balance equilibrium resolution. The results obtained on extracted organic matter and model solutions point out a threshold value for a confident determination of the studied organic matter acid-base properties. They also show an aberrant decreasing carboxylic/phenolic ratio with increasing sample dilution. This shift is neither due to any conformational effect, since it is also observed on model solutions, nor to ionic strength variations which is controlled during all experiments. On the other hand, it could be the result of an electrode troubleshooting occurring at basic pH values, which effect is amplified at low total concentration of acidic sites. So, in our conditions, the limit for a correct modelling of NOM acid-base properties is defined as 0.04 meq of total analysed acidic sites concentration. As for the analysed natural samples, due to their high acidic sites content, it is possible to model their behaviour despite the low organic carbon concentration.

Keywords: Potentiometric titrations, PROSECE, NOM, acid-base properties, DOC

1. Introduction

In natural systems, as an estuary, components of natural organic matter (NOM) have a predominant role towards complexation of trace metals, and so, on their speciation (Buffle, 1988; Byrne, 1996; Hart, 1981). Thus, in the environment, pollutant metals transport and reactivity are partially controlled by NOM, conditioning toxicity and/or bioavailability of trace metals towards micro-organisms (phytoplankton, zooplankton, macro-algae ...) (Erk and Raspor, 2001; González-Dávila et al., 2000; Vasconcelos and Leal, 2001). NOM study to model these complexing properties and predict its behaviour in a given system is a major issue to apprehend trace metals and NOM impact on the environment. Thus, the characterization of NOM complexing and acidic parameters, using discrete or continuous models, has been and is yet the purpose of many studies (Kinniburgh et al., 1999; Kozelka and Bruland, 1998; Mantoura, 1981; Sposito, 1981; Tipping, 2002; Town and Filella, 2000).

NOM acid-base properties are part of the essential factors which influence its complexing ability towards trace metals (Buffle, 1988; Christensen and Christensen, 2000; Perdue and Lytle, 1983; Ramos et al., 2002; Robertson and Leckie, 1999; Smith and Kramer, 1999). All models applied to NOM aim at defining carboxylic-like and phenolic-like sites density (Christensen et al., 1998; de Souza Sierra et al., 2001; Lu and Allen, 2002; Masini et al., 1998; Milne et al., 2001; Ritchie and Perdue, 2003). As a matter of fact, the monitoring of carboxylic/phenolic ratio's modifications allows to map out NOM properties variability and, often, to determine NOM origin. Thus, it has been stated that NOM with anthropic or "terrigene" origins have more marked phenolic characteristics (Letizia and Gnudi, 1999). Moreover, NOM extraction and/or separation in fulvic (FA) and humic (HA) acids have shown recurrent differences between these two types of extracted NOM, in terms of acidic site densities as well as carboxylic/phenolic ratios (de Souza Sierra et al., 2001; Milne et al., 2001; Ritchie and Perdue, 2003).

Most studies concerning NOM acid-base properties characterisation have been carried out on isolated NOM, using different experimental protocols (IHSS protocol, ultrafiltration, reverse osmosis, evaporation, XAD-8 and XAD-4 resins...), as IHSS standard NOM (Kinniburgh et al., 1999; Christensen et al., 1998; de Souza Sierra et al., 2001; Lu and Allen, 2002; Masini et al., 1998; Ritchie and Perdue, 2003; Takács et al., 1999). Experiments consist in potentiometric titrations of isolated NOM solutions, usually realised at high dissolved organic carbon (DOC) contents (40 to more than 1000 mg.l⁻¹ of DOC), which are very different from natural sample concentrations (0.1 to 10 mg.l⁻¹) obtained for low-eutrophized waters (Mounier et al., 1999). In addition to the possible modifications of NOM properties during these isolation protocols, it seems interesting to know if the characterisation of NOM behaviour towards proton is feasible with the lowest possible errors, at lower or even at natural DOC contents, without any isolation treatment.

The aim of this work was to analyse the effect of DOC content on the ability to determine NOM acid-base properties with a discrete model using a new software called PROSECE (Garnier et al., 2004). Thus, potentiometric titrations have been carried out on solutions of extracted Laurentian River fulvic and humic acid (LRFA and LRHA) at different DOC concentrations (2 to 100 mg.l⁻¹). This study was first based on the estimation of DOC content effect on carboxylic/phenolic ratios evolution, and more precisely on acidic parameters of some defined sites. Moreover, various sampling, conducted on the Seine river (France) (Küpker et al., 2003), and analysed without any isolation protocol (i.e. 2.1 to 7.5 mg.l⁻¹ of DOC), allowed to observe possible differences between these natural solutions and the extracted LRFA and LRHA. Finally, this work was completed with potentiometric titrations of model mixtures of phenol and sodium acetate, at concentrations close to carboxylic and phenolic contents of LRFA and LRHA solutions, to prevent interferences due to NOM structural and behaviour complexity.

2. Experimental

2.1 Natural organic matter and reagents

From LRFA and LRHA parent solutions, respectively at 226.8 and 205.0 mg.l⁻¹ of organic matter (i.e. 117.9 and 106.6 mg.l⁻¹ of DOC), diluted solutions of extracted organic matter were realised, according to different dilution factors: 2, 10, 20 and 50.

Natural organic matters were sampled on the Seine river, within the SeineAval2 research program framework. 17 samples were collected on 5 upstream to downstream sampling sites (Poses, La Bouille, Caudebec, Tancarville and Honfleur) between April 2002 and December 2002, and completed by two marine-estuary sampling (March and September 2002) of different depths. All these samples have

been analysed in detail elsewhere (Küpker et al., 2003).

A model solution, mixture of sodium acetate (10.14 mmol.l⁻¹ CH₃COONa Labosi analyt. pur) and phenol (9.91 mmol.l⁻¹, from C₆H₅OH Merck for analysis), was diluted according to different dilution factors: 2, 5, 10, 20, 50, 100, and 200.

LRFA, LRHA and sodium acetate-phenol solutions ionic strength was maintained at 0.10 M by adding NaNO₃ (J.T. Baker) and all solutions were stored in the dark at 4°C.

2.2 Potentiometric titrations

Titration experiments have been carried out in thermostated cells at 25 ± 0.2°C, using KOH (0.10 M, from KOH 0.5033 M Sigma-Aldrich) and HNO₃ (0.20 M, from HNO₃ 69% J.T. Baker) standardised CO₂-free solutions, under stirring and streamed by an ultra-pur nitrogen flow (water saturated and decarbonated using 1 M KOH solution). NaNO₃ concentration in KOH and HNO₃ standard solutions was 0.10 M. The KOH solution was titrated using potassium hydrogen phthalate, then the HNO₃ solution was titrated using this KOH solution.

The micro-titration stand (Metrohm) was equipped with two titrators Titrino 716 controlled by Tinet2.4 software. The combined pH-micro-electrode used (Mettler, Inlab422, reference: Ag/AgCl/KCl 3.0 M) was calibrated weekly by pH-buffer solutions (HANNA 4.01, 7.01 and 10.01).

Titration experiments were conducted on 50 mL of LRFA, LRHA and model solutions, and 100 mL of natural samples, these volumes were chosen to increase the analysed acidic sites number. Titrations were carried out with HNO₃ additions until pH 2 was reached. After 20 min of stirring, the solution was free from carbonates, and the pH was increased to a value of 11.9 by addition of KOH. To increase the accuracy of the curves (pH = f(V_{KOH})), experiments consisted on dividing titration into four pH sections (2-2.5, 2.5-3.5, 3.5-10.5 and 10.5-11.9), in which the added volume was adjusted from 5 to 250 µL. pH was measured with stable conditions of 0.5 mV/min or 120 s. 150 to 250 data points (pH, added KOH volume) per analysis arise from these conditions, the average time per experiment was about 12 h. To determine acid-base properties of these solutions, only the data points corresponding to pH values between 2.5 and 11.5 were used in order to minimize the effect of pH micro-electrode non-linearity at extreme pH values.

2.3 Modelling of experimental data: PROSECE

In this study, the model used to apprehend acid-base properties of natural and isolated organic matters is based on the definition of a discrete distribution of acidic sites, which acidic constants (pK_{H,i}) and concentrations (L_{T,i}) have to be determined. Determination of these parameters, by experimental curves fitting, has been realised using a new software, PROSECE, developed in our

laboratory in cooperation with Pr. P. Seppcher (ANLA laboratory). This software, available on request, has been written on the basis of the numeric calculation program Octave (freeware) and consists of a speciation calculation integrated in a module that optimises the complexing parameters, as explained elsewhere (Garnier *et al.*, 2004).

The modelling of NOM behaviour towards proton has often been realised using a set of acidic sites. The number of defined sites varies according to the analysed NOM and the optimisation program used. Thus, de Souza Sierra *et al.* (2001) have modelled extracted NOM potentiometric titrations by 2 sites (one carboxylic and one phenolic), Takacs *et al.* (1999) by 3 sites, Lu and Allen (2002) by 4 sites and Masini *et al.* (1998) have reached 6 different sites. Smith and Kramer (1999), using a slightly different model (DISI), defined 4 groups of sites according to the obtained pKa values.

So, due to these differences, the first step of this study consists in the optimisation of the sites number leading to the best experiments modelling with the simplest system.

3. Results and discussion

3.1 Titrations of LRFA and LRHA concentrated solutions

Experimental curves of potentiometric titrations of LRFA and LRHA concentrated solutions are presented in Figure 1. As expected, these curves did not show well-defined equivalent points, which emphasizes the great heterogeneity of acidic functions carried by these isolated NOM. With regard to the KOH quantity necessary to neutralize all these NOM acidic sites, fulvic acid presents a higher sites density than humic acid. These results compares well with those obtained on standard organic matters by Milne *et al.* (2001) and Ritchie and Perdue (2003). LRFA and LRHA potentiometric titrations have been modelled using discrete distributions of 2, 3, 4, 5, 6 and 7 different sites to determine the number of discrete sites necessary to correctly model these titrations curves. The errors on titration pH values, calculated from differences between experimental and calculated pH values and optimised by PROSECE, as a function of the number of defined sites are presented in Figure 2. According to the given results, a 6 sites discrete distribution has been considered for LRFA, LRHA and natural samples analysis.

For LRFA and LRHA, this 6 sites model combined to the use of PROSECE allowed the acid-base properties ($pK_{H,i}$, $L_{T,i}$) optimisation of 3 carboxylic-like ($pK_{H,i} < 7$) and 3 phenolic-like ($pK_{H,i} > 7$) sites. This is in agreement with Masini *et al.* (1998) previous results. Calculated values for defined acidic parameters are summarised in Table 1. Carboxylic/Phenolic ratios are calculated by dividing the sum of the 3 carboxylic-like sites concentrations by the sum of the 3 phenolic-like ones. The obtained

carboxylic/phenolic ratios, respectively 1.32 and 0.54 for LRFA and LRHA (Table 2), are in the range of those analysed by Ritchie and Perdue (2003), and obviously show differences between the behaviour towards pH of a fulvic and a humic acid isolated from the same NOM. It has to be pointed out that LRFA and LRHA phenolic sites densities are almost the same (respectively 2.55 and 2.49 meq.g^{-1} NOM), while fulvic acid carboxylic sites density (3.37 meq.g^{-1} NOM) is 2.5 times higher than the humic acid one (1.34 meq.g^{-1} NOM).

For LRFA and LRHA concentrated solutions titrations, PROSECE-optimised errors are respectively of 2.86 and 3.76 (sum of absolute differences between measured and PROSECE-calculated pH values), for the 6 sites model, which corresponds to mean errors on scanned pH values of 0.29 % (i.e. 0.009 pH unity) and 0.38 % (i.e. 0.012 unity of pH).

3.2 Titrations of LRFA and LRHA diluted solutions

In this case, PROSECE calculations consist in optimising the 6 sites concentrations only, the sites being defined by their acidic constants optimised by concentrated solutions modelling. The obtained sites concentrations for potentiometric titrations of LRFA and LRHA diluted according to dilutions factors of 2, 10, 20 and 50 are given in Table 2.

Carboxylic and phenolic sites densities (meq.g^{-1} NOM) evolutions as a function of NOM concentration, i.e. the LRFA and LRHA quantities in concentrated and diluted solutions, are presented in Figure 3. Theoretically, there should not be any differences in terms of sites densities when NOM concentration decreases, i.e. the obtained results at 20 $\text{mg}_{\text{NOM}}.\text{l}^{-1}$ should be the same than those obtained at 200 $\text{mg}_{\text{NOM}}.\text{l}^{-1}$.

Concerning carboxylic sites, until a dilution factor of 10 corresponding to 22.7 and 20.5 mg.l^{-1} of LRFA and LRHA respectively, density is almost constant. Below this dilution factor, sites densities widely increase to reach 7.32 $\text{meq.g}^{-1}_{\text{LRFA}}$ (+118%) and 8.92 $\text{meq.g}^{-1}_{\text{LRHA}}$ (+563%) respectively.

This phenomenon is widely amplified for phenolic sites. Indeed, for solutions diluted by a factor 2 (i.e. 113.4 $\text{mg}_{\text{LRFA}}.\text{l}^{-1}$ and 102.5 $\text{mg}_{\text{LRHA}}.\text{l}^{-1}$), densities respectively increase of 25 and 55%. For dilution factors above 2, phenolic sites densities reach 50.85 $\text{meq.g}^{-1}_{\text{LRFA}}$ (+1892%) and 59.62 $\text{meq.g}^{-1}_{\text{LRHA}}$ (+2288%). So, the calculated carboxylic/phenolic ratio decreases with decreasing NOM content (see Table 2) to reach 0.14 and 0.15 respectively, for LRFA and LRHA solutions diluted by 50.

A more precise study of each site density variations shows a major increase for sites number 3 ($pK_{H,3} \sim 6.5$) and number 6 ($pK_{H,6} \sim 10$) only, and in the case of the most diluted solution, an increase for almost all sites.

So, LRFA and LRHA diluted solutions analysis draw attention to an overestimation of the acidic sites concentrations when NOM concentration decreases. This phenomenon, especially noticeable for phenolic-

like sites, leads to important variations of carboxylic/phenolic ratio values during dilution. Thus, it seems quite difficult to correctly determine acid-base properties of extracted NOM at low DOC content (i.e. below 10 or even 50 mg.l⁻¹ of DOC), and so, it seems impossible to analyse natural samples which are not treated according to a NOM isolation protocol.

3.3 Titration of natrium acetate and phenol model solutions

To validate or not the obtained results on extracted organic matter, the titration/modelling protocol has been applied to a well-known natrium acetate and phenol model solution, whose sites concentrations are close to those calculated for LRFA and LRHA concentrated solutions. So, this model solution has similar acid-base properties ($pK_{H,i}$ and $L_{T,i}$), without the conformational variations likely to occur on natural organic matter. Indeed, taking account of the highly heterogeneous structure and reactivity of the studied extracted and natural organic matters, sensible to many physico-chemical factors, it seems important to test simple and stable solutions with known thermodynamic acid-base properties.

PROSECE calculation, for the concentrated model solution, consists in the optimisation of acidic parameters ($pK_{H,i}$ and $L_{T,i}$) of two sites. Calculated acidic constants, respectively 4.66 and 9.98 for natrium acetate and phenol, are close to the thermodynamic ones: 4.65 and 9.80 (Ringbom, 1967). Moreover, the obtained concentrations are respectively 9.8 mmol.l⁻¹ and 10.3 mmol.l⁻¹, which is quite closed to the expected values (10.14 mmol.l⁻¹ and 9.91 mmol.l⁻¹).

Titration of diluted model solutions have been modelled by PROSECE, using the obtained acidic constants for concentrated solutions and optimising the acidic site concentrations. Table 3 shows the obtained concentrations of acetate and phenol. In Figure 4 is presented the evolution of the calculated total sites concentrations as a function of the expected total sites concentrations for model solutions, compared to LRFA and LRHA solutions. As shown previously on these extracted NOM solutions, modelling over-estimates acid-base sites concentrations at low organic matter content, as proven by the difference to the theoretical curve (see Figure 4). Moreover, carboxylic/phenolic ratio values decrease, down to a value of 0.29 for the most diluted model solution, instead of 1.02 as expected (Table 3). Considering these results, it seems not possible to correctly determine acid-base properties when the calculated total sites amount is below 0.04 meq, (average value), which could be defined as the limit for a correct modelling (see dotted rectangle on Figure 4).

So, the phenomenon consisting of an apparent increasing sites densities when the DOC content decreases, especially for phenolic-like sites, seems to be independent of the analysed chemical compounds nature. But, the exact origin of this phenomenon is

not yet determined. The only certitude is that it is neither due to ionic strength which is controlled during the titrations, nor to any conformational effect as the observed carboxylic/phenolic ratio shift also appears for simple molecules.

3.4 Titrations of natural samples

Considering the obtained results for LRFA and LRHA titrations modelled using PROSECE, a discrete distribution based on 6 different acidic sites has been used to analyse potentiometric titrations of natural samples collected on the Seine river. The detailed analysis of spatio-temporal variability of the obtained acidic parameters is presented elsewhere (Küpker et al., 2003), compares to other biogeochemical factors as DOC content, fluorescence characteristics, chlorophyll A and phaeo-pigments concentrations...

The obtained carboxylic/phenolic ratios for these 17 natural samples reach an average value of 0.83, which is close to the values obtained for isolated NOM, analysed at higher DOC content (Kinniburgh et al., 1999; Christensen and Christensen, 2000; Lu and Allen, 2002, Milne et al., 2001). These calculated values range, between 0.23 and 1.50, shows the great behaviour heterogeneity of the studied NOM. All the calculated total sites amount range between 0.077 and 0.255 meq (mean value of 0.149 meq). When compared to the limit for a correct modelling, previously defined in this study as 0.04 meq, these sites amounts are above and so attest the feasibility of studying these non-extracted natural samples. It is to point out that PROSECE-modelling of NOM acid-base properties are done taking account of major cations concentrations, which means hydroxides formation. On the other hand, the presence of possible inorganic colloids could not be considered, due to the obvious difficulty for their isolation and acid-base characterisation. So, this should induce a bias on the calculated amounts of NOM acid sites.

4. Conclusion

The determination of NOM acid-base properties, in particular the contents of carboxylic-like and phenolic-like sites, has been conducted using potentiometric titrations, and modelled by means of a discrete sites distribution. The obtained results for LRFA and LRHA are comparable to those calculated in previous studies with similar extracted organic matter. The use of a new software, PROSECE, has allowed the acid-base properties optimisation of 6 different sites: 3 carboxylic-like and 3 phenolic-like, according to the calculated acidic constants. It can be noticed that LRFA and LRHA phenolic sites densities are similar, while the fulvic acid is 2.5 times richer in carboxylic sites than the LRHA ones.

This work has particularly pointed out that, for diluted solutions, there is a threshold value for a confident determination of the acidic sites concentrations. Indeed, LRFA and LRHA diluted

solutions analysis draw attention to an overestimation of the acidic sites concentrations when NOM concentration decreases. This phenomenon, especially noticeable for phenolic-like sites, leads to important variations of carboxylic/phenolic ratio values during dilution. Moreover, the analysis of sodium acetate and phenol model solutions, at different dilution factors, has confirmed these results, i.e. an increase of sites densities, especially for phenolic-like, when dilution is too important. This phenomenon could be the result of an electrode troubleshooting which happens at basic pH values, this effect being amplified when analysed sites concentration is low. Indeed, it is known that selective electrodes are not linear under an infinite range. At very low proton concentrations (pH higher than 11), this type of micro-electrode should be disrupted, and so induce an incorrect signal interpreted by the optimisation software used as a phenolic one. Similarly, non-linearity at acidic pH (lower than 3), should lead to an incorrect carboxylic signal. However, LRFA acid-base properties obtained by titration PROSECE-modelling of LRFA concentrated and diluted solutions for different pH ranges (2.5-11.5, 3-11, 3.5-10.5 and 4-10), have unexpectedly shown the necessity to model the largest pH range to minimize this phenomenon. The use of RHOSS micro-electrode could maybe decrease it. Ionic strength and conformational changes do not seem, again, to be responsible for this increase of sites densities. Therefore, in this study, the limit for a correct modelling has been defined as 0.04 meq of total acid-base sites amount.

However, the analysis of natural samples collected in the Seine river without pretreatment, has shown that the modelling of non-concentrated NOM is possible, even at low DOC contents (average value of 3.6 mg.l⁻¹), because of the apparently high acidic sites densities of these samples. Indeed, the obtained carboxylic/phenolic ratios values are close to those determined by Ritchie and Perdue (2003), and so, not disrupted by a high error on phenolic sites density as pointed out when studying LRFA and LRHA at similar DOC contents. In fact, the total acid-base sites concentrations calculated for these natural samples are greatly above the defined modelling limit which can explain the correct modelling.

The presented results highlight the challenge to correctly analyse acid-base properties of solutions with low organic carbon contents. However, the analysis of natural samples collected in the Seine river, in different sampling sites and at different time periods, so, gathering together NOM of various origins and concentrations, has proved that it is possible to model the behaviour towards proton of non-treated samples, because of their high acidic sites content.

Acknowledgments

The authors wish to thank P. Sepecher (ANLA laboratory, University of Toulon and Var) for his substantial contribution to the development of

PROSECE, as well as the Program Seine Aval II, which is granted by the Région Haute-Normandie.

Reference

- Buffle, J. (1988) Analytical Chemistry, Ellis Horwood. p. 692.
- Byrne, RH. (1996) Specific problems in the measurement and interpretation of complexation phenomena in seawater. *Pure and Applied Chemistry*;68(8):1639-1656.
- Christensen, JB and Christensen, TH. (2000) The effect of pH on the complexation of Cd, Ni and Zn by dissolved organic carbon from leachate-polluted groundwater. *Water Research* **34**(15),3743-3754.
- Christensen JB, Tipping E, Kinniburgh DG, Gron C, Christensen TH. (1998) Proton Binding by Groundwater Fulvic Acids of Different Age, Origins, and Structure Modeled with the Model V and NICA-Donnan Model. *Environmental Science and Technology* **32**(21),3346-3355.
- de Souza Sierra MM, Arend K, Neves Fernandez A, Giovanela M, Szpoganicz B. (2001) Application of potentiometry to characterize acid and basic sites in humic substances: Testing the BEST7 program with a weak-acid mixture. *Analytica Chimica Acta* **445**(1),89-98.
- Erk, M and Raspor, B. (2001) Anodic Stripping Voltammetry in the complexation study of the peptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala [56-61] MT I and cadmium: application in determination of the complexing capacity and stability constant. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **502**,174-179.
- Garnier C, Pižeta I, Mounier S, Benaïm JY, Branica M. (2004) The influence of the type of titration and of data treatment methods on metal complexing parameters determination of single and multi ligand systems measured by stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta***505**,263-275.
- González-Dávila M, Santana-Casiano JM, Laglera LM. (2000) Copper adsorption in diatom cultures. *Marine Chemistry* **70**(1-3),161-170.
- Hart, BT. (1981) Trace metal complexing capacity of natural waters: a review. *Environmental Technology Letters* **2**,95-110.
- Kinniburgh DG, Van Riemsdijk WH, Koopal LK, Borkovec M, Benedetti MF, Avena MJ. (1999) Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids and surfaces* **151**,147-166
- Kozelka, PB and Bruland, KW. (1998) Chemical speciation of dissolved Cu, Zn, Cd, Pb in Narragansett Bay, Rhode Island. *Marine Chemistry* **60**,268-282.
- Küpker K, Garnier C, Mounier S, Fevrier D. (2003) Characteristic properties of dissolved organic matter in the Seine River (France) A potentiometric and fluorescence spectroscopic study. *Water Research* submission.

- Letizia, D and Gnudi, F. (1999) Phenolic compounds in surface water. *Water Research* **33**(14),3213-3219.
- Lu, Y and Allen, HE. (2002) Characterization of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM)-link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg. *Water Research* **36**,5083-5101.
- Mantoura RFC. (1981) Ch. 7 in Duursma EK and Dawson R. Elsevier Oceanography Series, 31, Elsevier Scientific publishing company. Amsterdam.
- Masini J, Abate G, Lima E, Hahn L, Nakamura M, Lichtig J, Nagatomy H. (1998) Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. *Analytica Chimica Acta* **364**,223-233.
- Milne CJ, Kinniburgh DG, Tipping E. Generic NICA-Donnan (2001) Model Parameters for Proton Binding by Humic Substances. *Environmental Science and Technology* **35**,2049-2059.
- Mounier S, Braucher R, Benaim JY. (1999) Differentiation of organic matter's properties of the Rio Negro basin by cross-flow ultra-filtration and UV-spectrofluorescence. *Water Research* **33**(10),2363-2373
- Perdue, EM and Lytle, CR. (1983) Distribution model for binding of protons and metal ions by humic substances. *Environmental Science and Technology* **17**,654-660.
- Ramos MA, Fiol S, López R, Antelo JM, Arce F. (2002) Analysis of the Effect of pH on Cu²⁺-Fulvic Acid Complexation Using a Simple Electrostatic Model. *Environmental Science and Technology* **36**,3109-3113.
- Ringbom, A. (1967) Les complexes en Chimie Analytique, Dunod, Paris. p.369.
- Ritchie, JD and Perdue, JM. (2003) Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **67**(1),85-96.
- Robertson, AP and Leckie, JO. (1999) Acid/Base, copper binding, and Cu²⁺/H⁺ exchange properties of a soil humic acid, an experimental and modeling study. *Environmental Science and Technology* **33**,786-795.
- Smith, DS and Kramer, KR. (1999) Multi-site proton interactions with natural organic matter. *Environmental International* **25**,307-314.
- Sposito, G. (1981) Trace metals in contaminated waters. *Environmental Science and Technology* **15**(4),396-403.
- Takács M, Alberts JJ, Egeberg PK. (1999) Characterization of natural organic matter from eight Norwegian surface waters: proton and copper binding. *Environment International* **25**,315-323.
- Tipping, E. (2002) Al(III) and Fe(III) binding by humic substances in freshwaters, and implications for trace metal speciation. *Geochemica et Cosmochimica Acta* **66**(19),3211-3224.
- Town, RM and Filella, M. (2000) Dispelling the myths: Is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters?. *Limnology and Oceanography* **45**(6),1341-1357.
- Vasconcelos, MTSD and Leal, MFC. (2001) Antagonistic interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae *Emiliania huxleyi*. *Marine Chemistry* **75**(1-2),123-139

Tables and Figure

		1	2	3	4	5	6	carboxylic	phenolic
LRFA	$L_{T,i}$	1.69	0.89	0.79	0.32	0.47	1.76	3.37	2.55
	$pK_{H,i}$	4.18	5.33	6.58	7.61	8.93	9.99		
LRHA	$L_{T,i}$	0.72	0.40	0.22	0.55	0.55	1.39	1.34	2.49
	$pK_{H,i}$	4.71	5.90	6.67	7.74	9.2	10.08		

Table 1. Acidic parameters ($pK_{H,i}$ and $L_{T,i}$ meq.g⁻¹_{NOM}) modelling potentiometric titrations of LRFA and LRHA concentrated solutions (226.8 and 205.0 mg_{NOM}.l⁻¹)

LRFA	[NOM] mg.l ⁻¹						carboxylic	phenolic	ratio
	1	2	3	4	5	6			
226.8	1.69	0.89	0.79	0.32	0.47	1.76	3.36	2.55	1.32
113.4	1.39	0.95	0.80	0.37	0.44	2.39	3.14	3.20	0.98
22.7	0.37	1.35	1.38	0.50	0.82	10.82	3.10	12.15	0.25
11.3	1.87	0.75	2.47	0.63	1.26	19.49	5.09	21.38	0.24
4.5	0.74	1.06	5.53	0.00	4.01	46.85	7.32	50.85	0.14

LRHA	$L_{T,i}$ meq.g ⁻¹ _{NOM}						carboxylic	phenolic	ratio
	1	2	3	4	5	6			
205.0	0.72	0.40	0.22	0.55	0.55	1.39	1.35	2.50	0.54
102.5	0.63	0.51	0.33	0.59	0.77	2.51	1.47	3.87	0.38
20.5	0.00	0.94	0.95	0.48	0.88	11.76	1.89	13.13	0.14
10.3	0.00	2.02	1.04	0.55	1.91	20.13	3.06	22.59	0.14
4.1	3.28	2.39	3.25	2.69	9.88	47.05	8.92	59.62	0.15

Table 2. Optimised sites densities for potentiometric titrations of LRFA and LRHA diluted solutions

solution	factor	Acetate meq		Phenol meq		ratio	
		calculated	expected	calculated	expected	calculated	expected
concentrated		0.490	0.507	0.517	0.498	0.95	1.02
diluted	2	0.249	0.254	0.271	0.249	0.92	1.02
diluted	5	0.101	0.101	0.120	0.100	0.84	1.02
diluted	10	0.053	0.051	0.066	0.050	0.81	1.02
diluted	20	0.030	0.025	0.041	0.025	0.73	1.02
diluted	50	0.016	0.010	0.027	0.010	0.60	1.02
diluted	100	0.009	0.005	0.028	0.005	0.28	1.02
diluted	200	0.005	0.003	0.018	0.002	0.29	1.02

Table 3. Calculated and expected amounts (meq) of acetate and phenol in model solutions

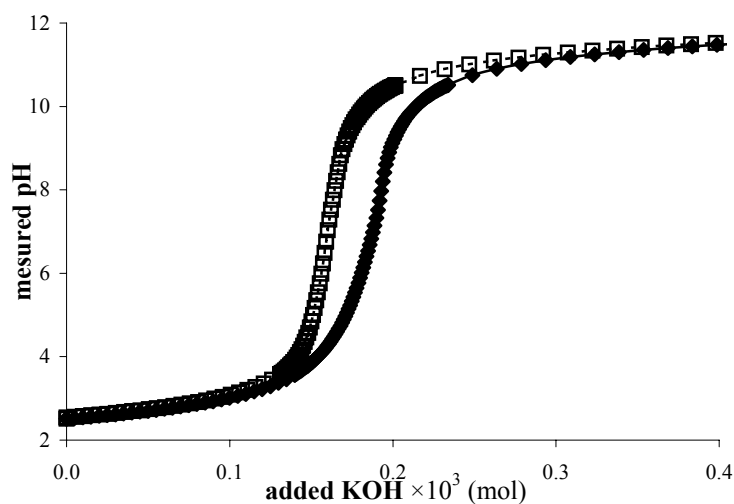


Figure 1. LRFA (◆) and LRHA (□) solutions potentiometric titration curves

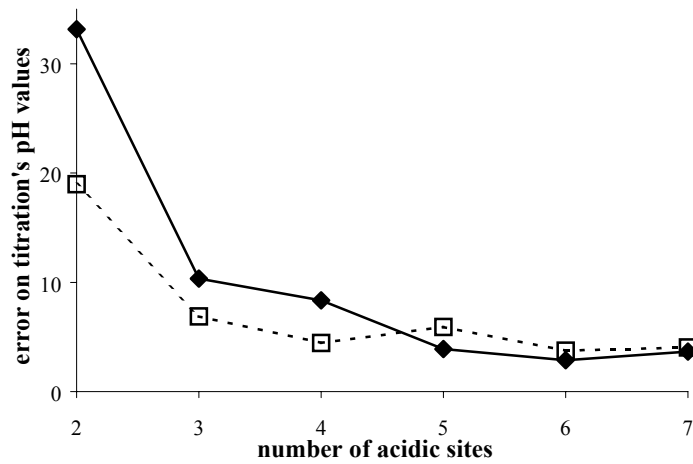


Figure 2. Error evolution on PROSECE optimisation of LRFA (♦) and LRHA (□) titrations, as a function of the defined acidic sites number

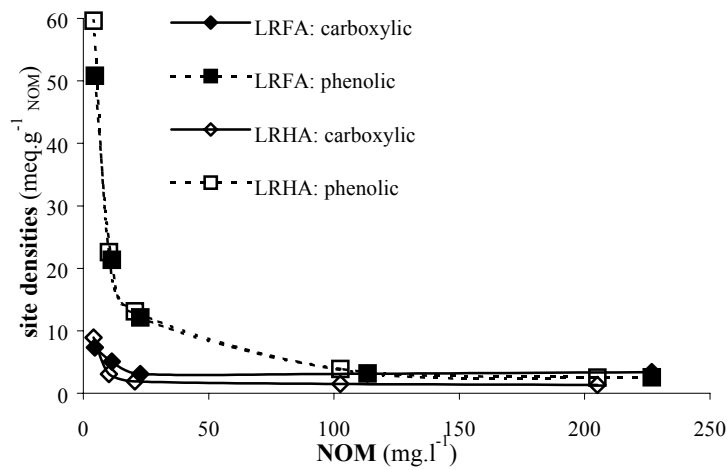


Figure 3. Carboxylic-like and phenolic-like sites densities optimised for LRFA and LRHA concentrated and diluted solutions

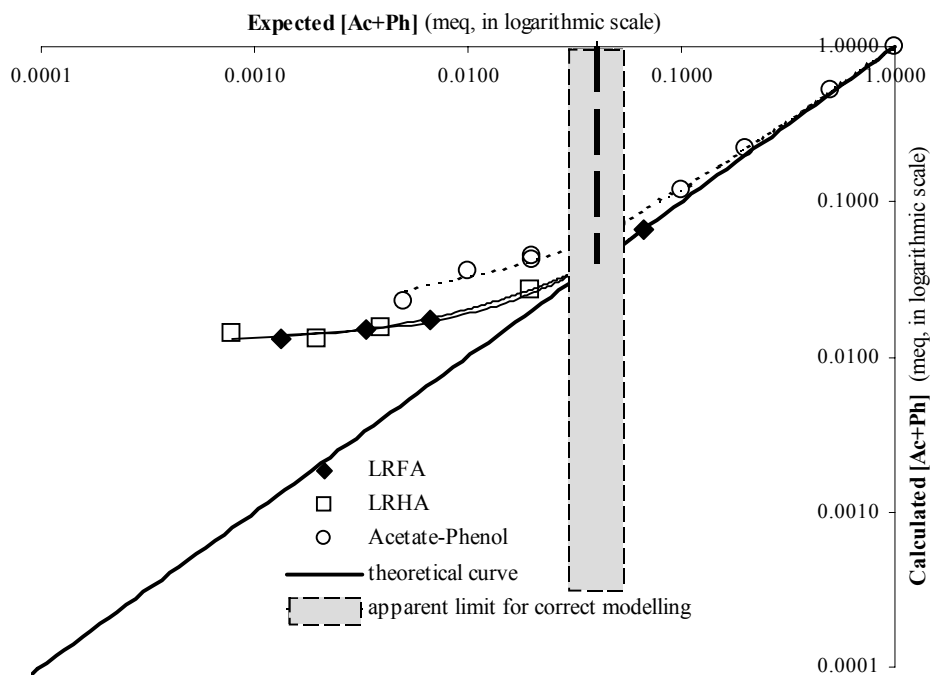


Figure 4. Calculated total sites concentrations as a function of expected ones for model and extracted NOM solutions

LISTE DES FIGURES:

Figure **I.1**: réactions d'échanges du métal M avec les constituants organiques et inorganiques du milieu (d'après Buffle, 1988)

Figure **I.2**: modèle de Kleinhempel

Figure **II.1**: principe de la détermination de la *capacité complexante* par la méthode de Chau

Figure **II.2**: Distributions discrète (6 sites) et continue (bimodales)

Figure **II.3**: représentation schématique des interactions d'un groupement fonctionnel d'une MON avec différents cations, modélisées par N ligands "classiques" et une seule *quasi-particule* non-spécifique à N paramètres

Figure **II.4**: les 3 types de *quasi-particules* utilisées pour modéliser les propriétés d'une MON vis-à-vis du proton et des métaux traces

Figure **II.5**: fonctionnement du module de spéciation utilisé par *PROSECE*

Figure **II.6**: évolution d'un simplexe à taille fixe

Figure **II.7**: Principe de fonctionnement du logiciel *PROSECE*

Figure **II.8**: Répartition des propriétés de complexation des ligands utilisés dans cette étude (●: système à 1 ligand, ○: 1^{er} ligand du système à 2 ligands, ◇: 2nd ligand du système à 2 ligands) ainsi que celles de Pižeta et Branica (1997) (▲: système à 1 ligand, ×: 1^{er} ligand du système à 2 ligands, □: 2nd du système à 2 ligands)

Figure **II.9**: titrations non-bruitées pour le modèle à 1 ligand (les valeurs des paramètres correspondant sont signalés par (*) dans le tableau **II.2a**)

Figure **II.10**: Représentation des erreurs e_2 (en %) sur la détermination de K et L_T pour les trois expériences (différenciées par les valeurs théoriques de L_T) traitées par les différents modes de titration et les techniques de traitement de données

Figure **II.11**: titrations simulées non-bruitées pour les expériences n°3, 5 et 7

Figure **II.12**: Représentation des erreurs sur la détermination des K_i et L_{Ti} pour les expériences en mode décade traitées par la linéarisation de Ružić

Figure **II.13a**: graphiques contours des erreurs sur $L_{IT}, K_1, L_{2T}, K_2 = f(\log(K_1 \times L_{IT}), \log(K_2 \times L_{2T}))$ obtenues pour les quatre types de traitement de données, en mode de titration linéaire

Figure **II.13b**: graphiques contours des erreurs sur $L_{IT}, K_1, L_{2T}, K_2 = f(\log(K_1 \times L_{IT}), \log(K_2 \times L_{2T}))$ obtenues pour les quatre types de traitement de données, en mode de titration logarithmique

- Figure **II.13c**: graphiques contours des erreurs sur $L_{1T}, K_1, L_{2T}, K_2 = f(\log(K_1 \times L_{1T}), \log(K_2 \times L_{2T}))$ obtenues pour les quatre types de traitement de données, en mode de titration décade
- Figure **II.14**: *graphiques contours* de “ $K_{I \text{ erreur}} = f((L_{1T} \times K_1), (L_{2T} \times K_2))$ ” obtenue pour la linéarisation de Ružić en mode linéaire (A) et logarithmique (B) (+: $K_{I \text{ erreur}}$ calculée, ■: $K_{I \text{ erreur}}$ calculée mais valeur de K_I négative, □: $K_{I \text{ erreur}}$ calculée supérieure à 1000)
- Figure **II.15**: variation de l'écartype sur la concentration en Cd labile déterminé par DPASV au cours d'une titration logarithmique sur une eau ultra-pure (pH<2)
- Figure **II.16**: Cas I - représentation schématique des valeurs de constantes caractérisant les 24 expériences simulées
- Figure **II.17**: Modification des données simulées par MINEQL de l'expérience 5' par ajout de bruit aléatoire et élimination des valeurs de M_f inférieures à 0.1 nM
- Figure **III.1**: Influence de la vitesse d'agitation (T_d : 60s, S: 0.52mm²), du temps de dépôt (V: 2000rpm, S: 0.52mm²) et de la taille de la goutte (T_d : 60s, V: 2000rpm) sur l'aire du pic de réoxydation du Cd
- Figure **III.2**: Influence du temps d'équilibre sur l'aire du pic de cadmium (T_d : 60s, V: 2000rpm, S: 0.52mm²)
- Figure **III.3**: Schéma de la cellule voltamétrique utilisée pour les mesures de DPASV
- Figure **III.4A**: voltamogrammes obtenus sur un échantillon d'eau de mer acidifié
- Figure **III.4B**: Ajouts dosés de Cd, Pb, Cu
- Figure **III.5**: Traitement des voltamogrammes obtenus pour les ajouts dosés de Cd, Pb, Cu
- Figure **III.6**: Détermination des concentrations en Cd, Pb, Cu mesurées par DPASV
- Figure **III.7**: Schéma du stand d'ajouts logarithmiques – mesure par DPASV
- Figure **III.8**: voltamogrammes obtenus avant (A) et après (B) élimination des interférences électriques (40 mL, pH 7.8, I 0.1, $[Cd_{aj}] 5 \times 10^{-10} \text{ mol.l}^{-1}$)
- Figure **III.9**: rampe de potentiel utilisée en mode "Differential Pulse"
- Figure **III.10**: fonction de *Kambara* et fonction dérivée
- Figure **III.11**: fitting d'un voltamogramme expérimental, obtenu au cours d'une titration logarithmique d'un échantillon naturel par ajouts de Cd, par les différentes fonctions testées
- Figure **III.12**: Schéma du stand de titrations acido-basiques

- Figure **III.13**: Courbes expérimentales (V_{KOH} , pH) et dérivées (V_{KOH} , dpH/dV) obtenues pour les titrations acido-basiques d'EDTA et d'eau ultra-pure
- Figure **III.14**: Quantité de OH^- (ΔnOH^-) nécessaire au dosage des sites acides de l'EDTA en fonction du pH, dérivées première et seconde
- Figure **IV.1**: décroissance du pic de Cd (DPASV) en fonction du temps d'attente après l'ajout de Cd à une solution d'AFSR
- Figure **IV.2**: Titrations logarithmiques d'AFSR par Cd (**A**) et Pb (**B**) à pH 7.8
- Figure **IV.3**: Modélisation des titrations logarithmiques de l'AFSR par Cd et Pb à pH 7.8 à l'aide d'un modèle discret à 4 *quasi-particules*
- Figure **IV.4**: Localisation des stations d'échantillonnage de l'estuaire de La Seine
- Figure **IV.5**: Représentation des données expérimentales (V_{KOH} , pH) issues d'une titration acido-basique d'un échantillon prélevé à Tancarville (11/12/02) (**A**), et courbe (pH, ΔnOH^-) résultante du traitement de ces données (**B**)
- Figure **IV.6**: Fitting des données de la titration acido-basique de l'échantillon Tancarville (11/12/02) par un modèle à 6 *quasi-particules*
- Figure **IV.7**: Variations des teneurs en COD
- Figure **IV.8**: Variations des concentrations en sites de types carboxylique et phénolique
- Figure **IV.9**: Variations spatio-temporelles des rapports de fluorescence $R_{a,c}$
- Figure **IV.10**: Distribution des rapports de fluorescence $R_{a,c}$ mesurées pour toutes les prélèvements
- Figure **IV.11**: Variations des concentrations en chlorophylle *a* et en phaeo-pigments d'avril à juin le long de La Seine
- Figure **IV.12**: Variations des concentrations en COD et POC d'avril à juin le long de La Seine
- Figure **IV.13**: Résultats de la modélisation des sites acides des échantillons de quatre stations, représentés sous forme de graphiques radar afin d'exprimer les concentrations L_{iT} des 6 *quasi-particules*, réparties en type carboxylique (Ca1, Ca2 et Ca3) et phénolique (Ph1, Ph2 et Ph3) dans l'ordre croissant de $pK_{H,i}$.
- Figure **IV.14**: Courbes des titrations potentiométriques des solutions d'AFLR (\blacklozenge) et AHLR (\square)
- Figure **IV.15**: Evolution de l'erreur sur l'optimisation par *PROSECE* des titrations de l'AFLR (\blacklozenge) et de l'AHLR (\square), en fonction du nombre de sites acides définis
- Figure **IV.16**: Densités en sites de type carboxylique et de type phénolique optimisés pour les solutions concentrées et diluées d'AFLR et AHLR

- Figure **IV.17**: Concentrations totales calculées en sites en fonction des concentrations totales attendues pour les solutions modèles et de MO extraites
- Figure **IV.18**: Modélisation par *PROSECE* d'une titration simulée de quenching de fluorescence
- Figure **IV.19**: Valeurs de paramètres théoriques, avant (initial) et après (*PROSECE*) l'optimisation
- Figure **IV.20**: Modélisation (1 et 2 ligands de type (α)) par *PROSECE* d'une expérience de quenching de fluorescence réalisée sur un échantillon naturel par ajouts de Cu^{2+}
- Figure **IV.21**: variations de pH mesurées au cours des expériences de titrations logarithmiques
- Figure **IV.22**: Evolution du massif de pic (Cd+Pb) au cours de la titration de l'échantillon osmosé, à pH naturel, par ajouts de Pb en mode logarithmique (Bi : n° de burette, Ai: n° d'ajout, tableau **III.2**)
- Figure **IV.23**: Fitting d'un voltamogramme par 3 fonctions en $1/\cosh^2$ représentant les pics de Cd, Pb et Pb'
- Figure **IV.24**: Variations des proportions en pics (Pb) et (Pb') lors des titrations de l'échantillon par ajouts de Pb en mode logarithmique, à pH naturel (**A**) et tamponné acétique (**B**)
- Figure **IV.25**: Courbes $pM = f(pMT)$ obtenues pour les titrations logarithmiques réalisées sur l'échantillon osmosé par ajouts de Cd (**A**) et Pb (**B**) à pH naturel et tamponné acétique

LISTE DES TABLEAUX:

Tableau **II.1**: principe des méthodes de traitement de données utilisées pour la détermination des propriétés de complexation de métaux

Tableau **II.2a**: Résultats obtenus pour le système à un ligand

Tableau **II.2b**: Coefficients de corrélation (R) entre les valeurs de $\log(e_1)$ et $\log(e_2)$

Tableau **II.3**: Systèmes à 2 ligands, valeurs des paramètres de complexations utilisées pour simuler les expériences

Tableau **II.4**: Influence de la distribution aléatoire du bruit sur la détermination des paramètres de complexation pour différentes techniques de traitement de données (valeurs moyennes, déviations standards et nombre de valeurs négatives calculées pour 10 set différents de bruits ajoutés aux expériences simulées n°5 et 7)

Tableau **II.5**: Valeurs des paramètres des 6 expériences simulées, ajoutées pour tester la capacité de prédiction des *graphiques contours*, et valeurs de K_I obtenues par la linéarisation de Ružić pour les titrations linéaire et logarithmique (les erreurs en *italique* correspondent à des valeurs négatives de K_I), Figure **II.14** (×)

Tableau **II.6**: domaines de variations des constantes de formation des complexes mono-, polydentates et mixtes (avec ω : 2, 2×10^3 et 2×10^6)

Tableau **III.1**: paramètres optimisés de la *procédure* de DPASV pour la détermination des concentration totales en métaux traces (Cd, Pb et Cu à pH<2)

Tableau **III.2**: volumes de solutions standards à 1, 10, 100 et 1000 μ M ajoutés pour réaliser les titrations en mode logarithmique sur 40mL d'échantillon

Tableau **III.3**: paramètres optimisés de la *procédure* de DPASV pour la détermination des concentration en métaux traces labiles durant les titrations logarithmiques

Tableau **IV.1**: Conditions électrochimiques optimales à la détermination de la spéciation des métaux traces par DPASV

Tableau **IV.2**: Paramètres de complexation optimisés pour un modèle à quatre *quasi-particules* (A, MINEQL-Simplex) et un modèle à deux *quasi-particules* (B, Excel)

Tableau **IV.3**: Résumé des campagnes et des résultats obtenus

Tableau **IV.4**: Paramètres d'acidité ($pK_{H,i}$ et L_{iT} meq.g⁻¹_{MON}) des sites utilisés pour modéliser les titrations potentiométriques des solutions concentrées d'AFLR et AHLR

Tableau **IV.5**: Densités en sites optimisées pour les titrations potentiométriques des solutions diluées d'AFLR et AHLR

Tableau **IV.6**: Concentrations calculées et attendues en acétate et phénol pour les solutions modèles

Tableau **IV.7**: Résultats de l'optimisation des paramètres de complexation et d'optimisation par fitting des données expérimentales de la figure **IV.20**

Tableau **IV.8**: Concentrations en ions majeurs mesurées sur l'échantillon osmosé

Tableau **IV.9**: Concentrations en ions majeurs mesurées dans le surnageant et le précipité

BIBLIOGRAPHIE:

- Abate G., Masini J.C., 2002, Complexation of Cd(II) and Pb(II) with humic acids studied by anodic stripping voltammetry using differential equilibrium functions and discrete site models, *Organic Geochemistry*, 33, 1172-1181
- Achterberg E., Braungardt C., 1999, Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters., *Analytica Chimica Acta*, 400, 381-397
- Al-Farawati, R., Van Den Berg, C.M.G., 1997, The determination of sulfide in seawater by flow-analysis with voltammetric detection, *Marine Chemistry*, 57, 277-286
- Baker A., 2001, Fluorescence Excitation-Emission Matrix Characterization of Some Sewage-Impacted Rivers. *Environmental Science and Technology*, 35, 948-953
- Bard A.J., Faulkner L.R., 1980, Electrochemical methods. Fundamentals and applications, J. Wiley sons Sons, New York, p. 332
- Bard A.J., Faulkner L.R., 1983, Electrochimie, Principes, méthodes et applications, Masson, 791p
- Belmont C., Tercier M.-L., Buffle J., Fiaccabrino G.C., Koudelka-Hep, M., 1996, Mercury-plated iridium-based microelectrode arrays for trace metals detection by voltammetry: optimum conditions and reliability, *Analytica Chimica Acta*, 329, 203-214
- Benedetti M.F., Van Riemsdijk W.H., Koopal L.K., Kinniburgh D.G., Goody D.C., Milne C.J., 1996, Metal ion binding by natural organic matter: From the model to the field., *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60, 2503-2513
- Bianchi T.S., Rol C., Widbom B., Elmgren B., 2002, Phytoplankton Pigments in Baltic Sea Seston and Sediments: Seasonal Variability, Fluxes, and Transformations. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55, 369–383
- Biersmith A., Benner R., 1998, Carbohydrates in phytoplankton and freshly produced dissolved organic matter, *Marine Chemistry*, 63, 131–144
- Bond A.M., 1999, 200 years of practical electroanalytical chemistry: past, present and future directions illustrated by reference to the on-line, on-stream and off-line determination of trace metals in zinc plant electrolyte by voltammetric and potentiometric techniques, *Analytica Chimica Acta*, 400, 1-3, 333-379
- Bonfil Y., Brand M., Kirowa-Eisner E., 2000, Trace determination of mercury by anodic stripping voltammetry at the rotating gold electrode, *Analytica Chimica Acta*, 424, 65-76
- Boussemart M.J., 1989, Méthodes de caractérisation physico-chimique de la matière organique naturelle dissoute dans les eaux interstitielles de sédiments marins côtiers, Thèse de l'Université de Toulon

- Boussemart M.J., Menargues L., Benaïm J.Y., 1993, Anodic Stripping Voltametry of Copper in Natural Waters: A Qualitative Approach to the Additional Peak(s) Occurrence, *Electroanalysis*, 5, 125-133
- Brown G.K., Cabaniss S.E., MacCarthy P., Leenheer J.A., 1999, Cu(II) binding by a pH-fractionated fulvic acid, *Analytica Chimica Acta*, 402, 183-193
- Bruland K.W., 1992, Complexation of cadmium by natural organic ligands in the central North Pacific, *Limnology and Oceanography*, 1992, 37, 1008-1017
- Bruland K.W., Rue E.L., Donat J.R., Skrabal S.A., Moffett J.W., 2000, Intercomparison of voltammetric techniques to determine the chemical speciation of dissolved copper in a coastal seawater sample, *Analytica Chimica Acta*, 405, 1-2, 99-113
- Bryan S.E., Tipping E., Hamilton-Taylor J., 2002, Comparison of measured and modelled copper binding by natural organic matter in freshwaters, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133, 37-49
- Buffle J., 1981, Calculation of the surface concentration of the oxidized metal during the stripping step. in the anodic stripping techniques and its influence on speciation measurements in natural waters, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 125, 273-294
- Buffle J., 1988, Complexation reactions in aquatic systems, *Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 692p
- Byrne R.H., 1980, Theoretical upper-bound limitations for mixed-ligand complexes in solution, *Marine Chemistry*, 9, 75-80
- Byrne R.H., 1983, Trace metal complexation in high ligand variety natural media, *Marine Chemistry*, 12, 15-24
- Byrne R.H., 1996, Specific problems in the measurement and interpretation of complexation phenomena in seawater, *Pure and Applied Chemistry*, 68, 1639-1656
- Cabaniss S.E., Shuman M.S., 1986, Combined ion selective electrode and fluorescence quenching detection for copper-dissolved organic matter titrations, *Analytical Chemistry*, 58, 398-401
- Cao J., Lam K.C., Dawson R.W., Liu W.X., Tao S., 2004, The effect of pH, ion strength and reactant content on the complexation of Cu²⁺ by various natural organic ligands from water and soil in Hong Kong, *Chemosphere*, 54, 507-514
- Cathalifaud G., Ayele J., Mazet M., 1996, Etude de la complexation des ions Aluminium par des molécules organiques: constantes et stoechiométrie des complexes. Application au traitement de potabilisation des eaux, *Water Research*, 31, 689-698
- Cauwet G., Déliat G., Krastev A., Shtereva G., Becquevort S., Lancelot C., Momzikoff A., Saliot A., Cociasu A., Popa L., 2002, Seasonal DOC accumulation in the Black Sea: a regional explanation for a general mechanism. *Marine Chemistry*, 79, 193-205
- Chau Y.K., Lum-Shue-Chan K., 1974, Determination of labile and strongly bound metals in lake water, *Water Research*, 8, 383-388

- Chen J., LeBoeuf E.J., Dai S., Gu B., 2003, Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 50, 639–647
- Chiffolleau J.F., Claisse D., Cossa D., Ficht A., Gonzalez J.L., Guyot T., Michel P., Miramand P., Oger C., Petit F., 2001, Programme scientifique Seine-Aval, 8 - La contamination métallique, ALT Brest, 39p
- Christensen J.B., Christensen T.H., 2000, The effect of pH on the complexation of Cd, Ni and Zn by dissolved organic carbon from leachate-polluted groundwater, *Water Research*, 34, 3743-3754
- Christensen J.B., Tipping E., Kinniburgh D.G., Gron C., Christensen T.H., 1998, Proton Binding by Groundwater Fulvic Acids of Different Age, Origins, and Structure Modeled with the Model V and NICA-Donnan Model. *Environmental Science and Technology*, 32, 3346-3355
- Christensen, J.B., Botma, J.J., Christensen, T.H., 1999, Complexation of Cu and Pb by DOC in polluted groundwater: a comparison of experimental data and predictions by computer speciation models (WHAM and MINTEQA2), *Water Research*, 33, 3231-3238
- Cukrowski I., Hancock R.D., Luckay R.C., 1996, Formation constant calculation for non-labile complexes based on a labile part of the metal-ligand system. A differential pulse polarographic study at fixed ligand to metal ratio and varied pH: application to polarographically inactive complexes, *Analytica Chimica Acta*, 319, 39-48
- Davison W., Zhang H., 1994, In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels, *Nature*, 367, 546-548
- de Souza Sierra MM, Arend K, Neves Fernandez A, Giovanela M, Szpoganicz B., 2001, Application of potentiometry to characterize acid and basic sites in humic substances: Testing the BEST7 program with a weak-acid mixture, *Analytica Chimica Acta*, 445, 89-98
- Dixon E., Gardner M., Parry S., 1999, Optimised design for complexation capacity titrations, *Chemical Speciation Bioavailability*, 11, 51-56
- Donat J., Van Den Berg C., 1992, A new cathodic stripping voltammetric method for determining organic copper complexation in seawater, *Marine Chemistry*, 38, 69-90
- Dzombak D., Fish W., Morel F.L.L., 1986, Metal-Humate interactions: 1 Discrete ligand and continuous distribution models, *Environmental Science and Technology*, 20, 669-675
- Eary L.E., Jenne E.A., 1992, Version 4.00 of the MINTEQ Geochemical Code. Pacific Northwest National Laboratory Report PNL-8190, Richland, WA, 155p
- Erk M., Raspor B., 2001, Anodic Stripping Voltammetry in the complexation study of the peptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala [56-61] MT I and cadmium: application in determination of the complexing capacity and stability constant., *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 502, 174-179
- Esteves da Silva J.C.G., Machado A.A.S.C., Oliveira C.J.S., Pinto M.S.S.D.S., 1998, Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu(II), Fe(III) and UO₂²⁺, *Talanta*, 45, 1155-1165

- Esteves da Silva J.C.G., Oliveira C.J.S., 2002, Metal ion complexation properties of fulvic acids extracted from composted sewage sludge as compared to a soil fulvic acid, *Water Research*, 36, 3404-3409
- Fajon C., Cauwet G., Lebaron P., Terzic S., Ahel M., Malej A., Mozetic P., Turk V., 1999, The accumulation and release of polysaccharides by planktonic cells and the subsequent bacterial response during a controlled experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, 351–363
- Felmy A.R., Girvin D., Jenne E.A., 1984, MINTEQ: A Computer Program for Calculating Aqueous Geochemical Equilibria. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 98p
- Fiala M., Cahet G., Jacques G., Neveux J., Panouse M., 1976, Fertilisation de communautés phytoplanctoniques. I. cas d'un milieu oligotrophe: Méditerranée nord-occidentale, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 24, 2, 151-163
- Fischer G., Gersonde R., Wefer G., 2002, Organic carbon, biogenic silica and diatom fluxes in the marginal winter sea-ice zone and in the Polar Front Region: interannual variations and differences in composition, *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49, 1721-1745
- Fish W., Dzombak D.A., Morel F.M.M., 1986, Metal-Humate interactions: 2 Application and comparison of models., *Environmental Science and Technology*, 20, 676-683
- Fukushima T., Ishibashi T., Imai A., 2001, Chemical Characterization of Dissolved Organic Matter in Hiroshima Bay, Japan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 53, 51–62
- Garnier C., Pižeta I., Mounier S., Benaïm J.Y., Branica M., 2004a, Influence of the type of titration and of data treatment methods on metal complexing parameters determination of single- and multi-ligand systems measured by stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 505, 263-275
- Garnier C., Mounier S., Benaïm J.Y., 2004b, Metal logarithmic scale titration as a tool for complexing ligand distribution determination: an application by DPASV, *Environmental Technology*, 25, 589-599
- Garnier C., Mounier S., Benaïm J.Y., 2004c, Influence of dissolved organic carbon content on modelling natural organic matter acid-base properties, *Water Research*, 38, 3685-3692
- Gerringa L.J.A., Herman P.M.J., Poortvliet T.C.W., 1995, Comparison of the linear Van den Berg/Ružić transformation and a non-linear fit of the Langmuir isotherm applied to Cu speciation data in the estuarine environment, *Marine Chemistry*, 48, 131-142
- Gonzalez J.L., Thouvenin B., Dange C., Fiandrino A., Chiffolleau J.F., 2001, Modeling of Cd speciation and dynamics in the Seine estuary (France), *Estuaries*, 24, 1041-1055
- Gran G., 1988, Equivalence volumes in potentiometric titrations, *Analytica Chimica Acta*, 206, 111-123
- Grimm D.M., Azarraga L.V., Carreira L.A., Susetyo W., 1991, Continuous Multiligand Distribution Model Used to Predict the Stability Constant of Cu(II) Metal Complexation

- with Humic Material from Fluorescence Quenching Data, *Environmental Science and Technology*, 25, 1427
- Gustafsson J.P., Pechová P., Berggren D., 2003, Modeling Metal Binding to Soils: The Role of Natural Organic Matter, *Environmental Science and Technology*, 37, 2767-2774
- Hart B.T., 1981, Trace metal complexing capacity of natural waters: a review, *Environmental Technology Letters*, 2, 95-110
- Heyrovsky J., Kuta J., 1966, Principles of polarography, Academic Press, New York, 121p
- Hirose K., 1994, Conditional stability constants of metal complexes of organic ligands in sea water: past and present, and a simple coordination chemistry model, *Analytica Chimica Acta*, 284, 621-634
- Huber C., Filella M., Town R.M., 2002, Computer modelling of trace metal ion speciation: practical implementation of a linear continuous function for complexation by natural organic matter, *Computer & Geosciences*, 28, 587-596
- Irigoién X, Castel J., 1997, Light Limitation and Distribution of Chlorophyll Pigments in a Highly Turbid Estuary: the Gironde (SW France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 44, 507-517
- Kambara T., 1954, Polarographic diffusion current observed with square wave voltage I. Effect produced by the sudden change of electrode potential, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 27, 523-526
- Kinniburgh D.G., Milne C.J., Benedetti M.F., Pinheiro J.P., Filius J., Koopal L.K., Van Riemsdijk W.H., 1996, Metal ion binding by humic acid: application of the NICA-Donnan Model, *Environmental Science and Technology*, 30, 1687-1698
- Kinniburgh D.G., Van Riemsdijk W.H., Koopal L.K., Borkovec M., Benedetti M.F., Avena M.J., 1999, Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids and surfaces*, 151, 147-166
- Kleinhempel D., 1970, *Albrecht Thaer Arch.*, 14, 3
- Kolb M., Rach P., Schäfer J., Wild A., 1992, Investigation of oxidative UV photolysis. I. Sample preparation for the voltammetric determination of Zn, Cd, Pb, Cu, Ni and Co in waters, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 342, 341-349
- Koukal, B., Guéguen, C., Pardos, M., Dominik, J., 2003, Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chemosphere*, 53, 953-961
- Kozelka P.B., Bruland K.W., 1998, Chemical speciation of dissolved Cu, Zn, Cd, Pb in Narragansett Bay, Rhode Island, *Marine Chemistry*, 60, 267-282
- Lepane V., Persson T., Wedborg M., 2003, Effects of UV-B radiation on molecular weight distribution and fluorescence from humic substances in riverine and low salinity water. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 56, 161-173
- Letizia D, Gnudi F., 1999, Phenolic compounds in surface water. *Water Research*, 33, 3213-3219

- Locatelli C., Torsi G., 2001, Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 509, 80-89
- Lorenzo J.I., Nieto O., Beiras R., 2002, Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater, *Aquatic Toxicology*, 58, 27-41
- Lu Y., Allen H.E., 2002, Characterization of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM)-link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg, *Water Research*, 36, 5083-5101
- Mackey D.J., O'Sullivan J.E., Watson R.J., Dal Pont G., 1997, Interference effects in the extraction of trace metals from estuarine waters, *Marine Chemistry*, 59, 113-126
- Martin-Mousset B., Croue J.P., Lefebvre E., Legube B., 1997, Distribution and characterization of the dissolved organic matter of surface waters. *Water Research*, 31, 541-553
- Masini J., Abate G., Lima E., Hahn L., Nakamura M., Lichtig J., Nagatomo H., 1998, Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. *Analytica Chimica Acta*, 364, 223-233
- Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J., Smeyers-Verbeke J., 1997, Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A, Elsevier, Amsterdam
- McKnight D.M., Boyer E.W., Westerhoff P.K., Doran P.T., Kulbe T., Anderson D.T., 2001, Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic materials and aromaticity. *Limnology and Oceanography*, 46, 8-48
- Menargues L., 1989, Etude des associations cuivre-matière organique dans les eaux interstitielles de sédiments par DPASV et pseudopolarographie, Thèse de l'Université de Toulon
- Meylan S., Odzak N., Behra R., Sigg L., 2004, Speciation of copper and zinc in natural freshwater: comparison of voltammetric measurements, diffusive gradients in thin films (DGT) and chemical equilibrium models, *Analytica Chimica Acta*, 510, 91-100
- Milne J., Kinniburgh D.G., Tipping E., 2001, Generic NICA-Donnan Model Parameters for Proton Binding by Humic Substances, *Environmental Science and Technology*, 35, 2049-2059
- Morel M.L.L., 1983, Principles of aquatic chemistry, Wiley-InterScience, New York
- Morelli E., Cruz B.H., Somovigo S., Scarano G., 2002, Speciation of cadmium-glutamyl peptides complexes in cells of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *Plant Science*, 163, 807-813
- Mounier S., Patel N., Quilici L., Benaim J.Y., Benamou C., 1999b, Fluorescence 3D de la matière organique dissoute du fleuve Amazone. *Water Research* 33, 2571-1533
- Mounier S., Braucher R., Benaim J.Y., 1999a, Differentiation of organic matter's properties of the Rio Negro basin by cross flow ultra-filtration and UV-spectrofluorescence, *Water Research*, 33, 2363-2373

- Muller F.L.L., 1996, Interactions of copper, lead and cadmium with the dissolved, colloidal and particulate components of estuarine and coastal waters, *Marine Chemistry*, 52, 245-268
- Muller F.L.L., 1999, Evaluation of the effects of natural dissolved and colloidal organic ligands on the electrochemical lability of Cu, Pb and Cd in the Arran Deep, Scotland, *Marine Chemistry*, 67, 43-60
- Muller F.L.L., Gulin S.B., Kalvøy Å., 2001, Chemical speciation of copper and zinc in surface waters of the western Black Sea, *Marine Chemistry*, 76, 233-251
- Ndung'u K., Franks R.P., Bruland K.W., Flegal A.R., 2003, Organic complexation and total dissolved trace metal analysis in estuarine waters: comparison of solvent-extraction graphite furnace atomic absorption spectrometric and chelating resin flow injection inductively coupled plasma-mass spectrometric analysis, *Analytica Chimica Acta*, 481, 127-138
- Omanović D., Pižeta, I., Peharec, Z., Branica, M., 1996, Voltammetric determination of the metal complexing capacity in model solutions, *Marine Chemistry*, 53, 1-2, 121-129
- Omanović D., Branica M., 2003, Pseudopolarography of trace metals: Part I. The automatic ASV measurements of reversible electrode reactions, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 543, 1, 83-92
- Parkhurst D.L., Thorstenson D.C., Plummer L.N., 1980, PHREEQE-a computer program for geochemical calculations. US Geological Survey Report, USGS/WRI-80-96, 193p
- Patel N., Mounier S., Benaim J.Y., 2002, Excitation-emission fluorescence matrix to study pH influence on organic matter fluorescence in the Amazon basin. *Water Research*, 36, 2571-2581
- Pei J., Tercier-Waeber M., Buffle J., 2000, Simultaneous Determination and Speciation of Zinc, Cadmium, Lead, and Copper in Natural Water with Minimum Handling and Artifacts, by Voltammetry on a Gel-Integrated Microelectrode Array., *Analytical Chemistry*, 72, 161-171
- Perdue E.M., Lytle C.R., 1983, Distribution model for binding of protons and metal ions by humic substances, *Environmental Science and Technology*, 17, 654-660
- Pinheiro J.P., Mota A.M., Benedetti M.F., 1999, Lead and Calcium Binding to Fulvic Acids: Salt Effect and Competition, *Environmental Science and Technology*, 33, 3398-3404
- Pinheiro J.P., Mota A.M., Benedetti M.F., 2000, Effect of Aluminum Competition on Lead and Cadmium Binding to Humic Acids at Variable Ionic Strength, *Environmental Science and Technology*, 34, 5137-5143
- Pižeta I., Branica M., 1997, Simulation and fitting of anodic stripping voltammetry data for determination of the metal complexing capacity, *Analytica Chimica Acta*, 351, 73
- Pižeta I., Omanović D., Branica M., 1999, The influence of data treatment on the interpretation of experimental results in voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 401, 163-172
- Pižeta I., Billon G., Fischer J.C., Wartel M., 2003, Solid Microelectrodes for In Situ Voltammetric Measurements, *Electroanalysis*, 15, 1389-1396

- Ramos M.A., Fiol S., López R., Antelo J.M., Arce F., 2002, Analysis of the Effect of pH on Cu²⁺-Fulvic Acid Complexation Using a Simple Electrostatic Model, *Environmental Science and Technology*, 36, 3109-3113
- Raspor B., Valenta P., 1988, Adsorption of humic substances isolated from marine and estuarine sediments, *Marine Chemistry*, 25, 211-226
- Raspor B., Valenta P., Nürnberg H.W., Branica M., 1977, Application of polarography and voltammetry to speciation of trace metals in natural waters. II Polarographic studies on the kinetics and mechanism of Cd(II)-chelate formation with EDTA, *Thalassia Jugoslavica*, 13, 79-91
- Raspor B., Nürnberg H.W., Valenta P., 1985, The adsorption of humic substances from sea water at the hanging mercury drop electrode, *Rapp. Comm. Int. Mer Medit.*, 29
- Rijstenbil J.W., Gerringa L.J.A., 2002, Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper, *Aquatic Toxicology*, 56, 115-131
- Ringbom A., 1967, Les complexes en Chimie Analytique, Dunod, Paris, 369p
- Riso R.D., Le Corre P., Chaumery C.J., 1997, Rapid and simultaneous analysis of trace metals (Cu, Pb and Cd) in seawater by potentiometric stripping analysis, *Analytica Chimica Acta*, 351, 83-89
- Ritchie J.D., Perdue J.M., 2003, Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 67, 85-96
- Robertson A.P., Leckie J.O., 1999, Acid/Base, copper binding, and Cu²⁺/H⁺ exchange properties of a soil humic acid, an experimental and modeling study, *Environmental Science and Technology*, 33, 786-795
- Rollemberg M.C., Gonçalves M.S.L., 2000, Kinetics of uptake of cadmium by *Chlorella marina* in different media, *Bioelectrochemistry*, 52, 57-62
- Rozan T., Gaboury B., 1999a, Intercomparaison of DPASV and ISE for the Measurement of Cu Complexation Characteristics of NOM in Freshwater, *Environmental Science and Technology*, 33, 1766, 1770
- Rozan T., Gaboury B., 1999b, Geochemical factors controlling free Cu ion concentrations in river water, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63, 3311-3319
- Ružić I., 1982, Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation, *Analytica Chimica Acta*, 140, 99-113
- Ryan D.K., Weber J.H., 1982, Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constant of fulvic acid, *Analytical Chemistry*, 54, 986-990
- Saliot A., Derieux S., Sadouni N., Bouloubassi I., Fillaux J., Dagaur J., Momzikoff A., Gondry G., Guillou C., Breas O., Cauwet G., Deliat G. Winter and spring, 2002, characterisation of particulate and dissolved organic matter in the Danube-Black Sea mixing zone. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 54, 355-367

- Scarano G., Bramanti E., Zirino A., 1992, Determination of copper complexation in sea water by a ligand competition technique with voltammetric measurement of labile metal fraction, *Analytica Chimica Acta*, 264, 153-162
- Scarano G., Morelli E., 2002, Characterization of cadmium- and lead- phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure, *BioMetals*, 15, 145-151
- Scatchard G., 1949, The attraction of proteins for small molecules and ions, *Annals of New York Academy of Sciences*, 57, 660-672.
- Senesi N., Miano T.M., Provenzano M.R., Brunett G., 1991, Characterisation, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, 152, 259-271
- Serkiz S.M., Allison J.D., Perdue E.M., Allen H.E., Brown D.S., 1996, Correcting errors in the thermodynamic database for the equilibrium speciation model MINTEQA2, *Water Research*, 30, 1930-1933
- Seritti A., Morelli E., Nannicini L., Giambelluca A., Scarano G., 1994, Fluorescence emission characteristics of naturally occurring organic matter in relation to metal complexation studies, *The Science of the Total environment*, 148, 73
- Shuman M.S., Woodward G.P., 1976, Intermetallic compound formation between copper and zinc in mercury and its effects on anodic stripping voltammetry, *Analytical Chemistry*, 48, 1979-1983
- Sigg L., Stumm W., Behra P., 1992, *Chimie des milieux aquatiques*, Masson, Paris, 391p
- Slaveykova V.I., Wilkinson K.J., Ceresa A., Pretsch E., 2003, Role of Fulvic Acid on Lead Bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*, *Environmental Science and Technology*, 37, 1114-1121
- Smith D.S., Kramer J.R., 1998, Fluorescence Quenching and Aluminium Adsorption to Organic Substances, *Adsorption of Metals by Geomedia*
- Smith D.S., Kramer J.R., 1999, Multi-site proton interactions with natural organic matter, *Environmental International*, 25, 307-314
- Smith D.S., Kramer J.R., 2000, Multisite metal binding to fulvic acid determined using multiresponse fluorescence, *Analytica Chimica Acta*, 416, 211-220
- Sposito G., 1981, Trace Metals in contaminated waters, *Environmental Science and Technology*, 15, 396-403
- Sposito G., 1994, *Chemical equilibria and kinetics in soils*, Oxford university press, 268p
- Stevenson F.J., 1982, *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions*, Wiley Interscience, New York
- Takács M., Alberts J.J., Egeberg P.K., 1999, Characterization of natural organic matter from eight Norwegian surface waters: proton and copper binding. *Environment International*, 25, 315-323

- Thurman E.M., Aiken G.R., Ewald M., Fisher W.R., Förstner U., Hack A.H., Mantoura, 1988, Isolation of soil and aquatic humic substances. In: *Humic Substances and their Role in the Environment*. John Wiley & Sons Limited
- Tipping E., 1993, Modelling ion binding by humic acids, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 73, 117-131
- Tipping E., Hurley M.A., 1992, A unifying model of cation binding by humic substances, *Geochimica Cosmochimica Acta*, 56, 3627
- Town R.M., Filella M., 2000, Dispelling the myths: Is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters?, *Limnology and Oceanography*, 45, 1341-1357
- Turoczy N.J., Sherwood J.E., 1997, Modification of the Van Den Berg/Ružić method for the investigation of complexation parameters of natural waters, *Analytica Chimica Acta*, 354, 15-21
- Uncles R.J., Easton A.E., Griffiths M.L., Harris C., Howland R.J.M., Joint I., King R.S., Morris A.W., Plummer D.H., 1998, Concentrations of suspended chlorophyll in the tidal Yorkshire Ouse and Humber Estuary. *The Science of the Total Environment*, 210-211, 367-375
- Van den Berg C.M.G., 1982a, Determination of copper complexation with natural organic ligands in seawater by equilibration with MnO₂ I. Theory, *Marine Chemistry*, 11, 307-322
- Van den Berg C.M.G., 1982b, Determination of copper complexation with natural organic ligands in seawater by equilibration with MnO₂ II. Experimental procedures and application to surface seawater, *Marine Chemistry*, 11, 323-342
- Van den Berg C.M.G., 1984, Determination of the complexing capacity and conditional stability constants of complexes of copper(II) with natural organic ligands in seawater by cathodic stripping voltammetry of copper-catechol complex ions, *Marine Chemistry*, 15, 1-18
- Van den Berg C.M.G., 1989, Chapter 51: Electroanalytical Chemistry of Sea-water, In: *Chemical Oceanography*, Riley J.P. (Ed.), 9, 197-245, London
- Van Den Hoop M.A.G.T., Porasso R.D., Benegas J.C. , 2002, Complexation of heavy metals by humic acids: analysis of voltammetric data by polyelectrolyte theory, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 203, 105-116
- Van Den Hoop M.A.G.T., Van Leeuwen H.P., Pinheiro J.P., Mota A.M., Simoes Gonçalves M. de L., 1995, Voltammetric analysis of the competition between calcium and heavy metals for complexation by humic material, *Colloids and Surfaces*, 95, 305-313
- Van Staden, J.F., Matoetoe, M.C., 2000, Simultaneous determination of copper, lead, cadmium and zinc using differential pulse anodic stripping voltammetry in a flow system, *Analytica Chimica Acta*, 411, 1-2, 201-207
- Vasconcelos M.T.S.D., Leal M.F.C., 2001a, Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae, *Marine Chemistry*, 74, 65-85

- Vasconcelos M.T.S.D., Leal M.F.C., 2001b, Antagonistic interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae *Emiliana huxleyi*, *Marine Chemistry*, 75, 123-139
- Verweij W., Ružić I., 1997, Analysis of titration curves of lake tjeukemeer water with Cu(II). Identification of the formation of more than two groups of different complexes, *Croatica Chimica Acta*, 70, 419-434
- Wang J., 1985, Stripping Analysis, Principles, Instrumentation and Applications, VCH Publishers, 160p
- Wells M.L., Kozelka P.B., Bruland K.W., 1998, The complexation of "dissolved" Cu, Zn, Cd and Pb by soluble and colloidal matter in Narragansett Bay, RI, *Marine Chemistry*, 62, 203-217
- Westall J.C., 1982, FITEQL : a program for the determination of chemical equilibrium constants from experimental data, Technical Report, Department of chemistry, Oregon state university, Corvallis, OR
- Westall J.C., Zachary J.L., Morel F., 1976, MINEQL: a program for the calculation of chemical equilibrium composition of aqueous systems, R.M. parsons laboratory technical note 18, Massachusetts institute of technology, Cambridge, MA
- Wildgust M.A., Jones M.B., 1998, Salinity change and the toxicity of the free cadmium ion [Cd²⁺+aq] to *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea), *Aquatic Toxicology*, 41, 187-192
- Wrobel K., Sadi B.B.M., Castillo J.R., Caruso J.A., 2003, Effect of metal ions on the molecular weight distribution of humic substances derived from municipal compost: Ultrafiltration and size exclusion chromatography with spectrophotometric and inductively coupled plasma-MS detection, *Analytical Chemistry*, 75, 761-767
- Xue H., Sigg L., 1998, Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in fresh water, *Analytica Chimica Acta*, 363, 249-259
- Zelić M., 1993a, Design of experiments and data treatment in the study of mixed-ligand complexes, *Analytica Chimica Acta*, 271, 275-285
- Zelić M., 1993b, Factors affecting maximum relative concentrations of binary and ternary complexes in solutions, *Analytica Chimica Acta*, 281, 435-442
- Zsolnay A., 2003, Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions. *Geoderma*, 113, 187-209