



HAL
open science

Mécanismes d'adsorption des métaux lourds par les exopolysaccharides bactériens : Le système Xanthane-Cuivre comme modèle d'étude

Benjamin Causse

► **To cite this version:**

Benjamin Causse. Mécanismes d'adsorption des métaux lourds par les exopolysaccharides bactériens : Le système Xanthane-Cuivre comme modèle d'étude. Géochimie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00493322v2

HAL Id: tel-00493322

<https://theses.hal.science/tel-00493322v2>

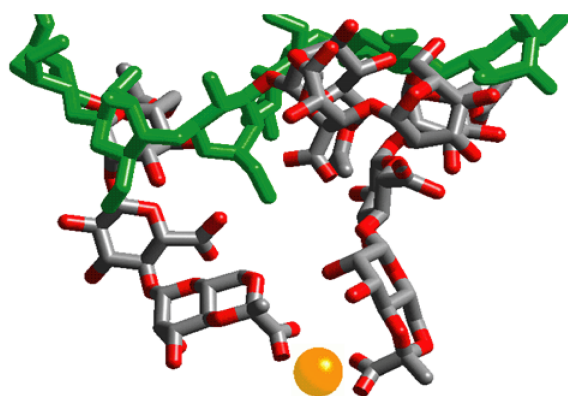
Submitted on 18 Jun 2010 (v2), last revised 22 Jun 2010 (v3)

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.

LABORATOIRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT
Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat
EQUIPE GEOCHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT
Laboratoire de Géophysique Interne et Tectonophysique

Mécanismes d'adsorption des métaux lourds par les
exopolysaccharides bactériens :
Le système Xanthane-Cuivre comme modèle d'étude



Thèse présentée par
Benjamin CAUSSE

en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble I
Ecole Doctorale Terre Univers Environnement

Soutenue publiquement le **11 Décembre 2009**

composition du jury :

Laura	SIGG	Pr. à l'EAWAG, Dübendorf-Zürich	Rapporteur
Montserrat	FILELLA	Pr. à l'Université de Genève	Rapporteur
Redouane	BORSALI	Dir. de Recherche au CERMAV, Grenoble	Examineur
Laurent	CHARLET	Pr. à l'Univ. J. Fourier, Grenoble	Président du jury
Géraldine	SARRET	Chargée de Recherche au LGIT, Grenoble	Membre invité
Karim	MAZEAU	Dir. de Recherche au CERMAV, Grenoble	Membre invité
Cécile	DELOLME	IDTPE-Chercheuse au LSE-ENTPE, Univ. de Lyon	Directrice de thèse
Lorenzo	SPADINI	Maître de conférence à l'Univ. J. Fourier, Grenoble	co-Directeur de thèse

Résumé-Abstract

Mécanismes d'adsorption des métaux lourds par les exopolysaccharides bactériens : Le système Xanthane-Cuivre comme modèle d'étude.

Les ExoPolySaccharides (EPS) bactériens constituent une fraction réactive du sol vis-à-vis des Eléments Traces Métalliques (ETM). Le système xanthane-cuivre est étudié comme modèle de complexation des ETM par les EPS. L'étude à l'échelle macroscopique, par titrages acido-basiques, détermine les valeurs des pKa du xanthane ($pK_{\text{moyenI}=0.1M}=2.5$) et propose un modèle électrostatique à condensateur cylindrique pour expliquer les variations de pKa en fonction de la force ionique. Les titrages en présence de cuivre et isothermes d'adsorption montrent un résultat inédit : le xanthane adsorbe plus de cuivre à pH3.5 qu'à pH5.5. Les valeurs des constantes apparentes de complexation valent $\text{Log}K_{\text{Cu-XanpH3.5}}=3$ et $\text{Log}K_{\text{Cu-XanpH5.5}}=2.6$. Les résultats de dichroïsme circulaire suggèrent un changement conformationnel du xanthane pH-dépendant. Un modèle thermodynamique à deux états (xanthane désordonné à pH<5 vs ordonné à pH>5), couplé aux données pKa et $\text{Log}K_{\text{Cu}}$, permet de reconstruire fidèlement les données expérimentales. L'étude à l'échelle moléculaire par modélisation moléculaire (MM) montre que la structure désordonnée de l'EPS à pH3 favorise la formation de complexes chélatants très stabilisants entre deux chaînes latérales du xanthane et Cu^{2+} . A contrario, à pH5.5 en (structure hélices ordonnées) ce sont les sites complexants simples, moins stabilisants pour le cuivre, qui prédominent. Les résultats d'EXAFS et leur modélisation MM confirment la plus forte affinité du cuivre pour le xanthane à pH3 qu'à pH5.5. Cette étude montre l'importance de la conformation des EPS dans leur capacité à fixer les ETM, et l'intérêt de l'outil MM pour la compréhension de ces phénomènes à l'échelle moléculaire.

Adsorption mechanisms of heavy metals onto bacterial exopolysaccharides : The Xanthan-Copper system as a model study.

Bacterial ExoPolySaccharides (EPS) constitute a soil reactive fraction towards Metallic Trace Elements (MTE). The xanthan-copper system is studied as a complexation model of MTE onto EPS. On a macroscopic scale, we performed acid base titrations, in order to determine the pK values of xanthan (average $pK_{I=0.1M}=2.5$) and proposed an electrostatic model with cylindrical condenser to explain the variations of pKa according to the ionic strength (IS). Titrations in the presence of copper and Cu^{2+} sorption experiments show an original result : the xanthan adsorbs more copper at pH3.5 than at pH5.5. The values of the apparent complexation constants are $\text{Log}K_{\text{Cu-XanpH3.5}}=3$ and $\text{Log}K_{\text{Cu-XanpH5.5}}=2.6$. Circular dichroism experiments suggest a pH-dependent conformational change in xanthan at fixed IS. A thermodynamic model with two states (disordered xanthan for pH<5 versus ordered for pH>5), coupled with the pKa and $\text{Log}K_{\text{Cu}}$ data, give an accurate reconstruction of experimental data. On a molecular scale, a molecular modelling study (MM) shows that the disordered structure of the EPS at pH3 leads to the formation of very stabilizing chelating complexes between two side chains of xanthan and Cu^{2+} . A contrario, at pH5.5 (helix ordered structure) simple complexation sites prevail, which are less stabilizing for copper. The EXAFS results and their modelling with MM confirm the strongest affinity of copper for xanthan at pH 3.5 than at pH5.5. This study shows the importance of the EPS conformation in their ability to fix the MTE, and the advantage of the MM tool for the comprehension of these phenomena on a molecular scale.

Sommaire

Résumé-Abstract	iii
Sommaire	vii
Remerciements	ix
Introduction	1
I Etat de l'art	9
1 La matière organique des sols et sa réactivité	11
1.1 Classification de la matière organique des sols	14
1.2 Le cas de l'environnement urbain	21
1.3 Ce qu'il faut retenir :	22
2 La réactivité de la biomasse bactérienne	23
2.1 Structure et réactivité des bactéries libres	23
2.2 Structure et réactivité du biofilm bactérien	29
2.3 Ce qu'il faut retenir :	38
3 Les sucres dans les sols	39
3.1 Généralités	39
3.2 Importance des carbohydrates du sol	40
3.3 Structure et classification	40
3.4 Etat des sucres dans les sols	44
3.5 Ce qu'il faut retenir :	47
4 Mécanismes de rétention des ETM sur la MO du sol	49
4.1 Généralités	49
4.2 Définition du point de charge nulle	49
4.3 Les trois grands mécanismes de rétention des ETM sur la MO	52
4.4 Constantes de complexations typiques MO-Métaux	53
4.5 Ce qu'il faut retenir :	60
5 Définition du système modèle d'étude Xanthane+Cu²⁺	61
5.1 le choix de l'exopolysaccharide xanthane	61
5.2 le choix du polluant métallique Cu ²⁺	62

II	Etude à l'échelle macroscopique des complexes Xanthane-Cu²⁺	65
6	Introduction	67
6.1	Structure chimique du xanthane	67
6.2	Les hélices 5-1 du xanthane : l'état ordonné	68
6.3	Transitions conformationnelles du xanthane : hélice rigide-brin flexible	69
6.4	Le xanthane en solution	74
6.5	Titrages potentiométriques du xanthane	75
7	Matériel & Méthode	83
7.1	Purification du xanthane	83
7.2	Caractérisations CPG et RMN du xanthane	83
7.3	Titrages acidobasiques	86
7.4	Titrages en présence de cuivre et isothermes d'adsorption	95
7.5	Dichroïsme circulaire	98
8	Résultats	99
8.1	Titrages acidobasiques	99
8.2	Titrages acide-base en présence de cuivre	108
8.3	Isothermes d'adsorption du Cuivre	112
8.4	Dichroïsme circulaire	114
9	Discussion	115
9.1	Modélisation de la spéciation du xanthane avec 2 états de référence	115
9.2	Nature des 2 états de référence ? - possible amélioration du modèle	118
10	Résumé : ce qu'il faut retenir	121
III	Etude à l'échelle moléculaire des complexes Xanthane-Cu²⁺	123
11	Introduction	125
11.1	Modélisation Moléculaire & systèmes environnementaux	125
11.2	Modélisation Moléculaire & xanthane	125
11.3	Objectifs de notre étude en Modélisation Moléculaire	126
12	Matériel & Méthode	129
12.1	Modélisation Moléculaire	129
12.2	Ordre local du cuivre : expérience et modélisation	158
13	Résultats	175
13.1	Résultats préliminaires en modélisation moléculaire.	175
13.2	Mécanisme d'adsorption du cuivre en modélisation moléculaire	186
13.3	Evaluation des énergies de complexation du cuivre par le xanthane en modélisation moléculaire	194
13.4	Ordre local du cuivre	197

14 Discussion : comparaison des résultats expérimentaux avec les résultats de modélisation moléculaire	203
14.1 Comparaison des expériences de titrages avec la modélisation moléculaire	203
14.2 Comparaison RDF-EXAFS expérimentales v.s. RDF-MD théoriques	206
14.3 Compréhension du système	212
IV Conclusion générale	215
15 Synthèse des principaux résultats	217
16 Conclusion et Perspectives	221
16.1 A l'échelle moléculaire...	221
16.2 A l'échelle macroscopique...	222
16.3 Ouverture à l'échelle des transferts	223
Table des matières détaillée	230
Table des figures	239
Liste des tableaux	242
Bibliographie	245

Remerciements

L'aventure de la thèse se termine, et je voudrais ici remercier tout ceux qui m'ont aidé, du point de vue scientifique, mais également personnel.

Je remercie tout d'abord ma directrice de thèse Mme Cécile DELOLME, IDTPE, enseignant-chercheur au Laboratoire des Sciences de l'Environnement de l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (LSE-ENTPE-Université de Lyon). Sans elle, je n'aurais probablement pas eu la chance de réaliser un doctorat. Merci Cécile pour ton éternel dynamisme, ta motivation, et pour la liberté que tu m'as laissée dans mon travail. Je remercie également chaleureusement mon co-directeur de thèse, M. Lorenzo SPADINI, Maître de Conférence à l'Université Joseph Fourier (Grenoble I), chercheur dans l'Equipe de Géochimie de l'Environnement au LGIT. Merci Lorenzo pour ta bonne humeur perpétuelle, les discussions scientifiques et le travail sur les modèles de spéciation chimique parfois jusqu'à très tard le soir...

Merci aux membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit, et d'avoir contribué aux échanges scientifiques sur les perspectives ouvertes par mon travail de recherche. Je remercie tout particulièrement Mme Laura SIGG, Professeur en biogéochimie et toxicologie environnementale à l'EAWAG-Aquatic Research- à Dübendorf-Zürich (Suisse), d'avoir rapporter mon travail. Ce fût un grand honneur pour moi. Merci à Mme Montserrat FILELLA, Professeur en chimie à l'Université de Genève (Suisse), d'avoir accepté de rapporter mon manuscrit. Ses remarques scientifiques ont permis de me faire progresser dans mon travail. Je remercie M. Rédouane BORSALI, directeur de recherche et directeur du Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS-Grenoble) d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Merci à M. Laurent CHARLET, professeur à l'Université Joseph Fourier (Grenoble I), chercheur dans l'Equipe de Géochimie de l'Environnement au LGIT d'avoir accepté d'examiner mon travail de recherche et d'avoir présidé le jury lors de ma soutenance de thèse. Enfin, je tiens à remercier sincèrement les deux membres invités du jury, Mme Géraldine SARRET et M. Karim MAZEAU avec qui j'ai pu partager de très bons moments de science. Merci Karim pour m'avoir formé à la modélisation moléculaire, puis encadré rigoureusement dans ce domaine de la chimie que j'ai découvert avec beaucoup d'enthousiasme. Entre mai 2008 et mai 2009, en seulement un an, nous avons réussi à produire un travail de qualité, et cela n'est pas du au hasard, car tu as su orienter mes recherches, et m'aider dans mes choix et mes justifications, en canalisant mon énergie. Merci encore. Merci Géraldine, pour m'avoir initié à la spectroscopie EXAFS, de manière théorique mais surtout pratique, lors des deux runs effectués au synchrotron en Juin 2007 et Juillet 2008. Merci d'avoir suivi mon travail, et d'avoir contribué, par tes remarques aux moments opportuns, à faire avancer mes recherches. Merci également pour les échanges, pas seulement scientifiques.

Merci à M. Yves PERRODIN, directeur du Laboratoire des Sciences de l'Environnement et M. Fabrice COTTON, directeur du Laboratoire de Géophysique Interne et Tectonophysique pour m'avoir accueilli dans d'excellentes conditions matérielles et humaines au sein de ces deux laboratoires. Je remercie également le Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer (MEEDDM) pour le financement accordé afin de réaliser cette thèse.

Côté sciences, la liste des personnes qui ont contribué, de prêt ou de loin, à l'aboutissement de ce travail est encore longue.

En Géochimie au LGIT : Merci à Delphine TISSERAND, et son sourire permanent, pour la vie quotidienne au labo de chimie, son écoute, son implication dans les aspects pratiques des techniques utilisées. Bref, merci Del pour ton aide de tous les jours. Bien sûr, merci à Yoann CURTET, pour son travail de laboratoire de grande qualité, et bonne chance Yoann pour la suite ! Merci à, Alain MANCEAU pour son encadrement lors de la rédaction de l'article scientifique avec Anthony et Thomas. Merci à Martine LANSON.

Au LTHE : Merci à Jean MARTINS, chargé de recherche, pour ses conseils en début de thèse, bien que finalement, mes travaux ne se soient pas focalisés autant que prévu initialement sur les bactéries. Merci également à Véronique GUINE, Elsa VITORGE, et Aline NAVEL.

Au CERAMV : Merci à Alain HEYRAUD, directeur de recherche, pour m'avoir encadré lors de la purification des échantillons de xanthane. Merci à Alain RIVET et Cyril ROCHAS pour leur précieuse aide au niveau informatique et réseau sur les calculateurs du CERMAV. Je remercie Mme Marguerite RINAUDO pour sa remarque scientifique (suggérant l'agrégation au lieu des formes coil). Un merci sur le fond (mais pas sur la forme !!!).

Merci également spécialement aux collègues lors des participations à des enseignements : Cédric d'HAM, Herminia BETEGA (L1 *Autour de l'eau en Sciences*), Cécile DELOLLME (pour les cours de chimie à l'ENTPE), Lorenzo SPADINI (Encore ! Pour le module de laboratoire en M1 Géologie), Dominique CROUZET-DEPROST (pour les colles en chimie PCSI au lycée Champolion).

Enfin, merci aux professeurs de l'Université du Québec à Trois-Rivières, Canada, pour m'avoir soutenu il y a quatre ans dans ma démarche de poursuite d'études au doctorat : Jacques BOISVERT, Gervais BERUBE, Marco A. RODRIGUEZ. Merci également à mon grand père du Québec, le Dr. Jacques LESPÉRANCE, pour ton écoute, nos échanges scientifiques, et surtout, merci pour tout le reste...

Merci à tous les étudiants pour la bonne humeur au LGIT, en particulier à mes deux compères de thèse Anthony MATYNIA et Thomas LENOIR pour l'ambiance garantie dans notre bureau de fins géochimistes... Finalement les trois mousquetaires auront même réussi à publier un article scientifique en co-auteurs !

Il est clair que le cadre grenoblois fût un élément très motivant pour réaliser une thèse de par sa position géographique stratégique au coeur des alpes et mes aspirations alpines... La fin du Master 2 Recherche puis la Thèse : quatre ans en mode sport-études option Montagne !!! Merci à tous mes compagnons de cordées, d'escalades ou de skirando (en week-end ou RTT-Doctorants !); merci à EVE pour le café et les bières. Pour ne pas faire de jaloux, par ordre aléatoire, merci à : Frédéric CHAPTAL, Sébastien CROUZET, Fanny NESPOULET, Mathieu CAUSSE, Hugo NESPOULET, Clément UBELMANN, Corentin GERARD, Jordi VILA VALLS, Ian GOUGH, Benoît BANVILLE, Camille JULOUX, Rémi GALLAND, Fabien HUBANS, Bastien DUPUY, Julien BOURDAT, Florent HUMBERT, Cédric TARDIEU, Sylvain ANTHEAUME, Olivier MANSIOT et la promo 2008 initiateur alpinisme GUCEM, Lama LOBZANG SONAM, Parksang NAMGYAL, Suzy VAN ANTVERPEN, Les OXYG'AÎNÉS (Julien DUGOUDRON, Coralie FINIEL, Maureen LEDUC, Marie NAVARRO), Marion HUGUET, Marion CAUSSE, la Famille CAUSSE, la Famille HUGUET...

Merci à mon amoureuse Marion HUGUET devenue Marion CAUSSE en cours d'aventure. Merci pour ton soutien quotidien, pour ton énergie si communicative, et ton amour qui me porte chaque jour. Merci à toi mon petit garçon, Gaspard Benoît Lobzang CAUSSE, de m'avoir permis de trouver la force de finir cette belle aventure que fut la thèse.



FIGURE 1 *Grand ski en descendant Comberousse, Belledonne, Avril 2006. Photo Stéphane Roudnitska .*

Introduction

Contamination des nappes phréatiques par transfert en milieu poreux

Les nappes phréatiques alluvionnaires, exploitées par l'Homme pour son alimentation en eau potable, garantissent une bonne qualité des eaux par le pouvoir naturel filtrant des sols. Le principe physique du filtre est apparemment simple : plus les eaux de surfaces s'infiltrent dans les milieux poreux, plus elles déposent les polluants qu'elles transportent sur la matrice solide immobile traversée, tout en s'enrichissant en oligoéléments par dissolution des roches mères constituant cette matrice. Il est ainsi connu que les aquifères alluvionnaires présentent un pouvoir épurant pour les eaux souterraines. Il apparaît clairement que la qualité de ces ressources en eau dépend d'un équilibre entre matière adsorbée (composés dissouts se fixant sur le solide) et matière relarguée en solution par la surface de la phase solide.

En particulier, dans les contextes urbains ou agricoles, les eaux de surfaces connaissent des concentrations élevées en polluants organiques et/ou métalliques (cf. tableau 1). Les polluants transportés dans les eaux de ruissellement et d'infiltration proviennent soit directement d'une dissolution d'un matériau solide, soit de la mise en solution des poussières en suspension lors d'un événement pluvieux, ou encore du lessivage des sols imperméables souillés. Une fois transportés, ces polluants vont être stockés dans le milieu récepteur. Dans le cas d'une pollution chronique, due à l'accumulation de polluants sur une grande échelle de temps, on observe généralement que les polluants organiques sont moins persistants que les polluants métalliques. En effet, il existe la plupart du temps une espèce microbienne endémique du sol (ou un consortium microbien) capable d'amorcer la biodégradation du polluant organique, alors que les polluants métalliques sont persistants et non biodégradables. Les deux exemples typiques de ces pollutions chroniques sont :

1. L'accumulation des polluants dans les bassins d'infiltration d'eaux pluviales urbaines. Ces bassins collectent tous les lixiviats issus des infrastructures urbaines et routières, contenant des polluants organiques -hydrocarbures aliphatiques, aromatiques et HAP provenant de la combustion d'essence et d'huile de moteur- ainsi que des polluants métalliques provenant des gaz d'échappement, d' usure des garnitures de freins/des pneus/du revêtement routier, des sels de déneigement, de la corrosion des véhicules/des barrières de sécurité/toitures et tuyauteries (Legret, 2005; Thorpe and Harrison, 2008).
2. L'accumulation des polluants dans les couches superficielles des sols agricoles (polluants organiques -pesticides ou désherbants- et polluants métalliques comme la "bouillie bordelaise", fongicide viticole à base de cuivre).

Ces situations deviennent particulièrement préoccupantes lorsque la nappe phréatique exploitée pour l'eau potable se situe à proximité des zones potentielles de diffusion des polluants par les eaux souterraines, ce qui est souvent le cas en milieu urbain (cf. figure 3). Le tableau 1 propose une rapide synthèse des concentrations en polluants métalliques et organiques contenus dans les eaux de ruissellement et les sols de sédiments récepteurs, en zones urbaines (adapté de [Badin \(2009\)](#)). Les polluants métalliques les plus représentés sont (par ordre d'importance) : $Zn > Pb \approx Cu > Cd$. Comment prédire le transfert de ces polluants ? Quelles caractéristiques du sol, des polluants, et de leurs interactions, doivent être déterminées afin de pouvoir contraindre les modèles physico-chimiques utilisés ?

TABLE 1 Synthèse des concentrations en métaux lourds et HAP dans les poussières et les eaux de ruissellement en milieu urbain & dans les sols de bassins d'infiltration.

		Poussières ou débris de sédiments de rues [$\mu\text{g/g}$]	[Moyenne] [$\mu\text{g/g}$]	Eaux de ruissellement [$\mu\text{g/L}$]	[Moyenne] [$\mu\text{g/L}$]	Sols de bassins d'infiltration [$\text{mg/g}_{\text{sédiment sec}}$]	[Moyenne] [mg/g]
Polluants métalliques	Zn	241-1325 ^a ; 51-4670 ^b ; 67-495 ^c ; 75-500 ^d	928	120-2000 ^e ; 7.8-201.0 ^f ; 602-2040 ^g ; 356 ^h	761	1154 ^l ; 2090 ^m ; 1500 ⁿ	1581
	Pb	119-577 ^a ; 9.675 ^b ; 55-161 ^c ; 10-180 ^d	159	11-525 ^e ; 5.0-38.1 ^f ; 34-396 ^g ; 58 ^h	152	206 ^l ; 101-147 ^o ; 250 ⁿ	193
	Cu	50-464 ^a ; 16-6000 ^b ; 11-226 ^c ; 20-450 ^d	905	97-104 ^e ; 3.0-65.0 ^f ; 62-267 ^g ; 45 ^h	92	66 ^l ; 182 ^m ; 340 ⁿ	196
	Cd	0.02-11 ^b	5.5	0.3-13.0 ^e ; 0.30-3.01 ^g 1 ^h	3.5	1.44 ^l ; 4.8 ^m ; 3 ⁿ	3.1
Polluants organiques	Teneurs en HAP identifiés	$\Sigma 16\text{HAP} = 1.20\text{-}11\text{-}6^{\text{a}}$ $\Sigma 16\text{HAP} = <0.2\text{-}80^{\text{b}}$		-		$\Sigma 9\text{HAP} = 8.320 \pm 0.660^{\text{i}}$ $\Sigma 11\text{HAP} = 12.300 \pm .2650^{\text{j}}$ $\Sigma 14\text{HAP} = 141.966^{\text{k}}$	

(a) [Brown and Peake \(2006\)](#) (Dunedin, Nouvelle Zélande), (b) [Jartun et al. \(2008\)](#) (Bergen, Norvège), (c) [Kim et al. \(1998\)](#) (Taejon, Corée), (d) [Manno et al. \(2006\)](#) (Gela, Italie), (e) [Göbel et al. \(2007\)](#) (Revue), (f) [Tuccillo \(2006\)](#) (New Jersey, USA), (g) [Kafi et al. \(2008\)](#) (Paris, France), (h) [Legret and Pagotto \(1999\)](#) (autoroute rurale, France), (i) [Mermillod-Blondin et al. \(2008\)](#) (Chassieu, France), (j) [Nogaro et al. \(2007\)](#) (Villeurbanne, France), (k) [Durand \(2003\)](#) (Wissous, France), (l) [Pétavy \(2007\)](#) (Wissous, France), (m) [Larmet \(2007\)](#) (Chassieu, France), (n) [Murakami et al. \(2008\)](#) (Tokyo, Japon), (o) [Ganaye et al. \(2007\)](#) (Chassieu, France).

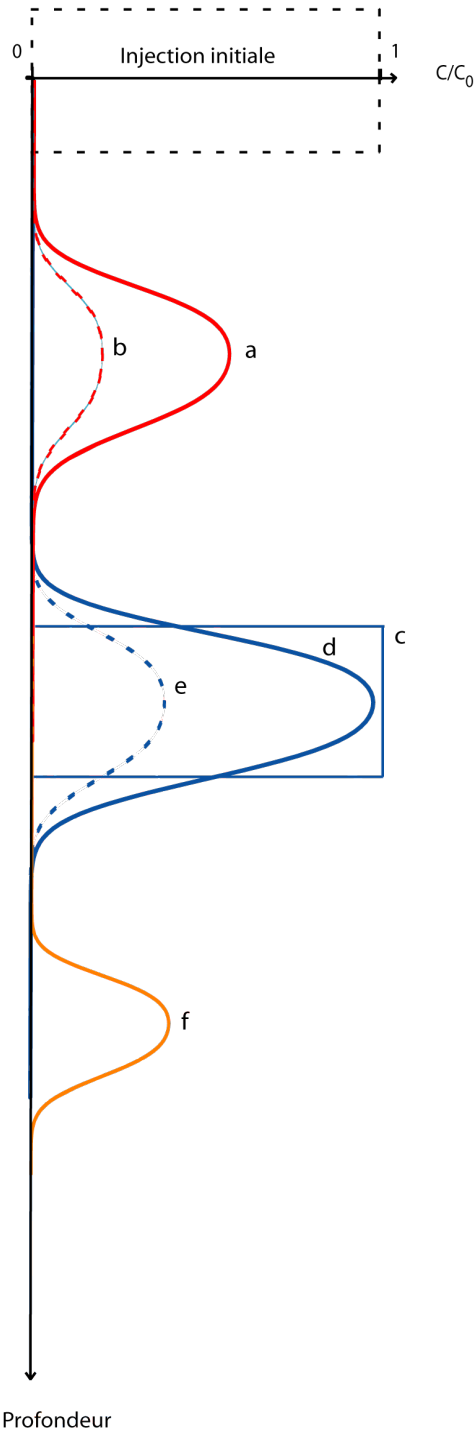
Transfert et réactions chimiques

Ainsi, pour améliorer les méthodes de gestion des bassins de rétention en milieux urbains ou de gestion des sols agricoles contaminés aux métaux lourds, il est nécessaire de mieux prédire/modéliser les flux de polluants dans ces systèmes. Les équations du transport de soluté en milieu poreux peuvent se réduire à l'étude de l'Equation de Convection Dispersion étendue (ECD), donnée dans la figure 2. L'amélioration des prédictions implique une meilleure connaissance des mécanismes régissant le transfert de polluants en milieu poreux. Dans ce contexte environnemental, l'étude des transferts en milieux poreux connaît deux axes principaux, traduisant le couplage physico-chimique mis en jeu :

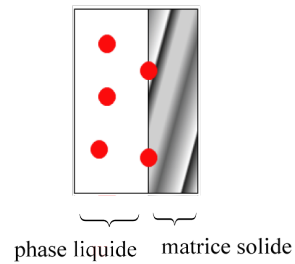
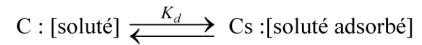
1. L'étude des écoulements à travers une matrice poreuse.
2. L'étude des interactions chimiques entre les composés dissouts dans l'eau et la surface de la matrice poreuse.

$$R \frac{\partial C}{\partial t} = \underbrace{D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}}_{\text{Dispersion (1)}} - \underbrace{v \frac{\partial C}{\partial x}}_{\text{Advection (2)}} - \underbrace{\beta C}_{\text{Dégradation (3)}} \quad \text{avec}$$

$$\underbrace{R = 1 + \frac{\rho_s}{\theta} K_d}_{\text{Adsorption -réactions chimiques- (4)}} \quad \text{et} \quad K_d = \frac{C_s}{C}$$



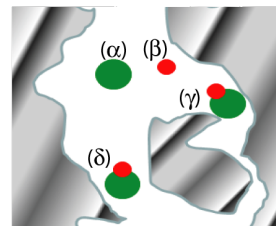
$R > 1$
 a : (1) + (2) + (4)
 b : (1) + (2) + (3) + (4)



$R = 1$
 c : (2)
 d : (1) + (2)
 e : (1) + (2) + (3)

$R < 1$
 f : Transport accéléré : ex. transport colloïdal

α : colloïde libre
 β : polluant dissout
 γ : polluant fixé sur un colloïde immobile
 δ : polluant fixé sur un colloïde mobile



Le cas (δ) va favoriser un transport accéléré du polluant via les colloïdes circulants dans les macropores du milieu poreux. Ce transport colloïdal dépend de nouveaux paramètres :
 - la source des colloïdes dans le milieu
 - la constante d'affinité K entre les colloïdes et les polluants.



FIGURE 2 Formalisme de l'Equation de Convection Dispersion (ECD) et représentations graphiques modèles associées. Evolution de profils de concentrations observés à un temps donné en fonction des conditions hydrodynamiques (advection(2), dispersion(1)), des processus réactionnels (adsorption -réaction chimique dans le cas d'un K_d linéaire- (4), transformation biologique ou radiologique (3)), et du transport colloïdal (f). Cas d'une injection de type créneau, concentration initiale en soluté C_0 . D'après Sigg et al. (2000) et Muris (2004).

L'étude du premier axe a pour objectif de mieux caractériser les paramètres régissant l'écoulement dans la matrice poreuse. Il convient donc de déterminer la porosité du milieu poreux $n = \frac{V_{vides}}{V_{total}}$ (ou la porosité de chacune des phases et leur description spatiale si le milieu est hétérogène), la teneur en eau volumique $0 < \theta < n$ (et le cas échéant, la saturation en gaz), la conductivité hydraulique K du milieu afin d'estimer la résistance opposée par la matrice solide à la circulation d'un fluide (selon la loi de Darcy $q = -K \frac{\partial h}{\partial x}$, avec q vitesse de Darcy [$m \cdot s^{-1}$] et h la charge hydraulique [m]) et la dispersivité D [$m^2 \cdot s^{-1}$] (pour déterminer la propagation dans le réservoir). Notons que récemment, les outils géoradars ont permis des caractérisations fines des matrices poreuses réelles, et une quantification des écoulements préférentiels à l'échelle du terrain (Goutaland et al., 2008). Ces écoulements préférentiels peuvent s'avérer, sous certaines conditions, être les principaux vecteurs de transport de polluants.

Le deuxième axe a pour but de caractériser les interactions chimiques soluté \rightleftharpoons surface du milieu poreux (K_d) et soluté adsorbé sur un colloïde \rightleftharpoons soluté dissout (K). La figure 2 met en évidence l'importance de la connaissance de ces constantes de complexation K_d et K pour la prédiction du transfert. C'est par des études expérimentales en réacteurs fermés, que l'on cherche à établir les constantes cinétiques et d'équilibre thermodynamique entre les polluants dissous et les constituants réactifs de la phase solide ou colloïdale, afin d'évaluer les concentrations de polluants mobiles en solution. Cette approche nécessite d'une part la connaissance des polluants dissous (cf. tableau 1), et d'autre part celle de la composition des surfaces réactives et colloïdales du sol. La matière réactive des sols est constituée d'une phase minérale (argiles, oxydes métalliques, carbonates, silicates) et d'une phase organique (matières humiques, biomasse bactérienne). De récentes études (Guine et al., 2006; Muris, 2004) ont montré le rôle important de la biomasse bactérienne dans la spéciation des polluants métalliques dans les sols. Les sols de surface, riches en eau, nutriments et dioxygène forment une niche écologique pour les microorganismes dégradant la litière. La présence d'interfaces eau/air/solide dans le milieu poreux va favoriser le développement des colonies sous forme de biofilms (Filloux and Vallet, 2003). Ces biofilms sont constitués des bactéries encapsulées dans une matrice extracellulaire de biopolymères. Ils sont des sources de colloïdes, libérés sous forme de fragments de polymères extracellulaire, ou de bactéries elles-mêmes, en fonction des conditions du milieu (humidification, séchage, apport de nutriments, variation de la FI). En particulier, les exopolysaccharides (EPS) bactériens sont connus pour avoir un rôle critique dans la formation et l'organisation des biofilms (Sutherland, 2001; Matsukawa and Greenberg, 2004). Ces EPS jouent donc un rôle potentiel dans la rétention des métaux dans les sols, et leur réactivité vis-à-vis des polluants métalliques a été peu explorée. Il convient donc d'approfondir leur étude. Le présent travail de thèse s'est attaché à apporter une contribution scientifique originale dans le cadre du deuxième axe d'étude. En particulier, le rôle des polysaccharides bactériens dans la complexation des métaux lourds a été étudié.

La figure 3 met en évidence les différentes approches nécessaires à la compréhension des systèmes complexes réels. Cette complexité est réduite plus on se focalise sur des systèmes modèles de petite taille. Chaque changement d'échelle (doubles flèches noires sur la figure 3) permet une approche plus fine sur le sous-système abordé. Le couplage des différents résultats obtenus aux échelles macroscopiques fournit les paramètres nécessaires aux modèles de transfert sur les systèmes plus complexes, à l'échelle du terrain. L'échelle d'étude la plus fine, atteinte en spectroscopie EXAFS et modélisation moléculaire, permet quant à elle une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la fixation des cations métalliques sur les surfaces réactives.

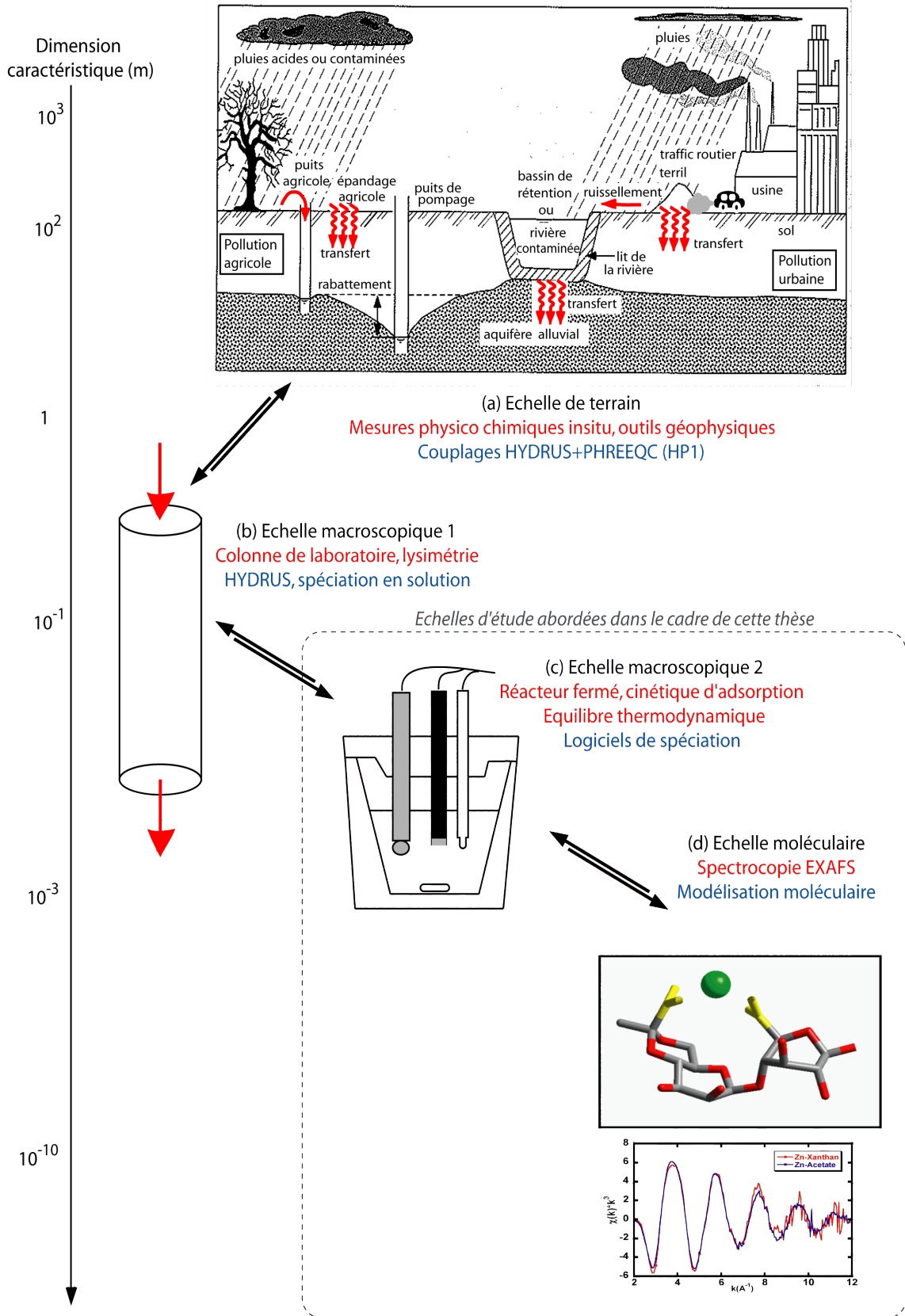


FIGURE 3 Les différentes échelles de travail -en noir-, des exemples d'outils d'étude expérimentale -en rouge- et de modélisation -en bleu-. Cadre (a) adapté de Behra (1987)

Plan de la thèse

Le présent manuscrit s'attachera donc à décrire, dans un premier temps, les constituants chimiques réactifs d'un sol. Cet état de l'art nous permettra de montrer la spécificité et la grande réactivité que présentent les biofilms. Nous justifierons alors la nécessité d'une étude modèle des interactions entre un polysaccharide bactérien, le xanthane, et un polluant métallique de référence, le cuivre.

La seconde partie du manuscrit détaillera les résultats expérimentaux obtenus par études potentiométriques sur le système modèle choisi : xanthane + cuivre. Ces résultats inédits, mettent en évidence un mécanisme de rétention du cuivre dépendant de la conformation du polysaccharide. La nature de la transition conformationnelle donnant des propriétés de complexation du cuivre différentes reste alors à élucider.

Les méthodes de titrages potentiométriques n'étant pas univoques, nous proposerons une explication au phénomène observé expérimentalement par une étude couplée modélisation moléculaire/spectroscopie EXAFS afin de mieux comprendre les mécanismes régissant l'adsorption du Cu^{2+} sur le xanthane.

Nous tâcherons finalement de restituer la contribution spécifique de cette étude dans le cadre plus global du transfert en milieu poreux, en proposant les perspectives scientifiques émergentes à cette étude, et intéressantes à aborder à l'avenir.

Première partie

Etat de l'art

Chapitre 1

La matière organique des sols et sa réactivité

Après avoir défini la notion de réactivité, ce premier chapitre présentera les différents constituants de la matière organique (MO) des sols. L'étude des transformations entre les différentes fractions organiques mettra en évidence le rôle prépondérant des microorganismes dans la genèse des substances réactives du sol. La dynamique de la MO réactive étant liée à l'activité microbienne, le chapitre conclura sur la nécessité de mieux décrire le compartiment microbien pour mieux évaluer la réactivité des sols.

Préambule : notion de réactivité

La définition de la réactivité d'une substance connaît différents sens en chimie. Pour la chimie organique, on définit la réactivité comme la capacité d'une molécule à réagir sur une autre molécule en réalisant une réaction chimique, c'est à dire en créant ou en brisant des paires électroniques permettant le réarrangement des atomes en une (ou plusieurs) entité(s) moléculaire(s) dénommée(s) produit(s) de la réaction. On pourra par exemple comparer la réactivité de différents nucléophiles sur une cétone dans une réaction d'addition nucléophile (cf. figure 1.1) : la réactivité va augmenter plus le nucléophile sera riche en électrons, et plus le carbone de la cétone sera rendu électrophile (par le solvant ou des substituants électroattracteurs), (Warren, 1982; Vollhardt, 2004).

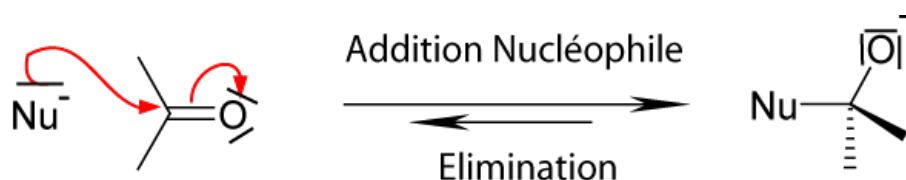
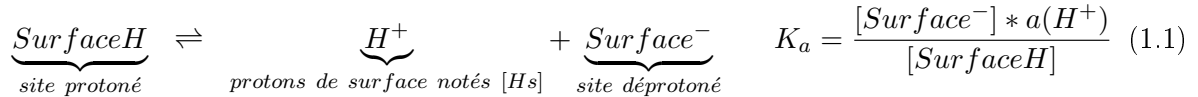


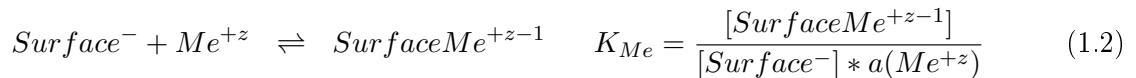
FIGURE 1.1 Exemple simple de réactivité en chimie organique : l'addition nucléophile sur une cétone.

La notion de réactivité chimique que nous utiliserons tout au long de cette thèse est différente de la définition d'usage en chimie organique. En effet, la chimie des solutions aqueuse donne un autre sens au mot réactivité. L'eau étant par excellence le vecteur des ions hydronium et hydroxyde

(qu'elle crée lors de son autoprotolyse : $2 H_2O \rightleftharpoons \underbrace{H_3O^+}_{\text{noté } H^+} + HO^-$), la notion de réactivité dans l'eau se confond avec celle de l'échange de protons, c'est à dire la réaction acide/base au sens de Bronsted. Pour mémoire, les espèces acides sont capables de relarguer un proton en solution, alors que les espèces basiques peuvent en capturer. Cette notion d'acidobasicité initialement introduite pour les molécules dissoutes peut être étendue aux surfaces réactives de l'environnement dans les sols : surfaces d'oxydes minéraux, argiles, macromolécules organiques, microorganismes... Le formalisme est classique :



On définit $[H_S]$ la concentration en protons de surface comme étant la quantité d'ions hydroxonium relargués de la surface réactive vers la solution extérieure. La déprotonation des groupements fonctionnels de surface en fonction du pH engendre une capacité potentielle (fonction de la nature intrinsèque de la surface réactive) de complexation des cations métalliques (notés Me^{+z}) :



Pour une description plus détaillée de la concentration en protons de surface $[H_S]$ ainsi que pour l'expression théorique et expérimentale de $[H_S]$ en fonction des constantes thermodynamiques du système étudié, on se reportera à la section du manuscrit suivante : 6.5.1 "Rappels théoriques sur les titrages acidobasiques".

Retenons simplement que dans tout le document, un composé sera dit réactif si il possède la propriété d'échanger des protons en solution en fonction du pH, et corollairement la capacité potentielle de complexer des cations métalliques. Nous allons à présent détailler les différents constituants de la fraction organique d'un sol. En nous appuyant sur des modèles structuraux de MO, nous proposerons une revue des sites fonctionnels réactifs qu'ils présentent à leur surface.

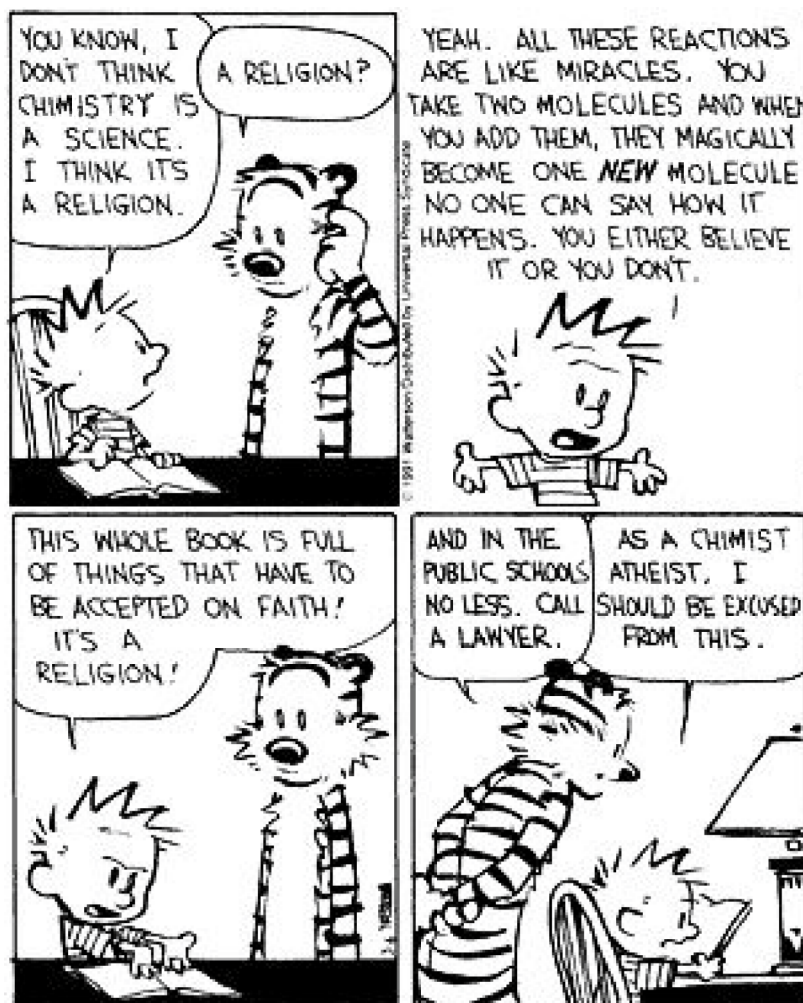


FIGURE 1.2 Les mystères de la chimie : librement adapté de Calvin & Hobbes, (c) Bill Watterson.

1.1 Classification de la matière organique des sols

Fort de ces considérations sur la définition de la réactivité, nous proposons de passer en revue les différents constituants réactifs du sol. Nous attacherons donc de l'importance à présenter différents modèles structuraux des constituants de la MO, en notant les sites réactifs qu'ils présentent.

Les sols sont constitués d'une phase minérale et d'une phase organique. La matière organique (MO) provient des organismes vivants (biomasse) contenus dans les sols et de la décomposition de la matière organique morte (nécromasse), notamment d'origine végétale. En milieu agricole ou urbain, il faut y ajouter les sources anthropiques de MO (engrais, hydrocarbures, xénobiotiques...). La MO constitue un réservoir biogéochimique en carbone (C). Ce C peut être remis en circulation dans l'atmosphère sous forme de dioxyde de carbone (CO_2) ou associé à d'autres éléments (oxygène (O), hydrogène (H), phosphore (P), azote (N), soufre (S)) pour former des substrats nécessaires aux végétaux supérieurs. Au cours du processus, une partie du C est assimilée dans les tissus microbiens (i.e. à la biomasse microbienne du sol), l'autre est converti en humus stable. Une portion de l'humus stable connaît une minéralisation (décomposition en ions, CO_2 et H_2O), et par conséquent le bilan de masse en carbone organique total (COT) est maintenu à un état stationnaire, caractéristique du sol étudié et de son système de gestion (Stevenson, 1994). En fonction du type de sol, le rapport entre les fractions organiques et minérales peut varier (cf. tableau 1.1). Même si la fraction organique n'est pas majoritaire, elle constitue un pool hautement réactif. Les minéraux connaissent également quelques familles réactives (calcaires, argiles et oxydes métalliques), mais ne seront pas décrits ici.

TABLE 1.1 Teneur massique en matière organique (MO) pour différents types de sols (secs), sur une profondeur de 15 cm. D'après Stevenson (1994), Badin (2009) et Matynia et al. (2009)

Type de sol	% MO
Mollisol (prairie d'herbe)	5-6
Sol sableux	< 1
Aquepts (sol mal drainé)	10
Oxisols (sol tropical)	< 2
Bassin de rétention (zone urbaine)	4-26*
Tourbière	> 65

*sources naturelles et anthropiques (hydrocarbures)

On classe généralement la matière organique des sols en cinq familles ou pools, qui diffèrent par leur susceptibilité à être décomposé par les microbes du sol. Chaque pool possède un temps de décomposition propre, ou turnover caractéristique : τ [en années]. Le turnover peut être interprété comme le temps moyen nécessaire à un atome de carbone pour changer de réservoir de stockage, i.e. passer d'un pool à un autre. Stevenson (1994) différencie ainsi :

1. La litière ($\tau \approx 1$ an)
2. La fraction légère ($\tau \approx 1$ an)
3. La biomasse microbienne ($\tau \approx 25$ ans -en zone tempérée-)
4. L'humus (ou matière organique stable) ($\tau \approx 100$ à 1500 ans)
5. Les matières organiques dissoutes (ou DOM pour dissolved organic matter)

Notons que les végétaux supérieurs (arbres, plantes) ne sont pas inclus dans la MO du sol.

D'un point de vue agronomique, la MO est souvent divisée en deux pools : active (ou labile) et stable¹. Par la suite, nous utiliserons peu cette distinction active/passive, qui a un intérêt marqué dans un cadre agronomique, mais limité hors de ce cadre. .

1. Le premier groupe (labile) contient la litière, la fraction légère (détaillées ci-après), la biomasse et les substances non-humiques non liées à des constituants minéraux. La phase labile contient ainsi des molécules utilisables directement

1.1.1 La litière

La litière est définie comme la matière macroorganique déposée sur le sol (e.g. feuilles mortes, brindilles, végétaux ou animaux morts...). Elle est particulièrement importante dans le cycle des nutriments (N, P, S, et des éléments traces métalliques -ETM-) dans les sols forestiers, les prairies naturelles ainsi que dans les sols issus de l'assainissement urbain colonisés par les plantes (bassins de rétention végétalisés) [Stevenson \(1994\)](#); [Saulais et al. \(2008\)](#). Sur les sols cultivés, les quantités de litières sont très faibles. Les résidus organiques sont généralement enfouis par les travaux de préparation des sols et la litière se trouve incorporée dans la fraction légère. Avec des pratiques de labour moins intensives -ou sans intervention humaine-, de plus grandes quantités de débris végétaux peuvent rester à même le sol plus longtemps pour finalement être incorporées à la surface du sol par décomposition partielle ou via l'activité de la macrofaune. La quantité de litière s'évalue généralement en collectant la matière macroorganique sur une surface d'échantillonnage représentative de l'écosystème étudié. Le dépôt de litière s'exprime le plus souvent en $[g.m^{-2}.an^{-1}]$.

1.1.2 La fraction légère

La fraction légère est principalement formée de résidus de plantes à différents stades de décomposition, mixés dans le sol proprement dit (et non déposés à sa surface). Cette décomposition peut être attribuée en partie à la macrofaune (excréments, digestion par les vers). La fraction légère a été utilisée comme un indicateur des changements dans la matière organique labile, étant affectée par les labours, la rotation des cultures, et les facteurs environnementaux affectant l'activité microbienne ([Janzen et al., 1992](#)). Il est très important de souligner que la fraction légère a un turnover rapide (turnover de l'ordre de l'année, contre plusieurs siècles pour l'humus stable! -[Stevenson \(1994\)](#)) comparé au reste de la MO du sol. Cela est dû au fait que la fraction légère est rapidement utilisée par les plantes pour leur développement, car elle est facilement assimilable. [Janzen et al. \(1992\)](#) ont montré que le pourcentage de la fraction légère pouvait varier de 2 à 17.5% sur des sols agricoles. Comme on peut s'y attendre, la quantité de fraction légère va fluctuer au cours des saisons, est sera plus importante après l'incorporation de résidus de cultures dans les sillons de labour. Les facteurs influençant la fraction légère incluent la quantité de litière produite et son taux de décomposition, lui même affecté par les variables physico-chimiques du sol (pH, température, texture et humidité).

Chimiquement, l'analyse en ^{13}C -RMN de la fraction légère est très proche de celle de la litière ([Skjemstad et al., 1986](#)) ce qui montre que les processus avancés de décomposition et transformation n'ont pas encore eu lieu. Ces processus de décomposition vont être permis grâce à l'activité de la biomasse microbienne du sol, comme nous le verrons à la section suivante.

La description des fractions organiques de subsurface, litière et fraction légère, est nécessaire à la compréhension du fonctionnement de la biomasse microbienne et à la genèse des substances humiques. Pourtant, ces deux phases, litière et fraction légère, ne constituent pas un pool réactif majeur dans les sols. En effet, la litière n'est pas considérée comme un possible réservoir de stockage des ETM dans le sol à proprement parler, du fait de sa localisation en surface, et de la possibilité de son déplacement (transport éolien ou anthropique); quant à la fraction légère, c'est son temps de résidence très court dans le sol qui conditionne sa non-disponibilité pour une éventuelle rétention de métaux. La fraction légère sera rapidement dégradée par la microfaune du sol, utilisée comme substrat lors de la biosynthèse (cf. section 1.2.3) ou réarrangée en substances humiques -SH- (cf. section 1.2.4).

comme source de nutriments (N, P, et S) pour les plantes. La fraction stable (i.e. humus passif) quant à elle est un réservoir "indirect" de nutriments pour les plantes, non utilisable sans une décomposition préalable en molécules assimilables.

1.1.3 La biomasse microbienne

Une grande diversité de microorganismes colonise les sols. Les microbes du sol sont représentés par les bactéries (les actinomycètes étant les plus nombreuses : typiquement $1\text{-}9 \times 10^8$ bact./g), les champignons ($10\text{-}20 \times 10^6$ champ./g), les algues (moins nombreuses et plus sensibles au taux d'humidification, de 10000 à 3×10^6 algue/g), et les protozoaires (jusqu'à 10^6 protoz./g) (Islam and Wright, 2006; Stevenson, 1994). Islam and Wright (2006) estiment que le total de la biomasse d'un mollisol fertile est de 180 à 2500 g/m². En terme de diversité, 1 g de sol contient plusieurs milliers de différents génomes bactériens autour de 4000 (Torsvik et al., 1990). L'activité microbienne est particulièrement forte au sein de la rhizosphère (interface racines des plantes/sols), car les microorganismes peuvent bénéficier des excréments racinaires comme substrats (sève sucrée) et en contre partie produisent des nutriments pour les plantes. La majorité des microorganismes du sol sont capables de se développer en conditions anaérobies, mais se développent préférentiellement en aérobie dans les 5 à 15 premiers cm du sol. Enfin, l'activité microbienne est complétée par celle de la macrofaune du sol (vers) : nématodes (jusqu'à 50/g) et lombrics (de l'ordre de 200 vers/m²).

La biomasse microbienne joue un double rôle dans le sol :

- (i) Elle agit comme un agent de décomposition des résidus de plantes, et parallèlement, relargue des nutriments
- (ii) Elle constitue elle-même un pool labile de nutriments.

L'apport de C de la biomasse microbienne représente, pour la plupart des sols, de 1 à 3% du carbone organique total (COT) (Stevenson, 1994) ce qui équivaut pour Islam and Wright (2006) à 40 à 500 g de biomasse/m² de sol. Bien que cette valeur puisse paraître faible, il faut garder à l'esprit que la microfaune joue le rôle d'une véritable usine biologique, et que sans son activité de décomposition, les autres phases organiques du sol ne pourraient pas évoluer. Ainsi, une fois la nécromasse incorporée dans le sol, elle va être consommée par différents organismes décomposeurs du sol (bactéries, champignons, arthropodes) qui permettent sa fragmentation, sa digestion et son incorporation dans la MO du sol. Cette décomposition se fait selon trois processus :

1. La minéralisation, qui aboutit à la décomposition de la MO morte en ions, CO₂ et H₂O.
2. La biosynthèse, conduisant à la production des macromolécules du biofilm.
3. L'humification, permettant la synthèse des substances humiques (SH).

La figure 1.3 détaille le bilan de matière de C sur la biomasse microbienne. Le flux entrant de C organique (cf. flèches verte figure 1.3) provient de la fraction légère (dégradation de la litière en petites molécules, via l'activité enzymatique du milieu). Les flux sortants de C organique sont générés par la respiration/minéralisation, et la production d'humus stable par la biosynthèse et l'humification (cf. flèches rouges figure 1.3). La respiration/minéralisation produit des ions (réutilisés comme nutriments par les plantes), du CO₂, de l'eau et de l'énergie (e.g. ATP). Cette énergie va être utilisée lors de la biosynthèse de molécules organiques. Parallèlement à la biosynthèse, l'activité microbienne permet la synthèse des substances humiques. Enfin, une partie de C organique libéré par la lyse cellulaire va être réassimilé par les microbes (cf. flèches noires figure 1.3).

Le terme humus stable désigne l'ensemble des molécules synthétisées par les microbes ayant un lent turnover, c'est à dire les substances humiques (SH) et certains produits persistants de la biosynthèse (en particulier certains EPS, en moindre mesure certaines protéines). Les acides nucléiques et les lipides issus de la lyse cellulaire sont connus pour être rapidement réassimilés par les microbes comme source de C organique. Humus = SH + EPS (et autres biomolécules stables).

Nous détaillerons au chapitre 2 les molécules organiques issus de la biosynthèse et formant le biofilm.

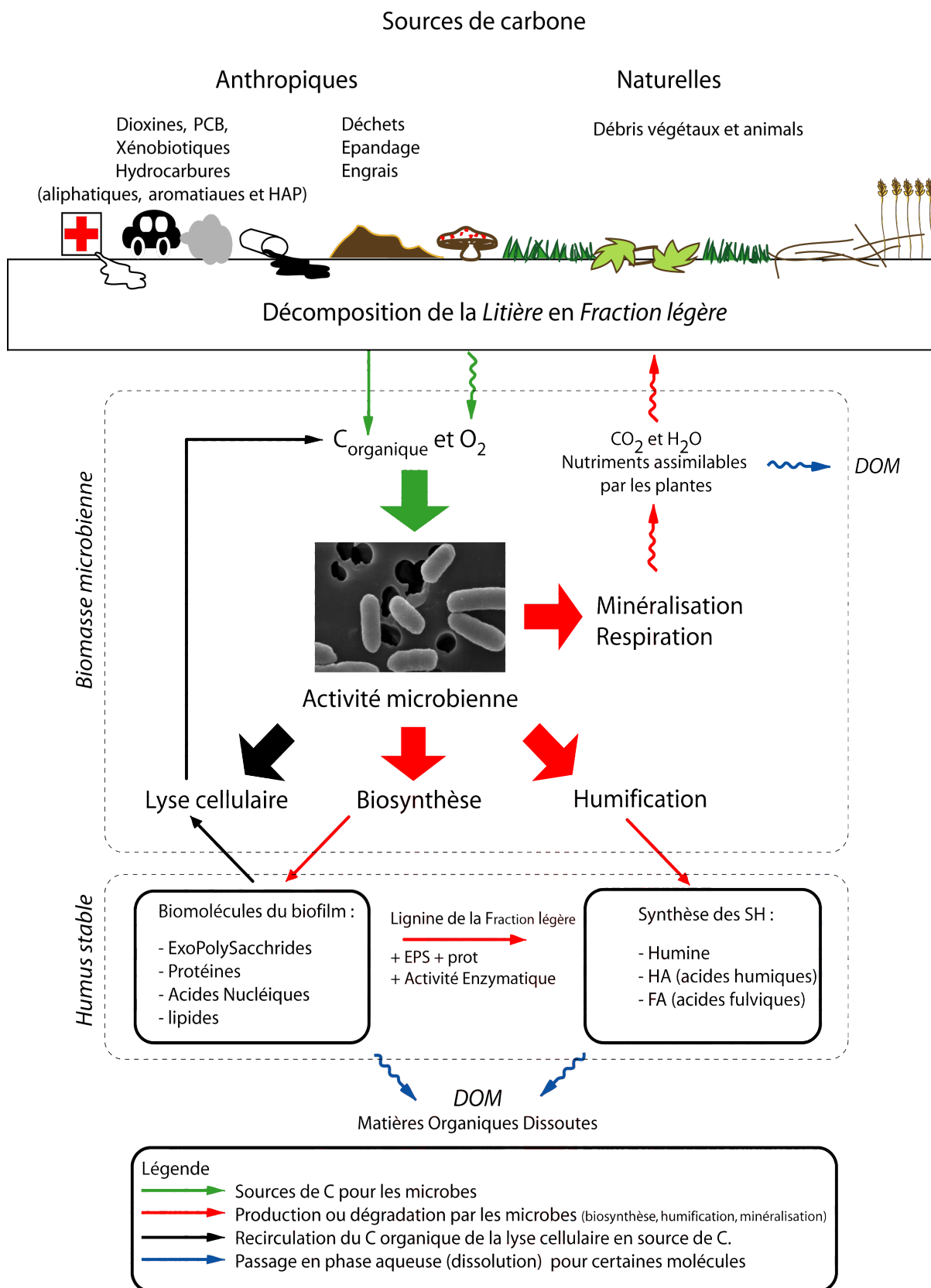


FIGURE 1.3 L'activité microbienne, au cœur de la production de la matière organique réactive des sols. La litière et la fraction légère apporte le C organique nécessaire aux microbes pour la minéralisation d'une part, et la biosynthèse et l'humification d'autre part, constituant l'humus. Les différents pools de la MO du sol sont représentés en italique

1.1.4 Les substances humiques

L'humus stable (ou substances humiques -SH-) est composé de macromolécules organiques principalement constitués de C, H, O et accessoirement de N, P et S. Opérationnellement, sur la base de leur solubilité en fonction du pH, on définit trois classes de SH dont les méthodes d'extraction des sols a été normalisée par l'International Humic Substance Society [Swift \(1996\)](#) :

1. Les acides fulviques (FA), solubles quelque soit le pH, de couleur jaune et d'un poids moléculaire (PM) de 500 à 5000 Da.
2. Les acides humiques (HA), solubles pour un pH > 2, de couleur proche du noir et d'un PM \approx 10 000 à 100 000 Da.
3. L'humine, insoluble quelque soit le pH, de couleur brun foncé d'un PM \approx 100 000 à 10^6 Da.

Une fois synthétisés, les SH vont se stocker dans les horizons supérieurs du sol, et s'accumuler par sédimentation. Associés aux molécules persistances issues de la biosynthèse (principalement EPS), ils vont constituer l'humus stable (les molécules biosynthétisées non persistantes issues de la lyse cellulaire étant recyclées par les microbes ne sont donc pas constitutives de l'humus). Ce sont les substances humiques qui confèrent à la terre sa couleur brune typique. Cette pigmentation est notamment due à la richesse de groupements aromatiques dans les structures moléculaires des SH.

Chimiquement, les SH sont des macromolécules polyfonctionnelles contenant 10 à 50% de composés phénoliques ou benzoïque, et de 30 à 50% de chaînes peptidiques et de polysaccharides. Cela s'explique par leur mécanisme de formation : ce sont les produits de condensation des débris de lignine (riches en phénols et acides benzoïques) et des résidus de biomolécules comme les protéines ou les sucres. Par conséquent, les SH présentent de nombreux groupements fonctionnels oxygénés : acides carboxyliques ($\equiv\text{COOH}$) (où le symbole \equiv représente l'attachement à la macromolécule - ou surface réactive-) et hydroxydes ($\equiv\text{OH}$) ; et dans une moindre mesure, des groupements amines ($\equiv\text{NH}_2$), thiols ($\equiv\text{SH}$) et acides sulfoniques ($\equiv\text{SO}_3\text{H}$).

Les figures 1.4 et 1.5 présentent des exemples de modèles structuraux de SH. On observe bien la richesse en noyaux aromatiques phénoliques et benzoïque de ces structures, liés entre eux par des chaînes aliphatiques. Les principaux groupes fonctionnels réactifs sont les acides carboxyliques ($\equiv\text{COOH}$) et les alcools phénoliques ($\equiv\phi\text{OH}$). Malgré la grande diversité des structures existante entre les SH (cf. figures 1.4 et 1.5), les SH présentent des propriétés acidobasiques caractéristiques assez similaires. En effet, les SH sont capables d'échanger des protons en solution, grâce à leur sites $\equiv\text{COOH}$ et $\equiv\phi\text{OH}$. Ainsi, les courbes de titrages acide-base des substances humiques présentent typiquement deux points d'équivalence : le premier correspondant au titrage des groupements carboxyliques ayant un $\text{pK}_a \approx 4$, le second correspondant au titrage des groupements phénoliques ayant un $\text{pK}_a \approx 9$ (cf. figure 1.6).

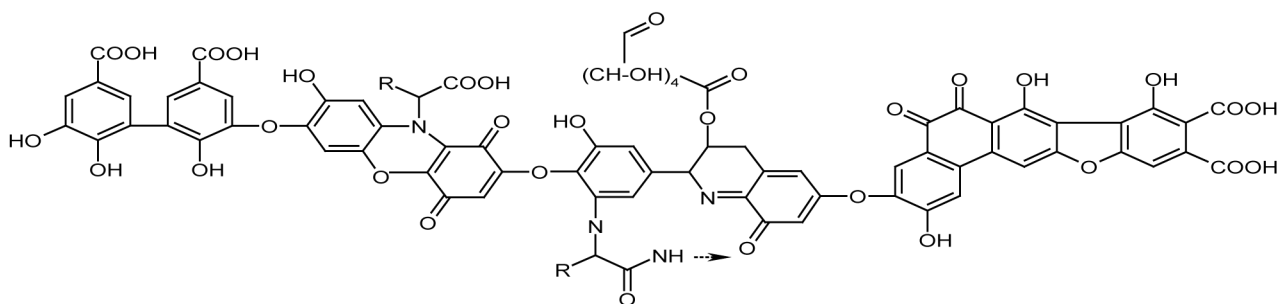


FIGURE 1.4 Modèle structural d'acide humique d'après [Stevenson \(1994\)](#)

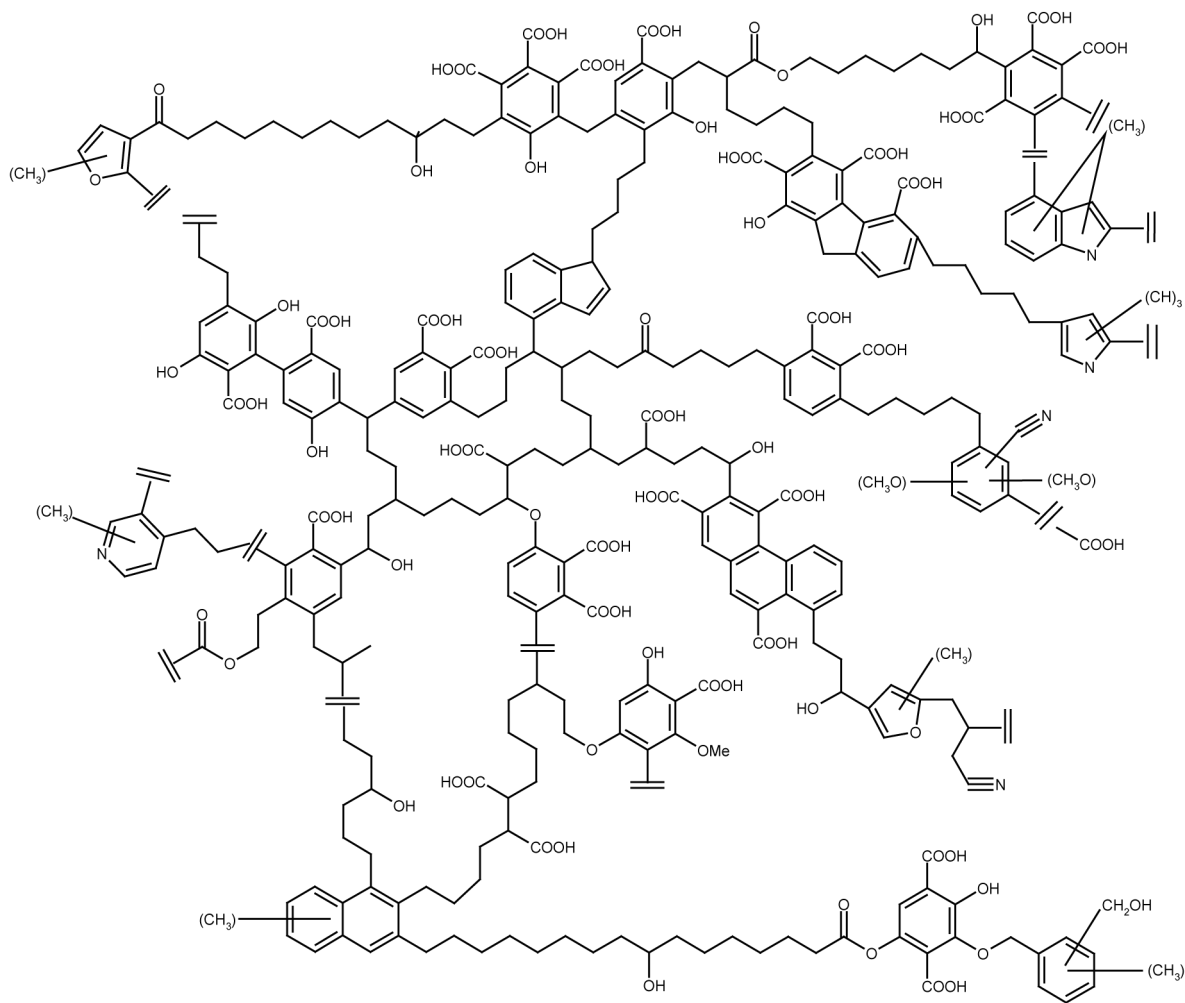


FIGURE 1.5 Modèle structural d'acide humique d'après *Schulten and Schnitzer (1993)*

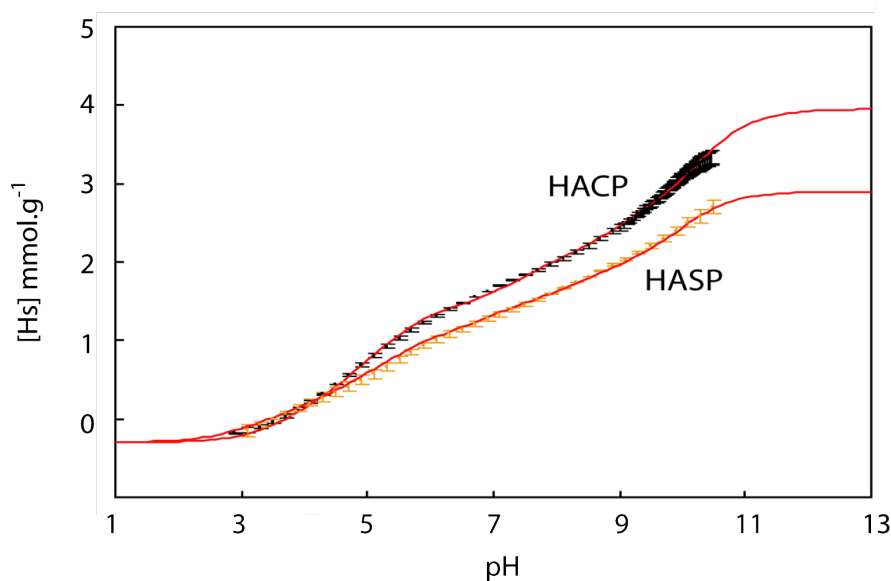


FIGURE 1.6 Courbes de titrage des acides humiques (HA) extraits des tourbes *Carex peat (CP)* *Sphagnum Peat (SP)*. Les symboles et les lignes pleines réfèrent respectivement aux données expérimentales et à la modélisation par modèle non-électrostatique. On observe bien les deux sauts de pH lors du titrage, correspondant aux dosages des sites carboxyliques (de $pK_a \approx 4$) et phénolique (de $pK_a \approx 9$). D'après *Matynia et al. (2009)*

1.1.5 Les matières organiques dissoutes -DOM- et les colloïdes

En milieu aqueux, une partie de la MO passe en solution. Cette matière organique dissoute (DOM) est connue pour son rôle dans la mobilité et la biodisponibilité des ETM (Citeau, 2004). Il est donc important d'évaluer et de caractériser les concentrations en DOM lors de l'évaluation du transport en milieu poreux.

Il existe différents critères permettant de différencier la DOM et les colloïdes. On peut distinguer la fraction colloïdale de la fraction dissoute en fonctions de leurs propriétés de sédimentation. On définit alors les colloïdes comme étant les particules pouvant sédimenter, en définissant une limite de temps de centrifugation à une puissance donnée. Certains auteurs considèrent que la fraction colloïdale contient toutes les particules pour lesquelles un effet électrostatique doit être pris en compte dans leurs propriétés en solution, la DOM étant donc l'ensemble des particules décrites par un comportement non-électrostatique en solution. Enfin, la taille est le troisième critère permettant de définir DOM et colloïdes. La figure 1.7 présente la classification des particules, colloïdes et solutés en fonction de leur taille (d'après Lead and Wilkinson (2006)). Le critère utilisé ici est une limite de taille, séparant le dissout (soluté) du colloïdal à 1nm. Ainsi, les macromolécules de taille supérieure à 10 Å sont considérées comme colloïdales, les autres sont dissoutes.

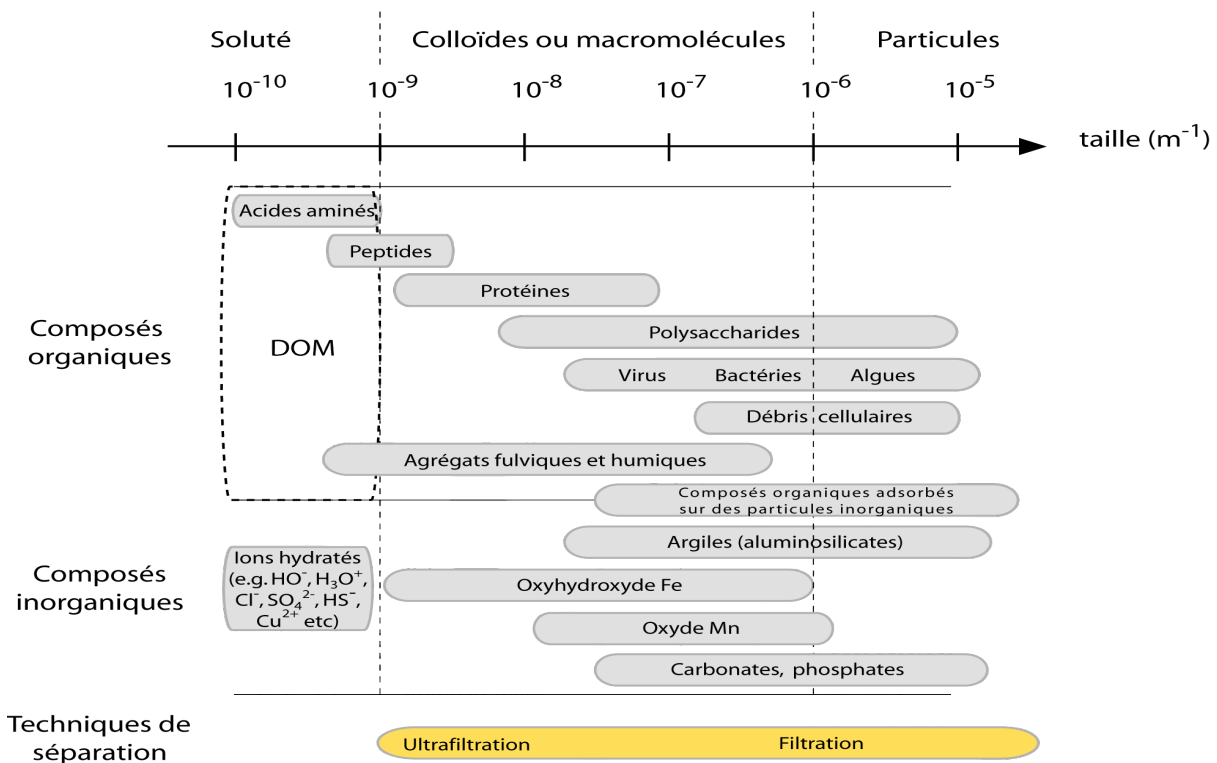


FIGURE 1.7 Distribution de la taille des particules, colloïdes et solutés organiques et inorganiques en milieu aqueux, d'après Lead and Wilkinson (2006)

1.2 Le cas de l'environnement urbain

La description des différents constituants du sol proposée reste très agronomique. On peut se poser la question de la légitimité d'une telle description dans le cas d'un environnement urbain. Les sols des bassins de rétention d'eaux pluviales urbaines sont naturellement (ou volontairement) colonisés par les plantes (cf. figure 1.8), et nous avons donc affaire au même type d'organisation du sol (litière, fraction légère, biomasse microbienne, substances humiques et DOM). Toutefois, il est clair que les environnements urbains diffèrent des sols naturels de par leurs sources de C organique. En effet, l'apport anthropique de nouveaux matériaux organiques (hydrocarbures, xénobiotiques) s'ajoute au C organique de la litière. Il en résulte une microfaune différente, adaptée à la dégradation de ces nouvelles sources de C (et éventuellement adaptée à la toxicité des polluants présents). La structure complexe des sols d'infiltration d'eaux pluviales urbaines (fines particules regroupées en agrégats [Badin \(2009\)](#)) ajoute également une spécificité aux sols urbains, mais les fondements sur le rôle des microorganismes dans la synthèse de la MO restent valables.



FIGURE 1.8 Photo aérienne du bassin d'infiltration d'eau pluviale urbaine Django Reinhardt (Chassieu -Est lyonnais-, Rhône) naturellement végétalisé. D'après [Saulais et al. \(2008\)](#), avec le concours technique de R. Saleri R. et H. Lequay H. (labo MAP-ARIA, Ecole Nationale Supérieure d'Architecture de Lyon)

1.3 Ce qu'il faut retenir :

La fraction organique des sols varie entre quelques % et 10%, mais concentre une partie importante du pouvoir réactif d'un sol. Cette MO est fractionnée en différentes familles : la litière, la fraction légère, la biomasse microbienne, les substances humiques et les DOM. Les deux premières fractions ne contribuent pas ou peu au pouvoir réactif d'un sol, de part leur situation de surface et leur rapide dégradation par la biomasse microbienne. Le rôle des microbes est primordial dans l'équilibre écologique d'un sol (malgré leur faible proportion massique 1 à 3 % de la MO du sol) : ils jouent le rôle d'un véritable réacteur biologique et vont permettre : (i) la minéralisation (relargage d'ions, de CO_2 et H_2O , renvoyés dans le réservoir atmosphérique ou utilisés comme nutriments par les plantes), (ii) la biosynthèse des molécules organiques extracellulaires nécessaires au développement du biofilm, (iii) l'humification i.e. la synthèse des substances humiques (SH). Les deux compartiments les plus réactifs du sol sont les SH et la biomasse microbienne. Les structures des SH mettent en évidence la présence de nombreux sites réactifs.

Nous proposons dans la partie suivante de discuter de la réactivité de la biomasse bactérienne, en se focalisant sur la structure des macromolécules qui la composent.

Chapitre 2

La réactivité de la biomasse bactérienne

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit la matière organique du sol. Cette description nous a permis de montrer l'importance du rôle des microbes dans la synthèse des molécules réactives de la MO. Dans le présent chapitre, nous proposons d'étudier la biomasse bactérienne, représentante majoritaire des microbes du sol, en tant qu'entité réactive. Cette approche nécessitera dans un premier temps de décrire les différents états que la bactérie peut prendre pour se développer : la cellule libre et le biofilm. Puis nous présenterons, sur chacun de ces deux états, les propriétés de réactivité acide/base connues. Nous verrons que les substances extracellulaires des biofilms présentent une grande réactivité.

2.1 Structure et réactivité des bactéries libres

2.1.1 Géométrie et structure membranaire des cellules bactériennes

Les premières observations de bactéries remontent aux premières utilisations de la microscopie optique en sciences (dès 1668 par A. van Leeuwenhoek ([Porter, 1976](#))), et leur nom, proposé par à C. G. Ehrenberg en 1828, dérive du mot grec βακτηριον (bâtonnet).

Les bactéries sont des microorganismes procaryotes, i.e. ne possédant pas de structures cellulaires spécialisées, notamment un noyau, contrairement aux eucaryotes. Nous avons vu à la section précédente leur grande importance dans la dynamique de la MO des sols : elles permettent la dégradation de la fraction légère et la production de l'humus (principalement SH et EPS). Les milliers d'espèces de bactéries se distinguent les unes des autres par un grand nombre de facteurs dont leur morphologie, la composition chimique de leur paroi, leurs besoins en nutriments, leur activité métabolique, etc. Il existe une très grande diversité de tailles et de formes chez les bactéries. Les *coques* ou *cocci* sont de forme sphérique, les *bacilles* en forme de bâtonnets, les *spirillum* en spirales. La dimension caractéristique des bactéries libres est le micron (10^{-6}m) : la plupart des bactéries ont une taille comprise entre 0.2 et 2 μm de diamètre et entre 0.5 et 8 μm de long. Les bactéries libres sont donc souvent désignées comme "colloïdes bactériens", puisque leur taille concorde avec les critères de définition des colloïdes présentés à la figure 1.7. La surface des bactéries est généralement comprise entre 2 et 10 μm^2 . La figure 2.1 présente un exemple de calcul de surface bactérienne pour les bacilles de *Pseudomonas putida*.

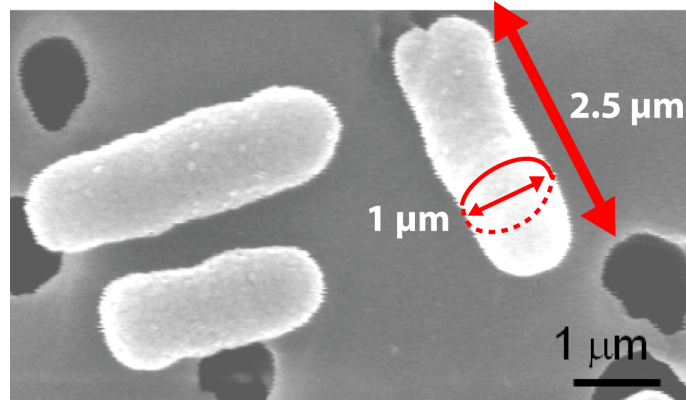


FIGURE 2.1 Exemple de calcul de la surface bactérienne de *Pseudomonas putida*. Photo MEB de [Muris \(2004\)](#)

Structure des surfaces bactériennes.

Il existe deux types de surfaces bactériennes. Les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif, répertoriées en fonction de leur capacité à fixer des colorants (test de coloration de Gram, 1884). Ces propriétés de fixation des colorants traduisent deux types d'organisations membranaires différentes.

La paroi cellulaire des bactéries à Gram positif s'organise en trois grandes parties avec, de l'extérieur vers l'intérieur : d'abord des couches multiples de peptidoglycane (PG) (cf. figure 2.2), puis un espace périplasmique et enfin la membrane plasmique (cf. figure 2.3, d'après [Tortora et al. \(2003\)](#)). Le réseau de PG forme une structure homogène, épaisse (autour de 25 nm) qui assure la résistance de la cellule. Il est traversé par de grandes chaînes de polymères secondaires formés principalement d'un alcool et de sucre phosphaté : les acides téichoïques. Les acides lipotéichoïques relient le réseau de PG à la membrane plasmique et les acides téichoïques contenus dans le réseau de PG assurent sa stabilité. L'espace périplasmique (entre le réseau de PG et la membrane plasmique) est un espace de stockage d'enzymes, de nutriments, de protéines, d'ions, etc. Il joue également un rôle dans certaines étapes de la synthèse de protéines et dans le métabolisme bactérien. La membrane plasmique est formée d'une double couche lipidique. Cette double couche de phospholipide s'organise de façon à présenter les parties hydrophiles (phosphatées) à l'extérieur de la membrane, et les parties hydrophobes (longues chaînes carbonées) à l'intérieur (cf. figure 2.3). Cette double couche contient des protéines poreuses (porines), mais également de nombreux autres complexes protéiques d'une importance vitale pour la bactérie. Cette paroi assure aux bactéries à Gram positif une forte réactivité, une grande robustesse et résistance aux environnements extrêmes, et explique en grande partie leur importante distribution dans la macroporosité des sols qui subit de fortes variations de conditions physicochimiques [Beveridge \(1989\)](#)

La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est plus complexe que celle des bactéries à Gram positif. Elle comporte deux membranes (externe et interne/ou plasmidique) ainsi qu'une couche de PG dans l'espace périplasmique (cf. figure 2.3). La membrane externe est principalement composée de phospholipides, mais elle contient également des lipopolysaccharides (LPS) et des lipoprotéines. Les LPS sont constitués d'une longue chaîne de polysaccharide et d'un lipide A au pouvoir parfois pathogène (intervenant dans les processus de reconnaissance du non-soi bactérien). Les lipoprotéines (de Braun) permettent de relier la membrane externe au PG de l'espace périplasmique. Cette membrane externe, en contact direct avec l'extérieur, constitue une barrière physiologique protégeant la bactérie, mais ne s'opposant pas au passage de toutes les substances se trouvant à proximité. Sa perméabilité est assurée par des protéines membranaires, les porines ou des protéines de transport

spécifique qui forment des canaux permettant le passage des nutriments de manière active ou passive. Au sein de l'espace périplasmique (plus épais que pour les bactéries à Gram positif), on retrouve une couche (ou quelques couches) de PG beaucoup moins dense et moins épaisse (7.5 nm) que pour les bactéries à Gram positif, mais assurant cependant la rigidité de la cellule. La membrane plasmique (ou interne) est semblable à la membrane externe, si ce n'est l'absence de LPS.

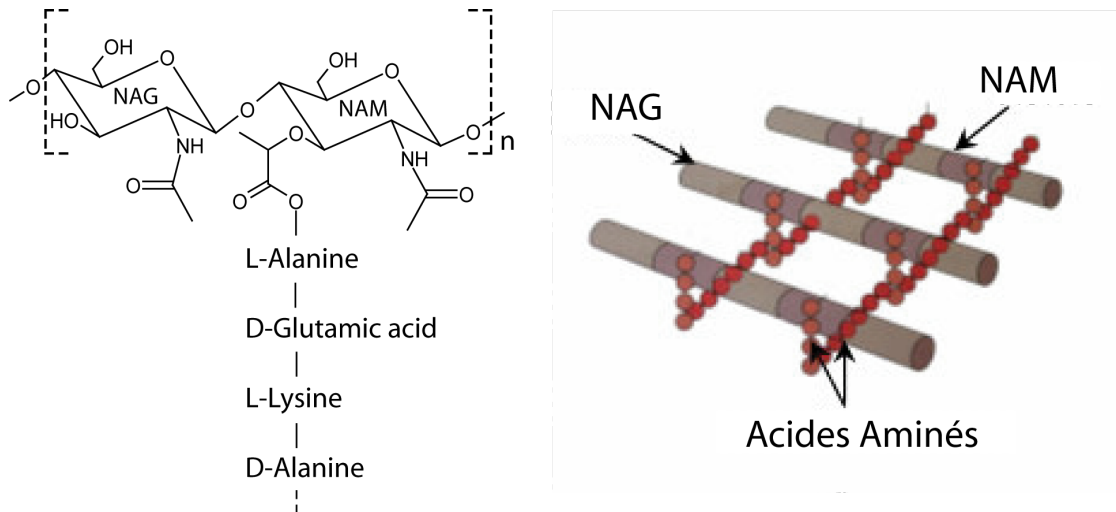


FIGURE 2.2 Structure chimique du peptidoglycane (à gauche) et représentation schématique (à droite). Le peptidoglycane (ou muréine, ou mucocomplexe, ou mucopeptide) est un polymère de glycosaminopeptide où la N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique (NAM) sont liées par des liaisons osidiques $\beta(1\rightarrow4)$ formant des chaînes linéaires, liées entre elles transversalement par des oligopeptides

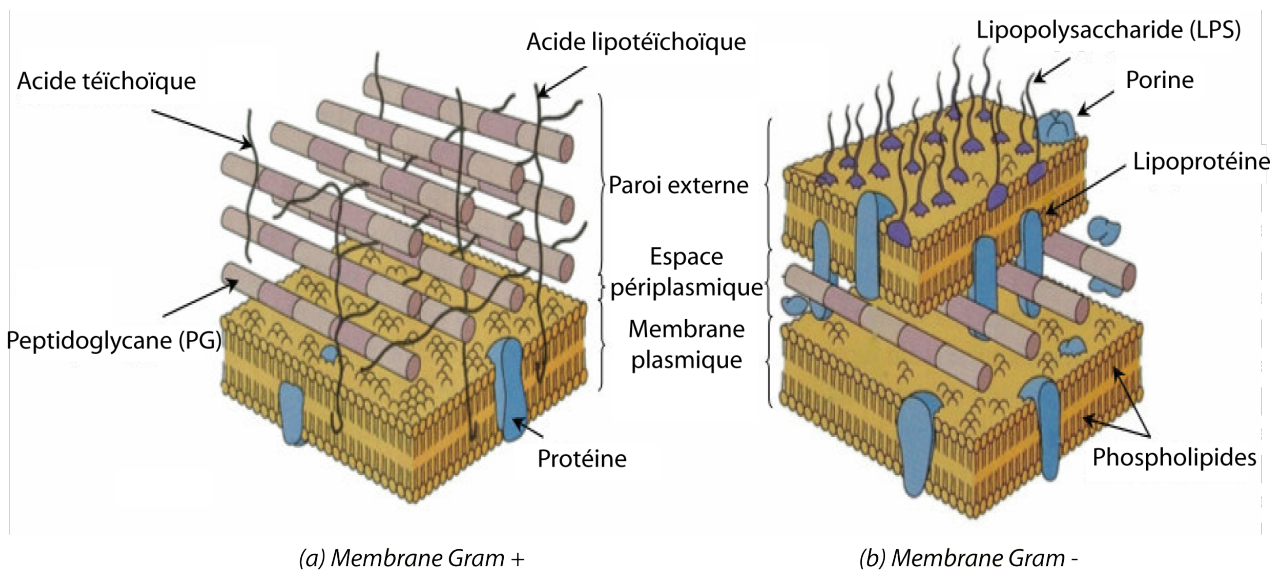


FIGURE 2.3 Structure membranaire des bactéries à Gram positif (à gauche) et Gram négatif (à droite), d'après Tortora et al. (2003)

2.1.2 Réactivité acide/base des bactéries libres

Relations structure-réactivité

L'étude des parois bactériennes met en évidence leur complexité structurale, de part l'agencement et la diversité des molécules qui la constituent. La paroi bactérienne constitue l'interface privilégiée entre les colloïdes bactériens et leur environnement. Les propriétés de surface des bactéries contrôlent certains mécanismes biogéochimiques, et c'est donc très tôt que les chercheurs se sont intéressés à la réactivité globale des bactéries (Beveridge and Murray, 1980). En particulier, nous pouvons exhiber différents groupes fonctionnels réactifs sur les différentes molécules constituant les surfaces bactériennes. Ces groupes fonctionnels peuvent être classés par famille de pKa : familles acide, neutre et basique. Une étude simple des constituants membranaires permet de localiser différents groupements réactifs (cf. figure 2.4). Les acides carboxyliques $\equiv\text{COOH}$, de pKa acide (2-4), peuvent être présents sous formes d'acides uroniques incorporés aux polysaccharides membranaires ou dans le domaine C-ter des protéines membranaires de Type II. Les groupements phosphodiester $\equiv\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}\equiv$, de pKa acide, et phosphomonoesters $\equiv\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$, de pKa neutre(6-7), se retrouvent dans les têtes hydrophiles des phospholipides ou dans la partie lipidique des LPS. Enfin on retrouve des groupements de pKa basique (8-10) dans les groupements aminés $\equiv\text{NH}_2$ (domaine N-ter des protéines membranaires de Type I, résidus lysine ou arginine d'acides aminés) et les groupements hydroxydes et phénoliques $\equiv\text{OH}$ (e.g. résidus tyrosine d'acides aminés). Ces sites fonctionnels ont pu être identifiés expérimentalement en spectroscopie EXAFS par différents auteurs (Kelly et al., 2002; Boyanov et al., 2003). Guine et al. (2006) montrent même l'existence de sites réactifs sulfurés, attribuables à des groupements fonctionnels thiols $\equiv\text{SH}$, connus pour être présents dans les résidus cystéines des acides aminés. Guine et al. (2006) proposent une revue exhaustive de la localisation membranaires des sites réactifs sur les bactéries à Gram négatif (dont les principaux groupements réactifs sont présentés en figure 2.4). Les sites carboxyliques, phosphomono- et -diesters, et les sites aminés ont récemment été identifiés par spectroscopie infra rouge (Dittrich and Sibling, 2005) ATR-FTIR en fonction du pH et par X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) (Leone et al., 2007).

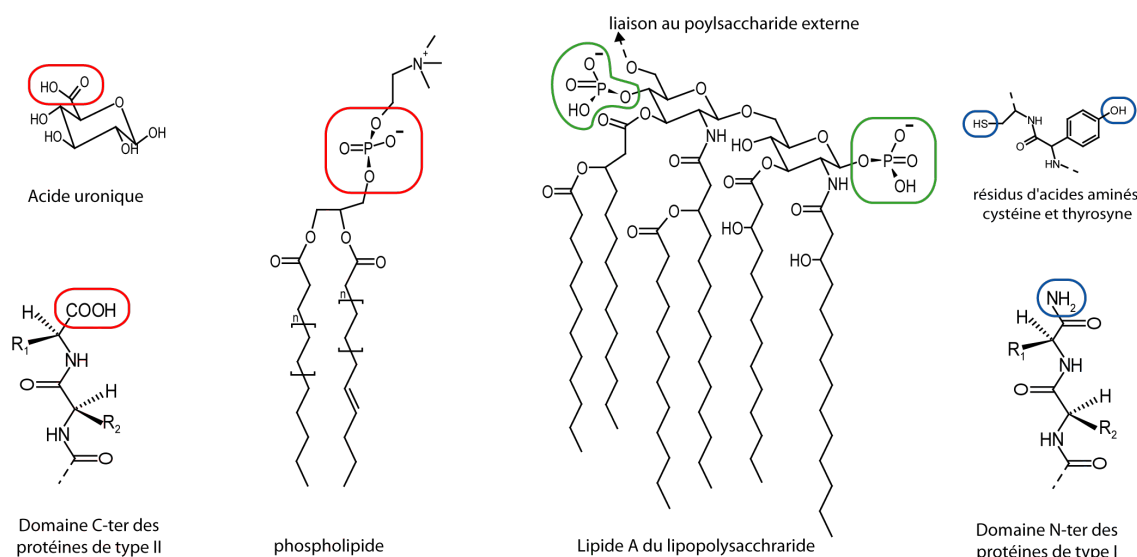


FIGURE 2.4 Localisation des différents groupements fonctionnels réactifs dans les structures moléculaires des composants membranaires. Les groupements acides, neutres et basiques sont respectivement encadrés en rouge, vert et bleu.

Titrages acidobasiques de bactéries libres

Le titrage potentiométrique est une méthode très adaptée à la détermination de la réactivité d'une surface. Le principe est de déterminer la concentration de protons relargués par la surface vers la solution (notée $[H_S]$) en fonction du pH. On trace ainsi un diagramme de spéciation acidobasique de l'échantillon titré : $[H_S]=f(\text{pH})$. Si la pente de la courbe est faible, alors le composé titré est peu réactif. A contrario, plus la pente $\Delta[H_S]/\Delta[\text{pH}]$ est raide, plus le composé est capable de relarguer des protons autour du pH considéré, il est donc dit réactif¹. In fine, on accède à la capacité globale d'échange de protons de la surface étudiée ($\Delta[H_S]$) sur une gamme de pH (généralement $4 < \text{pH} < 10$) par modélisation ou/et extrapolation du domaine de pH expérimental. Ce type d'étude a été largement exploré sur les bactéries libres, autant chez les Gram positif (Heinrich et al., 2008; Wightman et al., 2001; Cox et al., 1999; Daughney and Fein, 1998; Fein et al., 1997; Plette et al., 1996) que les Gram négatif (Ueshima et al., 2008; Guine et al., 2007, 2006; Muris, 2004; Ngwenya et al., 2003; Sokolov et al., 2001; Haas et al., 2001; de Lurdes et al., 1987). Différents auteurs ont validé l'hypothèse de la réversibilité des réactions d'échange de protons mises au cours d'un titrage acide/base (Daughney and Fein, 1998; Fein, 2000; Ngwenya et al., 2003; Dittrich and Sibling, 2005).

Les nombreuses études de titrages de bactéries ont permis de bien contraindre la modélisation des données des titrages acide/base. Les modèles non-électrostatiques avec une densité de sites discrets sont toujours suffisants pour reconstruire les données expérimentales (en utilisant de 3 à 5 sites de pKa différents (Cox et al. (1999); Sokolov et al. (2001))). Bien sûr, les données précises des titrages dépendront en premier lieu des différentes souches bactériennes utilisées, mais Borrok et al. (2005) a proposé un schéma universel pour la modélisation de la réactivité acide/base des bactéries libres. En effet, partant du constat que la réactivité totale de toutes les souches est du même ordre de grandeur : $\Delta[H_S] = 3.2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/g}_{\text{bactérie humide}}^2$ sur la gamme de pH $\in [4,10]$. Borrok et al. (2005) propose un modèle non-électrostatique à quatre sites, dont les pKa et les densités de sites sont donnés au tableau 2.1. Plus récemment, Johnson et al. (2007) a proposé le même type de modèle après une étude sur différentes souches bactériennes isolées d'eau de rivières, de sols forestiers et de sols agricoles (cf. tableau 2.1).

	Site	pKa	[Site]		$\Delta[H_S]$ (3.5 < pH < 10)	
			(mol/g _{bactérie humide})	(mmol/g _{bactérie sèche})	(mol/g _{bactérie humide})	(mmol/g _{bactérie sèche})
Modèle "universel" de Borok 2005	1	3.1	$11.0 \cdot 10^{-5}$	0.55	$3.2 \cdot 10^{-4}$	1.6
	2	4.7	$9.1 \cdot 10^{-5}$	0.46		
	3	6.6	$5.3 \cdot 10^{-5}$	0.27		
	4	9.0	$6.6 \cdot 10^{-5}$	0.33		
Modèle "bacteria consortia" de Johnson 2007	1	4.8	$12.4 \cdot 10^{-5}$	0.58	$2.82 \cdot 10^{-4}$	1.41
	2	6.54	$6.1 \cdot 10^{-5}$	0.28		
	3	9.2	$9.7 \cdot 10^{-5}$	0.45		
	4	10.4	ND	ND		

ND: Non déterminé

TABLE 2.1 Valeurs des paramètres pKa et [site] réactifs pour les modèles "universels" discrets non-électrostatiques de Borrok et al. (2005) et Johnson et al. (2007)

1. Pour plus de détail sur le formalisme des protons de surface Hs et les modèles non électrostatiques de titrage, on se reportera à l'Annexe 1

2. Généralement, on considère que la masse humide bactérienne contient 20% de matériau sec. Par exemple (Heinrich et al., 2008) détermine les facteurs de conversion masse humide en masse sèche pour deux souches bactériennes : $m_{\text{bactérie humide}}/m_{\text{bactérie sèche}}=4.5$ à 4.8 (c'est à dire 21% à 22% de la masse totale est de la matière sèche).

Certes, ces modèles "universels" ne reconstruisent pas exactement deux courbes de titrages de bactéries libres différentes, mais en regroupant les données de titrage de 36 souches bactériennes différentes Borrok et al. (2005), donne une idée juste de la réactivité totale attendue sur les colloïdes bactériens. La figure 2.5 compare le modèle "universel" de Borrok and Fein (2005) avec les résultats de titrages acide/base de trois souches bactériennes à Gram négatif (extrait de Guine et al. (2006)) pour lesquelles un modèle non-électrostatique à 3 sites est suffisant pour reconstruire les données expérimentales.

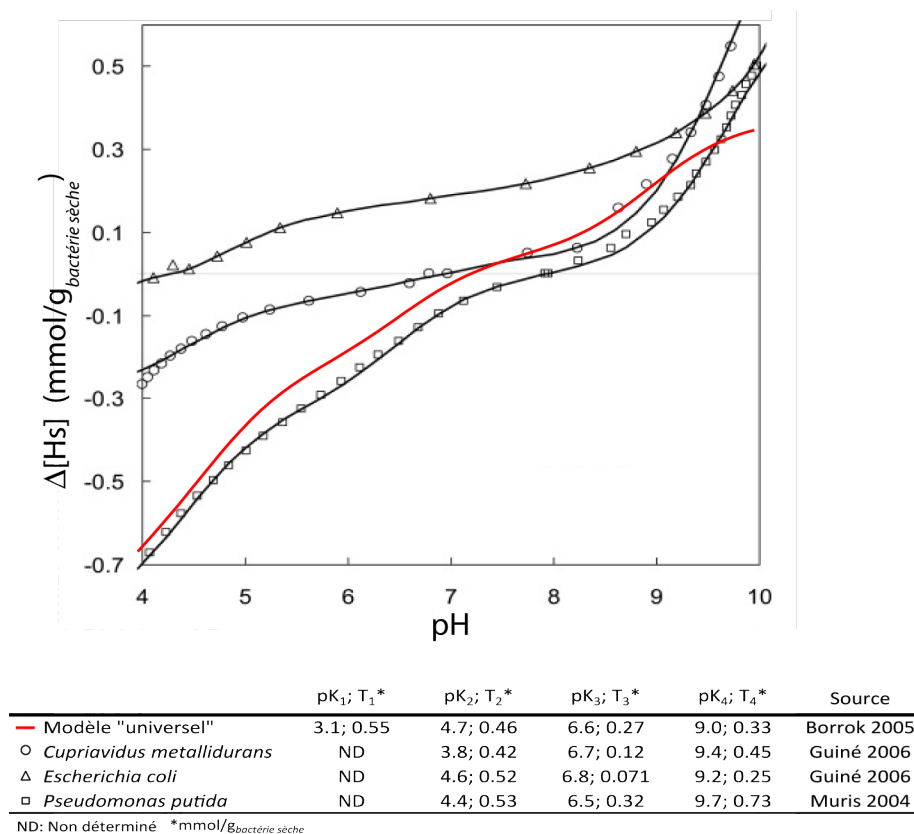


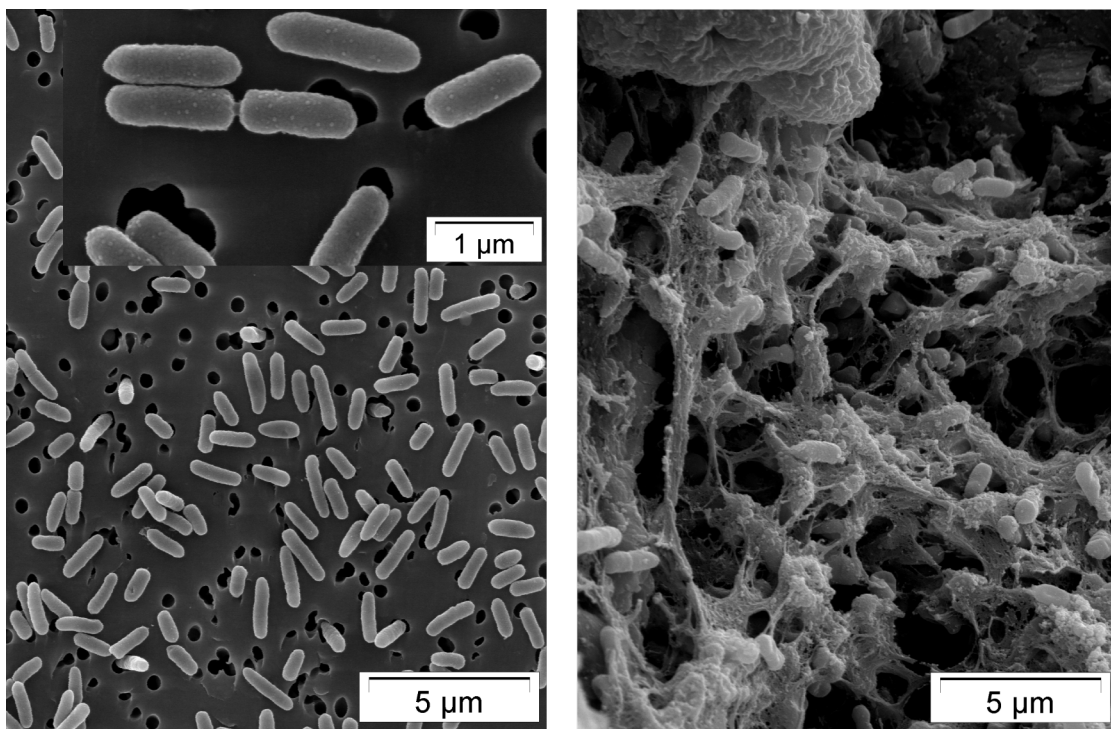
FIGURE 2.5 Comparaison du modèle universel de Borrok and Fein (2005) avec les courbes de titrages acide-base de *Cupriavidus metallidurans*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas putida*. Les symboles et les lignes pleines réfèrent respectivement aux mesures et au modèles (paramètres dans le tableau sous le graphique), d'après Guine et al. (2006); Muris (2004)

Enfin, il est important de noter que les courbes de titrages des substrats bactériens sont comparables entre elles à un facteur de calage prêt : $[H_0]$, la valeur de $[H_S]$ pour le pH nul. En pratique, cette valeur est inaccessible, car tout titrage à des pH inférieurs à 2 entraînerait : (i) la destruction des cellules bactériennes, (ii) des erreurs de mesure importantes dues à des différences de concentrations en protons trop grandes entre protons ajoutés à la solution (valeur faible) et protons libres en solutions (valeurs d'autant plus élevée que le pH diminue). La valeur de $[H_0]$ pourrait théoriquement être évaluée par des mesures de charge de surface, mais nous verrons là encore plus tard (cf. section 4.2) que le point de charge nul n'est pas aisément évaluable sur les colloïdes bactériens. En pratique, deux courbes de titrage de bactérie sont donc comparables à une translation prêt sur l'axe des ordonnées $\Delta[H_S]$.

2.2 Structure et réactivité du biofilm bactérien

2.2.1 De la bactérie libre au biofilm

Au XIX^{ème} siècles, les principales découvertes de Louis Pasteur³ vont s'accompagner du développement de milieux de culture permettant de cultiver les bactéries au laboratoire. Aujourd'hui encore, la grande majorité des travaux effectués sur les bactéries s'effectue à partir de microbes développés en cultures liquides ou sur boîtes de Pétri. L'avantage de ces techniques de culture est de produire des bactéries libre bien isolables, observables en microscopie (optique et électronique), et donc propices aux études plus approfondies sur leurs propriétés (études des différents compartiments de la cellule bactérienne, isolement des molécules qui la compose, extraction et purification de l'ADN pour la caractérisation du génome, mutations, etc.). En quelque sorte, les bactéries libres sont des objets d'études idéaux, comme on peut par exemple l'observer sur la figure 2.6(a). Mais le modèle de la bactérie libre traduit mal la réalité de l'organisation microbienne dans l'environnement.



(a) *Pseudomonas putida* en cellules libres

(b) *Pseudomonas putida* développée en biofilm sur des grains de sable.

FIGURE 2.6 Les différents états de la bactérie *Pseudomonas putida*, développée en culture liquide -cellules libres à gauche- et en biofilm -à droite-. Mise en évidence de l'importance de la matrice extracellulaire. Photos MEB de Muris (2004)

La plupart des microorganismes favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée à un support, plutôt que libre et isolée dans le milieu environnemental ((Filloux and Vallet, 2003)). Ce type d'organisation conduit à la création des biofilms. Le biofilm est défini comme une population bactérienne, adhérente à une surface, et encapsulée dans une matrice extracellulaire (MEX) constituée de polymères d'origine bactérienne, dont les exopolysaccharides (EPS). Selon Flemming (1993); Davies (2000); Davey and O' toole (2000); Sutherland (2001) plus de 99% des microorganismes vivent sous la forme de biofilms dans l'environnement, et quasiment toutes les surfaces sont

3. démonstration que les microorganismes peuvent être des agents infectieux, que les processus de fermentation sont causés par des micro-organismes, invalidation de la théorie de la génération spontanée, conception des procédés de destruction des micro-organismes comme l'autoclave et la pasteurisation

susceptibles d'être colonisées. Les biofilms se développent donc aux interfaces (le plus souvent solide/eau, mais pas exclusivement), leur permettant d'avoir une surface d'adhésion, et un apport en nutriments (par les matières dissoutes transportés dans l'eau). Le nombre d'études concernant les biofilms a grandement augmenté depuis une dizaine d'année, suite à la mise en évidence par certains auteurs du comportement différent des communautés sessiles (biofilms) et planctoniques (cellules libre) ([Briones and Raskin, 2003](#)). On retrouve l'organisation en biofilm dans tous les environnements : dans les sols ([Burns and Stach, 2000](#)), les milieux médicaux ([Costerton, 1999](#)) -recherches sur les désinfectant de surfaces-, ou industriels ([Auerbach et al., 2000](#)) -recherches sur les colmatages et la corrosion-. Cet intérêt tardif pour les biofilms se comprend bien de part la complexité du système biofilm face au modèle de la cellule bactérienne libre.

Cette organisation en biofilm est une réponse biologique aux agressions extérieures. [Flemming \(1993\)](#) a synthétisé les avantages d'un mode de croissance en biofilm :

- Transférer et concentrer les nutriments de la phase liquide vers la matrice du biofilm.
- Protéger la communauté des fluctuations du milieu extérieur (pH, FI, [biocide], forces de compression, déshydratation)
- Préserver les informations génétiques et favoriser le transfert de gène grâce au long temps de division des microorganismes lorsqu'ils se développent en biofilm
- Développer des microconsortia : symbioses (e.g. avec des lichens, des algues), utiliser des substrats moins facilement biodégradables (e.g. dégradation de la cellulose, de xénobiotiques, nitrification), création de niches écologiques (e.g. zones anaérobies dans un environnement aérobie, compartiments riches en nutriments dans les systèmes oligotrophes).

Si notre propos est ici de développer l'étude des biofilms bactériens, il semble toutefois important de noter que l'organisation en biofilm ne se limite pas aux communautés bactériennes uniquement. En effet, par exemple, le périphyton se développant sur les roches des rivières est un biofilm formé de bactéries, d'algues et de champignons.

2.2.2 Structure du biofilm bactérien

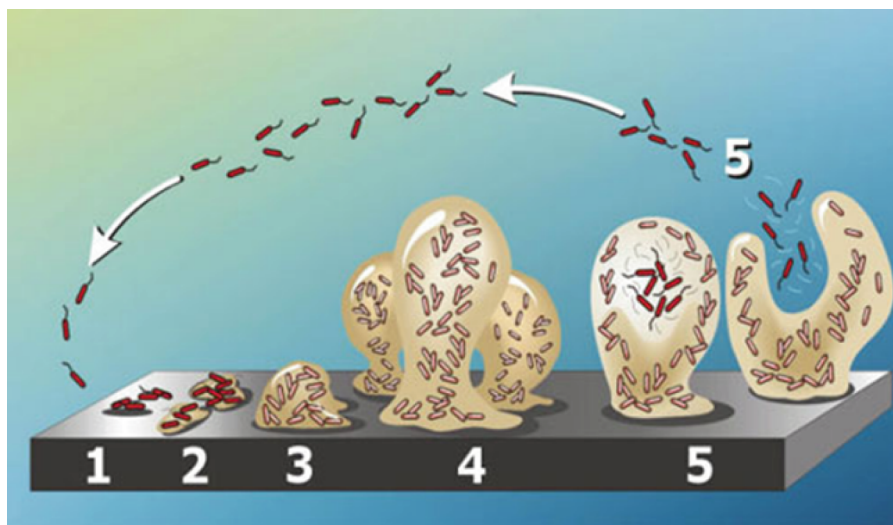


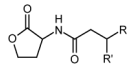
FIGURE 2.7 Cycle de formation d'un biofilm ([Davies, 2004](#))

La figure 2.7 représente les grandes phases de développement du biofilm, telles qu’elles sont proposées par de nombreux auteurs (Van Loosdrecht et al., 1990; Davies, 2000; Filloux and Vallet, 2003; Branda et al., 2005) :

1. L’adhésion initiale (donnant fin au transport des cellules libres) par un attachement réversible, puis un attachement irréversible.
2. L’attachement avec les sécrétions de polymères extracellulaires (dont les EPS).
3. La colonisation, se traduisant par une phase linéaire caractéristique d’accumulation de la biomasse.
4. Une phase de ralentissement suivie d’une stabilisation de la masse et de l’épaisseur du biofilm liées à des phénomènes physiques comme le cisaillement.
5. Une phase de décrochage au cours de laquelle le biofilm se détache de manière aléatoire du support et qui dépend de facteurs biologiques, chimiques et physiques intervenants au niveau de la surface de fixation. Certaines cellules du biofilm peuvent alors retourner à un état planctonique.

L’événement initial pour la formation d’un biofilm est le contact entre les microorganismes et une surface (Davies, 2000). Ce contact peut être provoqué par le mouvement brownien des particules, ou leur sédimentation, ou encore le transport convectif des cellules (Van Loosdrecht et al., 1987). Une fois le contact établi, le processus d’attachement a lieu au travers de plusieurs types d’interactions : l’hydrophobie de la cellule conditionne largement ce processus d’attachement, le rôle des flagelles et des autres récepteurs protéiques peut également être important chez certaines souches (Branda et al., 2005). Cette première étape reste réversible si elle n’est pas suivie par la création de liaisons fortes entre les bactéries et la surface à coloniser.

Le passage d’une liaison faible à une liaison forte est fréquemment associé à la sécrétion de polymères extracellulaires (dont les EPS), et cette transition correspond au réel changement physiologique entre cellules libres et biofilm (Davies, 2000). La maturation des biofilms microbiens résulte en un développement de l’architecture complexe, des canaux et des pores. De nombreuses études se sont intéressées à la communication entre les bactéries qui semble jouer un rôle important dans

la formation du biofilm. Les bactéries produisent des homocérinelactones  (Filloux and Vallet, 2003) leur permettant d’estimer la population bactérienne avoisinante. Le taux d’homocérinelactones permet aux cellules de détecter la présence d’une concentration critique de bactéries, déclenchant une réponse collective : bioluminescence, formation de biofilm... On parle de phénomène de *quorum-sensing* (Atkinson et al., 2006).

2.2.3 Importance des EPS

Composition de la matrice extracellulaire (MEX)

Après l’attachement à la surface, les bactéries connaissent plusieurs transformations pour s’adapter à la vie en biofilm, comme par exemple le développement de résistances aux antibiotiques (problématique en milieu médical, Pulcini (2001)). La principale transformation peut être vue comme la synthèse croissante d’EPS (Filloux and Vallet, 2003; Branda et al., 2005). La sécrétion des polymères extracellulaires représente de 75 à 90% du biofilm selon les espèces (Costerton, 1999; Zhang and Fang, 2001). Cette importance de la matrice extracellulaire se visualise très bien sur les clichés en microscopie électronique de Muris (2004) présentés à la figure 2.6.

La matrice extracellulaire composant le biofilm n’est pas uniquement formée de polysaccharides.

En effet, outre les EPS⁴, on retrouve dans la matrice d'autres types de molécules, en particulier : des protéines, des acides nucléiques et des acides gras. Les proportions de chacune de ces composantes dans le biofilm peuvent être très variables d'une espèce à l'autre comme le montre le tableau 2.2. Bien que la composition de la matrice extracellulaire soit variable, et que les dosages des différentes familles de molécules soient obtenus par des méthodes de dosage globales (e.g. méthode de [Lowry and Randall \(1951\)](#) pour les protéines ou [Dubois et al. \(1956\)](#) pour les carbohydrates), les principales classes de molécule constituant le biofilm se retrouvent bien : EPS, Acides Nucléiques, et protéines.

Composition de la matrice du biofilm bactérien Ratio EPS/Protéines/Acides Nucléiques	Référence	Souche bactérienne produisant le biofilm
1/2.17/0.57	Causse 2009	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC12633
1/3.3/20	Matsukawa 2004	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
1/2.05/0.001	Priester 2006	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 33015
1/1/ND	Simoes 2005	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525
1/8/ND	MacSwain2004	Boues activées
1/1.30/ND	Marcotte 2007	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
1/1.08/ND	Marcotte 2007	<i>Staphylococcus mutans</i> NCTC 10 449
1/2.78/ND	Marcotte 2007	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145
1/2.11/0.27*	Comte 2006	Boues activées
1/1.92/0.32*	Comte 2006	Boues activées
1/1.31/0.38*	Guibaud 2003	Boues activées
1/1.56/0.23*	Guibaud 2003	Boues activées
1/1.82/0.19*	Guibaud 2003	Boues activées

ND: Non Déterminé

*Comte 2006 et Guibaud 2003 ont également déterminé les taux d'acides uroniques, acides humiques et lipides contenus dans les boues activées. Les rapport moyens mesurés pour Guibaud 2003 valent: EPS/acides uroniques= 1/1.98 ; EPS/acides humiques = 1/1.44; EPS/lipides = 1/0.10

TABLE 2.2 Variation dans la composition de la matrice extracellulaire du biofilm, d'après [Guibaud et al. \(2003\)](#); [McSwain et al. \(2004\)](#); [Matsukawa and Greenberg \(2004\)](#); [Simões et al. \(2005\)](#); [Priester et al. \(2006\)](#); [Comte et al. \(2006\)](#); [Marcotte et al. \(2007\)](#) et [Causse \(2009\)](#)

Le terme d'exopolysaccharide (EPS) a été proposé comme appellation générale pour les polymères de carbohydrates sécrétés à l'extérieur de la cellule ([Sutherland, 1982](#)). Ils peuvent être excrétés dans le milieu environnant les cellules ou rester liés à la surface de la cellule pour former une capsule ou une couche S autour de chaque bactérie (cf. figure 2.8). La plus commune de ces structures est la capsule, structure amorphe relativement épaisse (25 à 1000nm), consistant en une matrice d'acides mucopolysaccharidiques (parfois aussi de polypeptides). Les couches S sont quant à elles formées d'une multitude de protéines (ou glycoprotéines) qui s'assemblent dans un réseau pseudo-cristallin autour des cellules ([Beveridge, 1989](#)). Ces réseaux de polysaccharides forment la trame du biofilm, sur laquelle vont venir se fixer d'autres substances extracellulaires ([Matsukawa and Greenberg, 2004](#)). On peut donc structurellement définir deux types d'EPS : les EPS capsulaires, produits autour de la cellule (cf. figure 2.8), constituant des amorces pour les EPS plus externes, structurant le réseau du biofilm (cf. figure 2.6(b))

4. Attention ! Dans la littérature en biogéochimie de l'environnement, le terme EPS désigne pour certains auteurs Exo Poly Saccharides et pour d'autres Extra Polymeric Substances (c'est à dire la matrice extracellulaire dans son ensemble contenant les sucres et d'autres substances extracellulaires). Dans le présent manuscrit, le terme EPS réfère exclusivement aux sucres (Exo Poly Saccharides) et on désignera l'ensemble des substances extracellulaires sous le terme de Matrice EXtracellulaire (MEX).

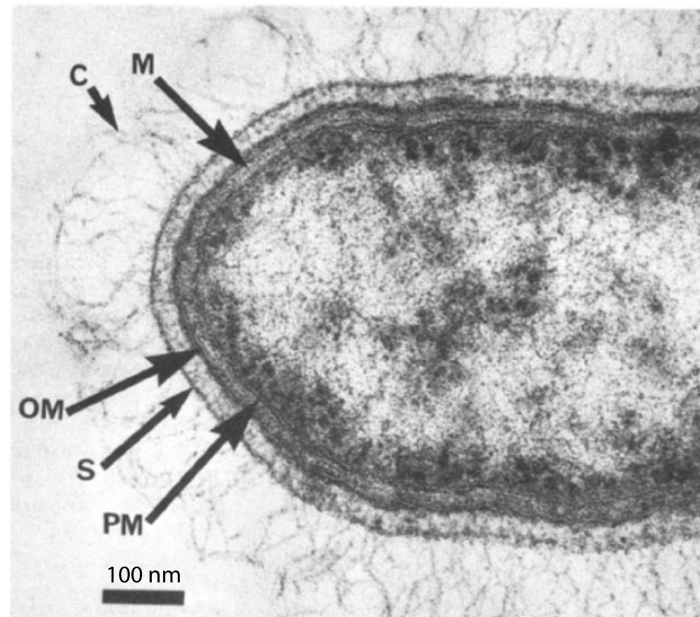


FIGURE 2.8 Coupe fine d'une cellule bactérienne (non identifiée) à Gram négatif, (Beveridge, 1989). Illustration des constituants membranaires et EPS : (PM) la membrane plasmique, (M) le réseau de peptidoglycane (M pour Muréine), (OM) la membrane externe, et les EPS à l'extérieur : couches S (S) et capsule (C).

Rôles des EPS

Les EPS jouent un rôle majeur dans l'adhésion aux surfaces et l'agrégation des cellules, la résistance aux composés antibactériens, aux métaux, la formation de colonies, la dégradation de composés organiques et la communication entre cellules (Flett et al., 1989; O' Toole et al., 2000; De Swaaf et al., 2001; Zhang and Fang, 2001; Filloux and Vallet, 2003; Branda et al., 2005). Pour Omoike et al. (2004), les groupements phosphodiester des acides nucléiques extracellulaires jouent un rôle essentiel dans la fixation des EPS sur les surfaces minérales de type goethite (α -FeOOH) : ces groupes phosphates émergent de la mixture d'EPS pour former des complexes monodentates avec les centres ferriques de la goethite, créant un pont énergétiquement stable pour l'adhésion d'autres EPS ou de cellules.

La capsule d'EPS semble également augmenter l'hydrophobie de la surface bactérienne (Bergmaier et al., 2001), favoriser l'adhésion, la cohésion et l'intégrité des cellules (Flemming, 1993). Van Elsas et al. (1997) a montré que les bactéries du sol peuvent créer leur propre microhabitat en produisant des EPS qui retiennent l'eau pendant la dessiccation. Par ailleurs, une étude sur *Pseudomonas putida* a mis en évidence une plus abondante production d'EPS dans des conditions de moindre oxygénation (Zhang et al., 1998).

Les EPS : le squelette du biofilm

Différentes études soutiennent que les EPS forment le squelette du biofilm ((Wuertz et al., 2001; Matsukawa and Greenberg, 2004)). Les EPS sécrétés par les bactéries forment un maillage liant les différentes cellules bactériennes à la surface d'adhésion. Ce réseau d'EPS, véritable *biofilm backbone* (Matsukawa and Greenberg, 2004) permet au biofilm de se structurer. Matsukawa and Greenberg (2004) ont montré par des études sur *Pseudomonas aeruginosa* que les mutants défectueux dans la synthèse de l'EPS montraient une moindre survie et une incapacité à former un biofilm bien structuré, tandis que les souches mères non mutées structuraient des biofilms plus résistants et plus

viables. Ainsi, pour ces auteurs, même si les EPS ne constituent pas la majorité de la fraction extracellulaire, ils restent cependant nécessaires et indispensables à la formation du biofilm. Ce squelette de carbohydrates permet d'une part de se fixer aux surfaces colonisées, et d'autre part, de fixer les substances chimiques libérées par la lyse cellulaire au sein du biofilm. En particulier, les protéines et les acides nucléiques se fixent sur ce réseau de carbohydrates. La figure 2.9 schématise cette organisation du biofilm bactérien.

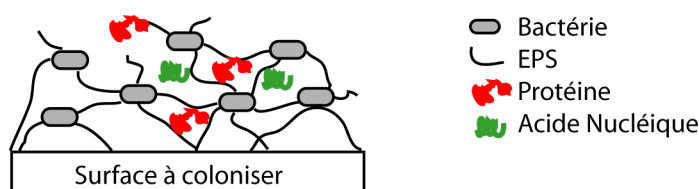


FIGURE 2.9 Schéma de l'organisation du biofilm bactérien. Le réseau d'EPS lie les bactéries entre elles et à la surface colonisée. Sur ce squelette d'EPS, d'autres biomolécules du milieu vont se fixer : protéines, acides nucléiques, etc.

2.2.4 Réactivité acide/base du biofilm bactérien

Il est clair que le biofilm, de part sa composition et sa structure, se différencie des colloïdes bactériens. Par conséquent, sa réactivité acide/base doit être différente de celle des bactéries libres. Une approche structurale peut donner des idées des groupements fonctionnels réactifs que l'on va retrouver dans la matrice du biofilm. Si on considère les trois principaux constituants de la matrice du biofilm : EPS, protéines et acides nucléiques, les possibilités de sites réactifs sont nombreuses. On pourra trouver des acides uroniques (i.e. carboxyliques) sur les polysaccharides bactériens, des groupements phosphates sur les acides nucléiques (phosphomonoester et phosphodiester), des groupements amines en N-ter des protéines, etc. Mais cette approche structurale ne permet pas de conclure sur la réactivité des biofilms bactériens, tant la connaissance de la proportion de chaque composante peut a priori influencer la réactivité du biofilm.

Muris (2004) s'est intéressée à comparer la réactivité d'une souche bactérienne à l'état libre et à l'état de biofilm. Le travail s'est focalisé sur une souche bactérienne modèle : *Pseudomonas putida*, développée en culture liquide (bactérie libre) et en colonne de laboratoire sur du sable afin de générer des biofilms. Les résultats, présentés à la figure 2.10 sont tout a fait originaux :

1. Le biofilm est beaucoup plus réactif que la bactérie planctonique pour une même quantité de protéine, et pour une même quantité de masse sèche (NB : 1g de bactérie planctonique contient 55% de protéines et 1g de biofilm environ 50% de protéines).
2. Le site de pKa acide disparaît dans le biofilm alors que le site de pKa neutre a une concentration très importante ($\approx 3.5 \text{ mmol/g}_{\text{mat.seche}}$).

D'autres études proposent la comparaison de la réactivité aux protons (et aux métaux) de cellules bactériennes avec ou sans EPS (Tourney et al., 2008; Ueshima et al., 2008). A la différence de Muris (2004), il n'y a pas de protocole conçu pour développer la bactérie sous forme d'un réel biofilm sur une interface, mais l'idée est d'utiliser une culture liquide des bactéries âgées (après 24h en phase plateau) afin d'obtenir un matériel cellulaire encapsulé dans ses sécrétions d'EPS. Les bactéries sans EPS sont ensuite obtenues par traitement enzymatique sur les bactéries âgées, afin d'obtenir des surfaces bactériennes "propres" sans EPS. Cette démarche expérimentale est bien différente de la conception d'un "vrai" biofilm, mais elle a le mérite de mettre en évidence le rôle des EPS

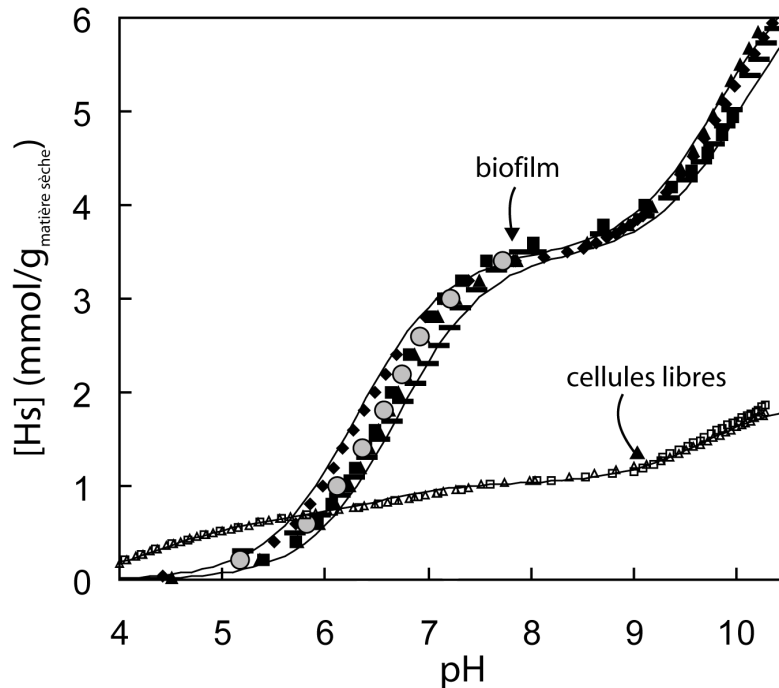
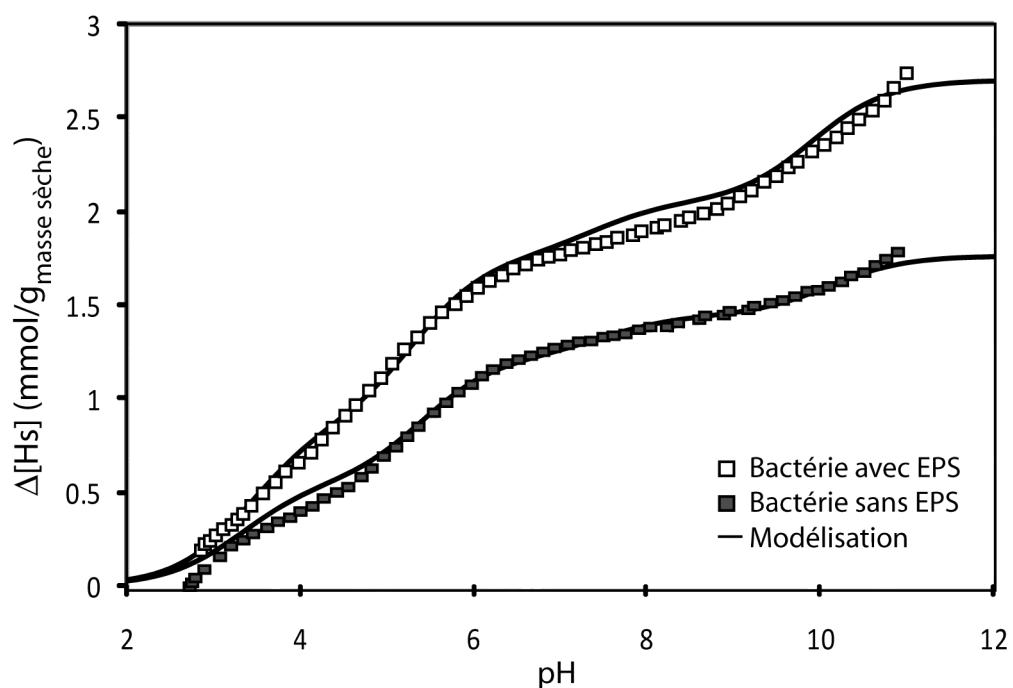


FIGURE 2.10 Réactivités acide/base comparées du biofilm et des cellules libres de *Pseudomonas putida*. Adapté des données de Muris (2004).

(ou du moins des substances extracellulaires) dans la réactivité des substrats bactériens. Tourney et al. (2008) montrent que les bactéries avec EPS sont plus réactives aux protons que celles sans EPS : la réactivité globale $\Delta[H_s]$ augmente de 50% (pour une même masse) quand les bactéries sont encapsulées dans leurs EPS (cf. figure 2.11). A la différence de Muris (2004), ce ne sont pas les sites de pKa neutres qui connaissent une grande augmentation en concentration, mais majoritairement les sites basiques (amino/hydroxyle), les sites acides phosphodiester et acides carboxyliques (cf. figure 2.11). Tourney et al. (2008) montrent également que le carbone organique dissous (COD) relargué par les cellules est très important dans le cadre des cellules avec EPS (30 mg de COD/gbactérie sèche) tandis qu'il est faible pour les cellules sans EPS (5 mg de COD/gbactérie sèche). Ce dernier résultat semble montrer que le COT est majoritairement relargué par les EPS bactériens.

Enfin Guine et al. (2007); Ngwenya (2007) montrent que les bactéries âgées sont plus réactives aux protons (et aux métaux) que les juvéniles. Encore un fois, cette augmentation de réactivité avec l'âge de la cellule bactérienne est interprétée par une augmentation de la production de substances extracellulaires au cours de la croissance bactérienne.

Ces études mettent en évidence l'augmentation de la réactivité acide/base des biofilms par rapport aux bactéries libres. Il est donc clair que les constituants de la matrice extracellulaire du biofilm doivent jouer un rôle dans la capacité d'échange de protons. Dans le cas de l'étude de Muris (2004) (la seule étude comparant un biofilm réel et les bactéries libres) les composantes du biofilms sont enrichies en site de pKa neutres. La présence de ces sites neutres peut a priori connaître différentes origines : ils peuvent être dus aux phosphomonoesters de résidus d'acide nucléiques, à des sucres phosphatés, à des résidus de phospholipides extracellulaires, etc. Il n'est même pas clair que ces sites soient dus à des groupements phosphatés, même si Toner et al. (2005) ont montré par étude EXAFS que les groupements phosphates jouent un rôle prépondérant dans la sorption du zinc dans le biofilm de *Pseudomonas putida*. Tourney et al. (2008) confirme cette tendance à l'augmentation de la réactivité en biofilms par rapport aux cellules libres chez *Bacillus licheniformis*, tandis que Ueshima et al. (2008) reste plus modéré dans ses conclusions. Pour Tourney et al. (2008) ce ne sont



	$pK_1; T_1^*$	$pK_2; T_2^*$	$pK_3; T_3^*$	$pK_4; T_4^*$	$\Delta[Hs]^*$ ($3 < pH < 11$)
<i>Bacillus licheniformis</i> sans EPS					
Modèle moyen	3.3; 0.55	5.4; 0.0.68	7.5; 0.22	10.1; 0.32	1.75
<i>Bacillus licheniformis</i> + EPS					
Modèle moyen	3.4; 0.85	5.3; 0.91	7.4; 0.29	9.9; 0.65	2.62
Augmentation relative [site] avec EPS/sans EPS	55%	34%	32%	103%	50%

*mmol/g_{bactérie sèche}

FIGURE 2.11 Réactivités acide/base comparées des cellules libres de *Bacillus licheniformis* avec ou sans EPS. Adapté des données de [Tourney et al. \(2008\)](#).

pas les sites neutres (phosphoryles) qui augmentent la réactivité des biofilms, mais les sites acides (carboxyliques et phosphodiesteres) ainsi que les sites amino/hydroxyles. En définitive, même si les conclusions sur les types de molécules et de sites impliquées dans cette augmentation de réactivité sont difficiles à tirer, ces travaux mettent tout de même clairement en évidence un comportement hyper-réactif du biofilm par rapport aux cellules libres.

Nous avons vus dans la section précédente l'importance du rôle des EPS dans la structuration du biofilm (Matsukawa and Greenberg, 2004; Branda et al., 2005; Sutherland, 2001). D'autre part, le biofilm bactérien apparaît plus réactif que la bactérie libre (Muris, 2004; Tourney et al., 2008). Dans ce contexte, et afin de mieux comprendre la réactivité de la biomasse bactérienne, il apparaît intéressant d'explorer la réactivité des constituants de la matrice extracellulaire du biofilm. Les protéines et les résidus d'acides nucléiques apparaissant comme des mélanges complexes issus de la lyse cellulaire, il apparaît dans un premier temps difficile d'aborder la réactivité de ces substrats complexes. D'un autre côté, les exopolysaccharides bactériens sont connus pour être synthétisés de façon reproductible par les souches dont ils sont issus (Marcotte et al., 2007; Sutherland, 2001). Ainsi, les EPS apparaissent comme des molécules modèles pour l'étude de la réactivité de la biomasse bactérienne. C'est dans ce contexte que nous avons choisi d'explorer la réactivité d'un EPS bactérien modèle : le xanthane. Avant de présenter plus en avant le système que nous avons étudié, le chapitre suivant se propose de rappeler les fondements nécessaires à l'étude de la réactivité des exopolysaccharides (EPS) issus de la biomasse bactérienne du sol.

2.3 Ce qu'il faut retenir :

La biomasse bactérienne a d'abord été étudiée via le modèle de la cellule libre (ou planctonique). La réactivité acide/base de ces colloïdes bactériens a été largement explorée et on attribue leur capacité d'échange de protons à leur structure membranaire, qui propose de nombreux groupements réactifs (acides téichoïques, acides uroniques, phospholipides, lipopolysaccharides (LPS), résidus de protéines). Les différents groupements fonctionnels ($\equiv\text{COOH}$, $\equiv\text{RO}(\text{P}=\text{O})(\text{OH})\text{O}\equiv$, $\equiv\text{RO}(\text{P}=\text{O})(\text{OH})\text{OH}\equiv$, $\equiv\text{RNH}_2$, $\equiv\text{OH}$, $\equiv\text{SH}$) ont été identifiés par spectroscopie d'absorption X ou ATR-FTIR. Les modèles non-électrostatiques permettent une bonne modélisation des données expérimentales de titrage avec 3 à 5 sites discrets de pKa différents. Certains auteurs suggèrent un modèle non-électrostatique universel à 4 sites discrets (Borrok and Fein, 2005; Johnson et al., 2007). Mais le modèle de la bactérie libre traduit mal la réalité de l'organisation cellulaire. En effet, c'est en **biofilm** que se structure la biomasse microbienne dans les sols (et sur toute autre interface). Le biofilm est composé des bactéries encapsulées dans une matrice de polymères extracellulaires. Cette organisation présente de nombreux avantages pour la survie de la colonie (e.g. protection des agressions du milieu extérieur, accumulation de nutriments dans la matrice). Le squelette du biofilm est constitué des EPS qui lient les bactéries entre elles et à la surface qu'elles colonisent. Ce réseau d'EPS joue un rôle critique dans la formation du biofilm (Matsukawa and Greenberg, 2004) et va également permettre de fixer les autres constituants du biofilm : principalement protéines et acides nucléiques extracellulaires -pouvant provenir de la lyse cellulaire. Ces différences de constitution entre biofilms et bactéries libres ont pour conséquence une différence de réactivité acide/base. Ainsi Muris (2004) montre que le biofilm de *Pseudomonas putida* est quatre fois plus réactif que les bactéries libres. Afin de mieux comprendre la réactivité du biofilm, il apparaît opportun de se focaliser sur la réactivité des molécules de la matrice extracellulaire. En particulier, les EPS, jouant un rôle critique dans l'élaboration du biofilm sont un sujet d'étude modèle pour comprendre la grande réactivité des biofilms.

Avant de préciser notre système modèle d'étude (Xanthane+Cu) au chapitre 5, nous proposons de rappeler les bases de l'étude des sucres dans le chapitre 3, et les connaissances concernant la complexation des métaux sur la MO d'origine bactérienne au chapitre 4.

Chapitre 3

Les sucres dans les sols

L'étude de la réactivité des EPS étant nécessaire à la compréhension de la réactivité de la biomasse du sol, ce chapitre se propose de rappeler les bases nécessaires à l'étude des sucres. Nous discuterons ensuite de l'importance des carbohydrates dans les sols, de leur origine (principalement microbienne) ainsi que de la forme sous laquelle ils se trouvent (simple ou polysaccharides). Une étude structurale des EPS mettra en évidence leur fonctionnalisation, et leur implication potentielle dans la réactivité d'un sol. La nécessité d'un EPS comme modèle d'étude sera alors mise en évidence.

3.1 Généralités

Les carbohydrates constituent entre 5 et 25% de la matière organique du sol, et sont donc les seconds composants les plus abondants de l'humus (Stevenson, 1994). Une partie des carbohydrates totaux est produite par les plantes sous formes d'hémicellulose et cellulose étant plus ou moins rapidement décomposés par les microorganismes du sol. Les microbes synthétisent ensuite des polysaccharides et d'autres carbohydrates. A l'exception de la couche superficielle de la litière (cf. section 1.2.1), ce sont les produits microbiens qui produisent la majorité des carbohydrates du sol (Stevenson, 1994). Les exsudats de racine de plante (sève sucrée) constitue une source mineure de sucre dans le sol, avec une existence transitoire¹.

Le tableau 3.1 donne les ordres de grandeur en concentration des contributions des différents types de sucres dans la composition de la MO du sol, obtenus après hydrolyse. Pour la plupart, les sucres sont sous formes complexe (i.e. polymérique), les sucres libres existant seulement à l'état de trace dans les sols.

Type de sucre simple*	% MO
Acides uroniques	1-5
Sucres aminés	2-6
Hexoses	4-12
Pentoses	<5
Celluloses et dérivés	<15
Autres (e.g. sucre méthylés)	trace
Total	5-25

*après hydrolyse des matériaux polymériques

TABLE 3.1 Contributions en différents type de sucres dans la MO du sol, d'après Stevenson (1994)

1. Ils sont rapidement utilisés comme source de C par les microbes vivant en symbiose dans la rhizosphère

3.2 Importance des carbohydrates du sol

L'importance des carbohydrates dans les sols provient notamment de la capacité qu'ont les polysaccharides complexes à lier des particules inorganiques du sol en agrégats stables (complexes argilo-organiques). Ils forment également des complexes avec des cations métalliques, et sont utilisés comme blocs réactifs dans la synthèse des SH (Stevenson, 1994). La minéralisation des sucres aminés et phosphatés (phytine et acides nucléiques) conduit au relargage de N et P pour le développement des plantes. Certains sucres pourraient stimuler la germination de graines et la croissance racinaire. Les polysaccharides affectent d'autres propriétés du sol : la capacité d'échange protonique et cationique (principalement due aux groupements carboxyliques COOH des acides uroniques), la rétention d'anions (due aux groupements NH₂ protonés), et enfin, l'activité biologique (e.g. source d'énergie pour les microorganismes). Généralement, les sucres neutres constituent la forme la plus abondante de carbone organique dans la solution de sol (Stevenson, 1994).

Dans certains sols saturés ou submergés la production de gomme et de mucilage microbien peut conduire à une chute de la perméabilité du milieu, du au colmatage des pores. Les propriétés hydrophobes de certains sables peuvent être en partie causées par les propriétés d'imperméabilisation du dépôt des gommages et mucilages.

3.3 Structure et classification

Les carbohydrates composent un des groupe majeur des molécules organiques naturelles. La formule chimique générale des oses est C_nH_{2n}O_n (pour les composés non oxydés -i.e. acides uroniques exclus-, et sans hétéroatomes -ni N, ni P-). Ils peuvent être divisés en trois sous classes :

1. **Les monosaccharides** : Aldéhydes et cétones dérivées d'alcools polyhydriques linéaires de 5 ou 6 carbones.
2. **Les oligosaccharides** : Polymères simples de carbohydrates comportant quelques unités répétitives, typiquement 2 à 5 monosaccharides (le terme ολιγος signifiant "peu" en grec).
3. **Les polysaccharides** : Polysaccharide comportant de nombreuses unités répétitives (ou monomères), donnant des produits à haut PM (typiquement plus de 10 monosaccharides).

Les structures des sucres peuvent être représentées de différentes manières, dont la forme linéaire (aldose ou cétose), qui utilise la projection de Fisher pour respecter les carbones asymétriques, et la forme cyclique, représentée par la projection de Haworth ou sa formule topologique. Les formes aldose et cyclique du glucose sont donnée en figure 3.1. La numérotation usuelle des carbones pour les hexoses est également donnée.

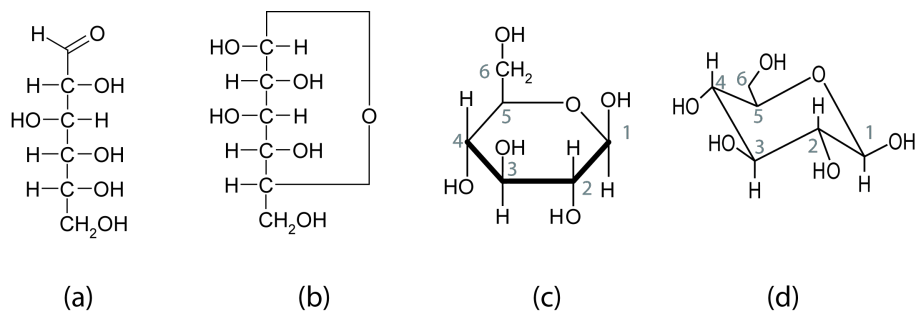


FIGURE 3.1 Le β -D-Glucose sous forme aldose (a) et cyclique (b),(c) et (d), en représentations de Fisher (a) et (b), projection de Haworth (c), et représentation topologique(d)

Les formes cycliques de certains hexoses et pentoses neutres communs sont présentés figure 3.2, ainsi que les structures d'acides uroniques et d'un sucre aminé fréquemment dosés dans les polysaccharides des sols. Les sucres cycliques à six centres sont également dénommés pyranoses, ceux à cinq centres par cycle appelés furanoses. Par la suite, nous utiliserons majoritairement la notation topologique pour représenter les structures chimiques des carbohydrates, sans représenter les atomes d'hydrogènes liés aux carbones (par soucis de clarté). La notation topologique est conçue pour donner une vision tridimensionnelle des molécules, elle est bien adaptée aux travaux de modélisation moléculaire (que nous aborderons dans la troisième partie du manuscrit).

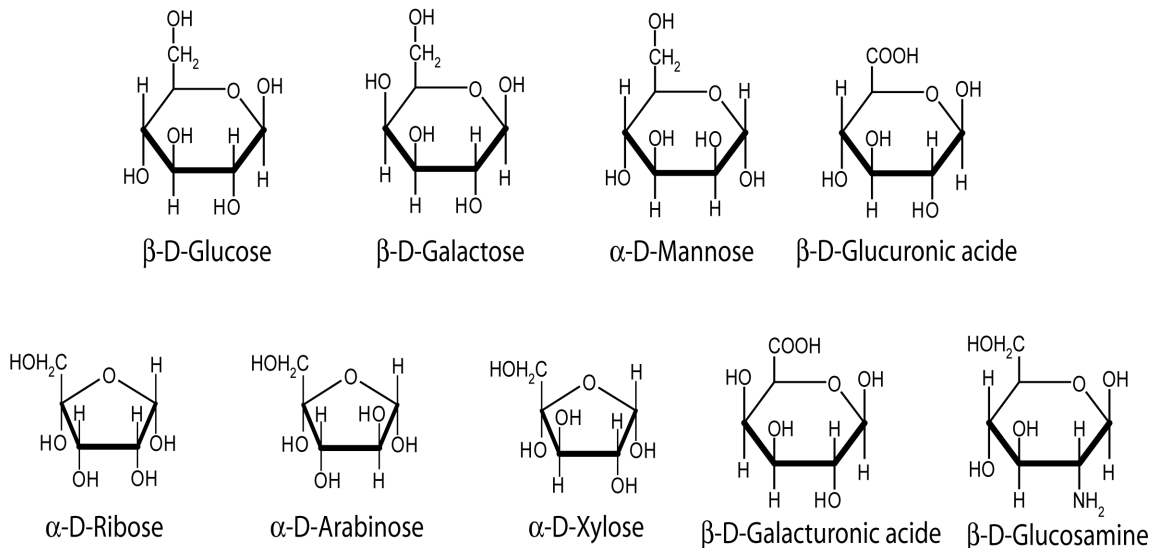


FIGURE 3.2 Structures chimiques de quelques sucres communs

L'anomérisation $\alpha \rightleftharpoons \beta$

Il est connu que les hexoses existent sous deux formes : l'anomère α ou β (cf. figure 3.3). Les anomères diffèrent par leur orientation du groupement hydroxyde porté sur le carbone numéro 1. Pour la représentation de la forme chaise donnée ci-dessous, l'anomère α est en position axiale -regardant vers le bas du cycle-, tandis que l'anomère β est en position équatoriale -regardant vers l'extérieur et pointé dans le demi espace supérieur défini par le plan moyen du cycle-. Pour un monosaccharide, l'anomère β est le plus stable. Le passage d'un anomère à l'autre s'effectue via le mécanisme de réarrangement sigmatropique présenté à la figure 3.3. La fonction éther-oxyde du cycle peut capter un proton en milieu acide afin de former le carbocation (3). Une rotation du groupement hydroxyde porté par le C₁, autour de l'axe de la liaison simple C₁-C₂ forme le carbocation (4). La cyclisation et l'éjection du proton conduisent enfin à l'anomère α .

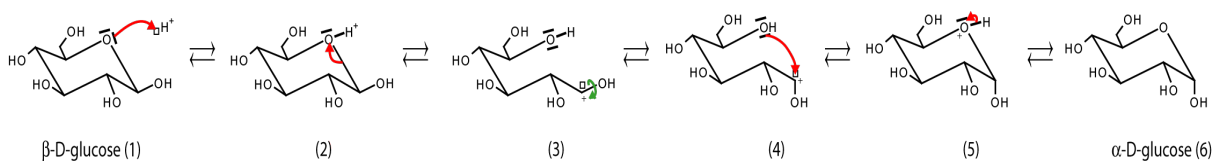


FIGURE 3.3 Anomérisation $\alpha \rightleftharpoons \beta$ du D-Glucose

Les transitions conformationnelles des hexoses

Les hexoses sont des cycles à six centres. Par analogie avec l'étude conformationnelle du cyclohexane, on peut décrire les transitions conformationnelles des monosaccharides. A titre d'exemple, la figure 3.4 présente les transitions conformationnelles du β -D-Glucose. La forme chaise étant la conformation de plus basse énergie, c'est sous cette forme que l'on représente les cycles des carbohydrates. Les problèmes conformationnels deviennent rapidement critiques sur les polysaccharides, où une meilleure stabilité de l'édifice polysaccharidique peut nécessiter une conformation moins favorable pour un des constituant monosaccharidique. Nous aborderons ces problèmes dans la dernière partie du manuscrit.

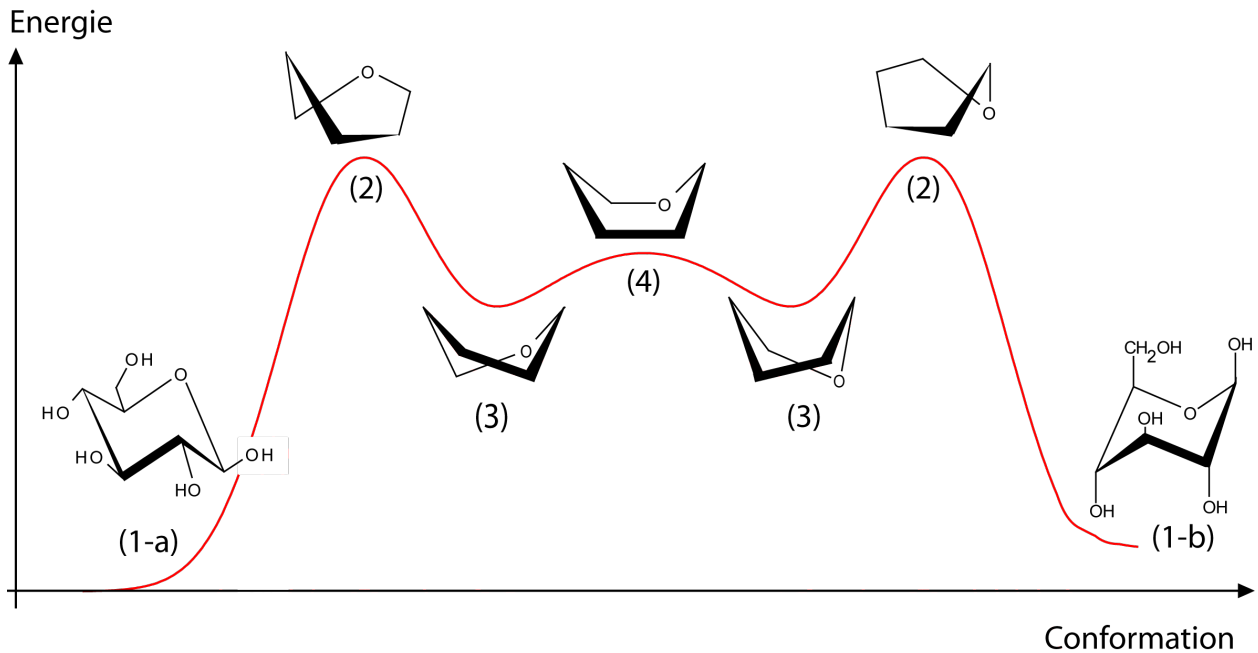


FIGURE 3.4 Transitions conformationnelles pour le β -D-Glucose. Formes chaises (1-a) et (1-b), formes enveloppes (2), bateaux croisés (3) et bateau (4). La forme la plus stable est la chaise (1-a), car tous les substituants sont alors en positions équatoriales

Origines des sucres dans les sols

La figure 3.5 présente des polysaccharides fréquents dans le monde végétal. La cellulose, principale composante des tissus des feuilles, est un polymère linéaire d'unité répétitive β -(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose ; l'amylose, qui est avec l'amilopectine un des principal constituant de l'amidon, est un polymère d'unité α -(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose ; l'acide polygalacturonic est constitué d'acide galacturonic liés en α -(1 \rightarrow 4), il s'agit d'une pectine, autre composante importante des parois végétales.

Alors que les polysaccharides d'origine végétale présentés à la figure 3.5 sont formés d'unités répétitives ayant un seul type de monosaccharide, de nombreux polysaccharides, incluant ceux d'origine microbienne, produisent des mixtures de monosaccharides et produits dérivés par hydrolyse. En vertu du nombre important de monosaccharides de différents types, ainsi que des différents manières d'arranger les liaisons glycosidiques (α ou β , 1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 6, 1 \rightarrow 3, etc.), il existe des variations infinies dans la structure des polysaccharides. La plupart des polysaccharides complexes synthétisés par les microbes ne sont constitués que de trois ou quatre monosaccharides différents. Des variations peuvent apparaître sur certains sucres en fonction de la souche bactérienne ayant produit le polysaccharide : méthylation, acétylation, présence de groupement pyruviques.

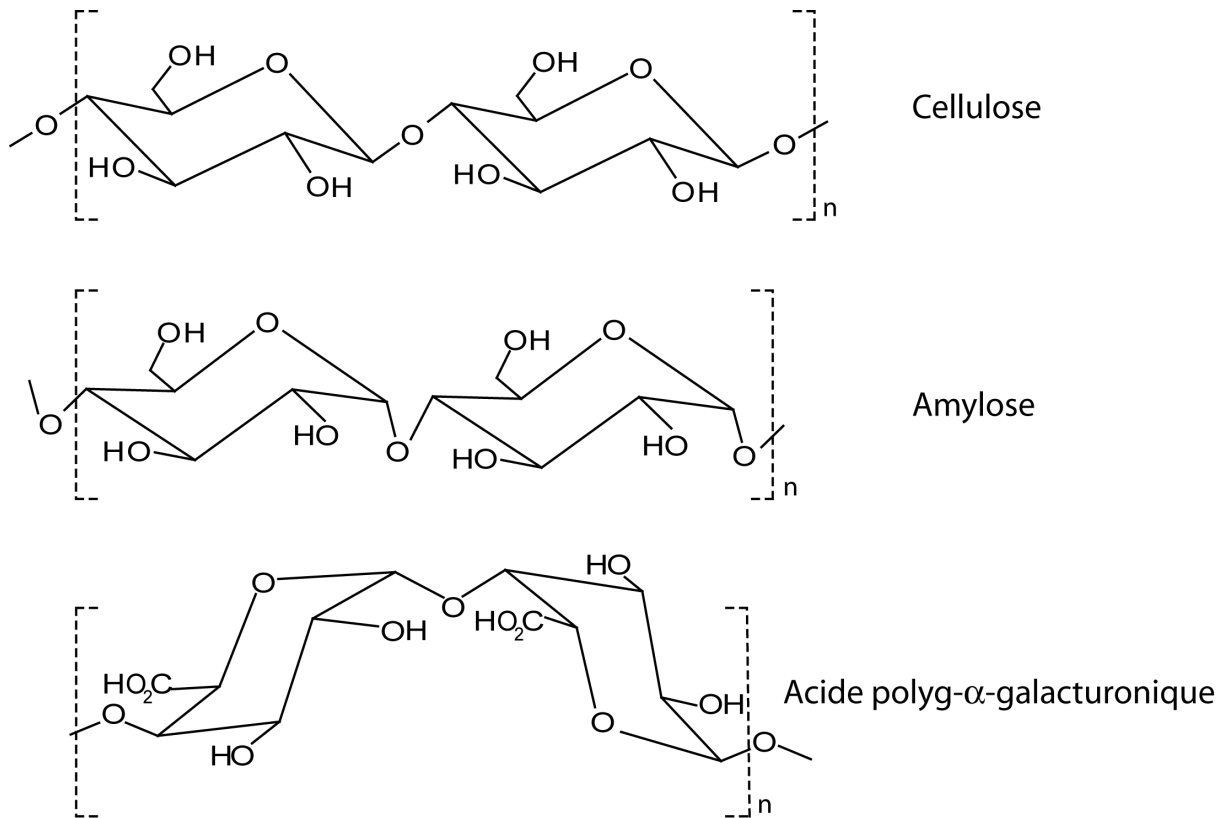


FIGURE 3.5 Structures chimiques des principaux polysaccharides d'origine végétale

Les polysaccharides bactériens apparaissent sous trois formes dans le sol :

1. Exopolysaccharides (EPS), ou polysaccharides extracellulaires.
2. Polysaccharides membranaires
3. Polysaccharides intracellulaires ou somatiques

Dans de nombreux cas, les polysaccharides sont liés à des constituants protéiques ou lipidiques. Les polysaccharides contenant des acides uroniques sont acides. Les figures 3.6 et 3.7 présentent des structures de polysaccharides bactériens.

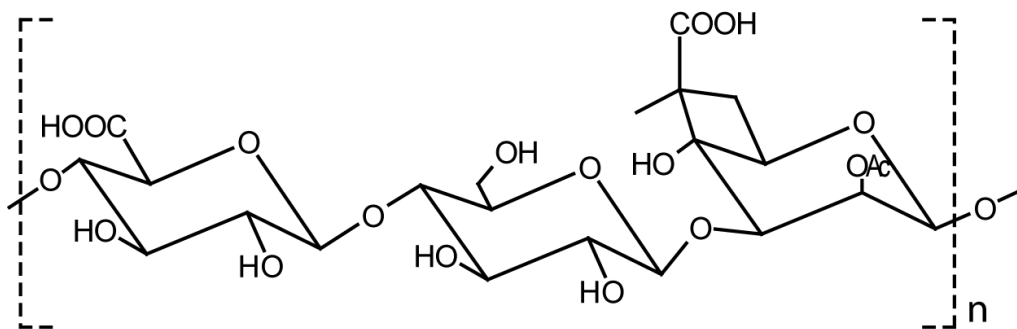


FIGURE 3.6 Structure chimique d'une unité répétitive du polysaccharide acide synthétisé par *Pseudomonas* strain Pf9, d'après Cescutti et al. (1995)

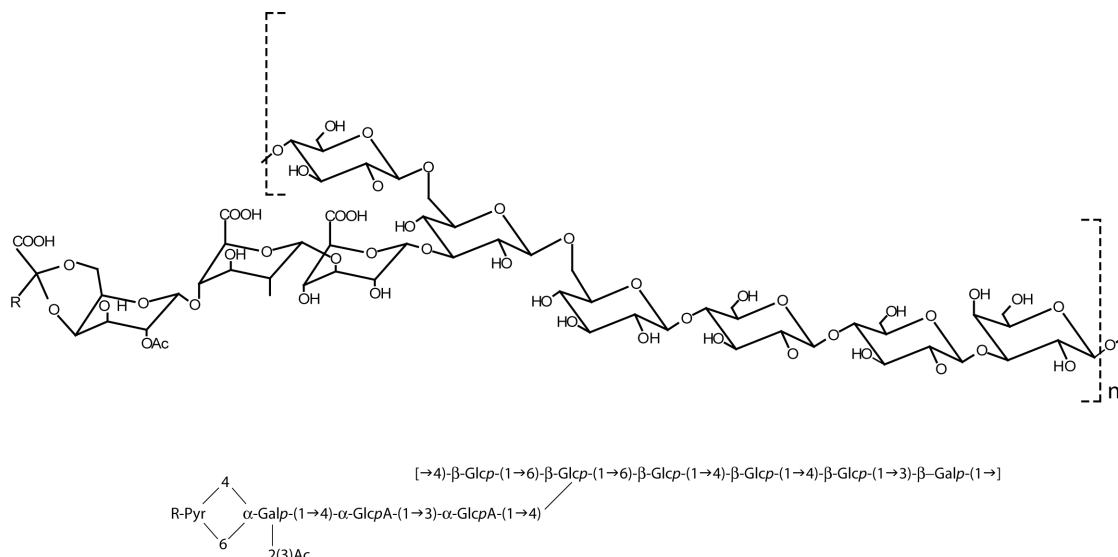


FIGURE 3.7 Structure chimique d'une unité répétitive du polysaccharide acide synthétisé par *Rhizobium* sp. strain ANU280 (NGR234), d'après Djordjevic et al. (1986). *Rhizobium* est une souche bactérienne symbiotique de la rhizosphère, capable de fixer l'azote.

3.4 Etat des sucres dans les sols

Dans les sols, les carbohydrates apparaissent sous trois formes :

1. Les sucres libres dans la DOM
2. Les polysaccharides complexes pouvant être extraits et séparés des autres constituants
3. Les polymères de formes et tailles variables fortement liés aux argiles ou aux colloïdes des substances humiques (ne pouvant donc pas être aisément séparés et purifiés).

La stabilité des polysaccharides est due à une combinaison de différents facteurs, comme leur complexité structurale, qui les rend résistants aux attaques enzymatiques, leur adsorption sur les argiles ou les surfaces d'oxydes métalliques, leur capacité à former des sels insolubles ou des complexes chélatants de cations polyvalents, ou encore leur tannage par les substances humiques (Stevenson, 1994). Dans ce dernier cas, les polysaccharides forment une partie intégrale des acides humiques ou fulviques, étant lié au reste des SH par des liaisons éthers (R_1COOR_2) ou d'autres liaisons covalentes. Les polysaccharides seraient mieux protégés lorsqu'ils se localisent dans les micropores des agrégats du sol (Adu and Oades, 1978).

Le débat reste ouvert, quant aux raisons de la stabilité des polysaccharides dans les sols. On trouve en particulier deux thèses. Martin (1971) postule que les polysaccharides du sol sont formés par recombinaison des unités monomérique dérivant des résidus végétaux et des polysaccharides microbiens, et qu'ainsi, les produits formés sont des structures plus complexes (e.g. des polymères présentant plusieurs chaînes latérales) et donc moins susceptible à la biodégradation. Pour Cheshire (1979), la stabilité des polysaccharides ne serait pas due à une molécule biologiquement stable, mais causée par des combinaisons chimiques, des complexes ou des propriétés d'insolubilités les rendant physiquement inaccessibles par l'activité enzymatique supposée les dégrader.

Dans les sols contenant des résidus de plantes partiellement décomposés, une partie des carbohydrates existe sous forme de cellulose, qui est le polysaccharide le plus abondant chez les végétaux supérieurs. Gupta (1967) estiment la cellulose en moyenne à 30% des carbohydrates du sol. Les sols riches en plantes contiennent également des concentrations assez élevées en pentoses tels que

l'arabinose et le xylose. Par des études au ^{14}C certains auteurs ont montré que la majorité des pentoses retrouvés dans les polysaccharides des sols, étaient d'origine végétale. Cet apport de sucres d'origine végétal, localisé dans les premiers centimètres du sol, ne suffit pas à totaliser la majorité des carbohydrates du sol. La plupart des carbohydrates du sol sont considérés d'origine microbienne [Stevenson \(1994\)](#).

3.4.1 Les sucres libres

Les sucres libres (monosaccharides) sont présents en si faible quantité dans les sols qu'ils ne peuvent seulement être détectés par des techniques microchimiques spécialisées. Ce n'est pas surprenant puisque les sucres simples sont facilement assimilés par les microorganismes. Les plus grandes concentrations de sucres libres se trouvent dans les litières de forêt en zone climatique froide. La quantité trouvée à un temps donné dans un sol minéral est le résultat d'un équilibre délicat entre synthèse et destruction par les microbes, influencées par les facteurs affectant l'activité microbienne (humidité, température, pH, apports énergétiques). Les méthodes d'extraction utilisées semblent influencer la quantité et la nature des sucres simples dosés dans les sols [Gupta \(1967\)](#).

Les sucres libres sont le plus souvent bien extraits des sols à l'eau ou à l'éthanol 80%. Les résidus de carbohydrates dissous dans l'eau, centrifugés et purifiés par différentes méthodes sont ensuite analysés par chromatographie (ou colorimétrie). [Gupta \(1967\)](#) reporte une grande variété de sucres simples pour différents sols minéraux ou organiques : glucose, galactose, fructose, arabinose, xylose, fucose et ribose.

3.4.2 Les polysaccharides complexes ou EPS

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, la majorité des polysaccharides des sols sont considérés comme provenant du métabolisme microbien. Cette thèse est soutenue par leur taux relativement faible en xylose et glucose (deux sucres particulièrement abondants dans les polysaccharides végétaux) et leur taux plus élevé en d'autres monosaccharides moins typiques du règne végétal ([Stevenson, 1994](#)). Certains sucres identifiés après hydrolyse de polysaccharides bruts du sol ne se retrouvent pas dans les végétaux supérieurs, mais sont des constituants communs des polysaccharides exocellulaires ou capsulaires des microorganismes. Par exemple, la chitine, un polysaccharide composé d'unité répétitive N-acetylglucosamine, est le principal composant des parois des cellules fongiques (cf. figure 3.8). D'autres structures de polysaccharides bactériens typiques ont déjà été présentées en figures 3.6 et 3.7.

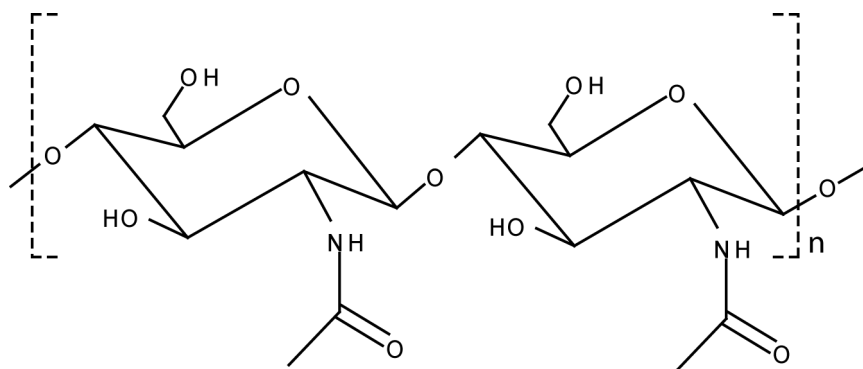


FIGURE 3.8 Motif répétitif de la chitine, polysaccharide microbien principal constituant des parois fongiques

3.4.3 Conséquences sur la réactivité des sucres dans les sols.

Les EPS bactériens, formant les sucres les plus représentés dans le sol, vont pouvoir contribuer à la réactivité de la MO, tandis que les sucres libres, présents à l'état de traces n'y contribuent pas (ou très peu). Une étude des structures des exopolysaccharides bactériens montre que ces entités présentent le plus souvent des groupements fonctionnels réactifs, en particulier des acides uroniques ($\approx\text{COOH}$) (cf. figures 3.6 et 3.7), en moindre proportion des sucres aminés ($\approx\text{NH}_2$) (Djordjevic et al., 1986; Cescutti et al., 1995; Zegelaar-Jaarsveld et al., 1996; Lefeber et al., 2002; Zhang and Kong, 2003). Les EPS fonctionnalisés vont donc contribuer à la réactivité de la MO du sol, puisqu'ils ont la capacité d'échanger des protons en fonction du pH. La capacité d'échange de proton ΔHs due aux EPS bactériens apparaît donc comme une connaissance nécessaire à la compréhension de la réactivité globale d'un sol. Afin de proposer une réponse à cette problématique, il convient de choisir un EPS bactérien modèle et d'évaluer sa réactivité aux protons et aux métaux. C'est dans ce contexte que nous allons définir notre système d'étude modèle Xanthane+Cu au chapitre 5 ; après avoir rappelé les bases concernant la complexation des ETM par la MO du sol au chapitre 4.

3.5 Ce qu'il faut retenir :

Les carbohydrates constituent 5 à 25% de la matière organique de la plupart des sols. Une grande diversité de sucres est représentée : dont les pentoses, les hexoses, les acides uroniques, les sucres aminés, les sucres désoxydés ou O-méthylés ou acétylés. La majorité des carbohydrates est sous forme de polysaccharide dans les sols, et les sucres simples se trouvent seulement à l'état de traces. Les polysaccharides du sol sont majoritairement produits par la biomasse microbienne, à l'exception de la litière où une part importante de polysaccharides d'origine végétale est présente. Les EPS bactériens des sols présentent généralement une densité importante de groupements fonctionnels réactifs sous forme d'acides uroniques et de sucres aminés. Ces sucres fonctionnalisés (acides uroniques et sucres aminés) représentent de 3 à 11% de la MO du sol. Il apparaît donc important d'estimer la réactivité de ces EPS lors de l'évaluation de la réactivité globale d'un sol.

Après avoir rappeler les bases sur les complexes MO-Métaux au chapitre suivant (chapitre 4), nous justifierons au chapitre 5 du modèle d'étude Xanthane+Cu choisi pour étudier la réactivité aux protons et aux métaux des EPS bactériens.

Chapitre 4

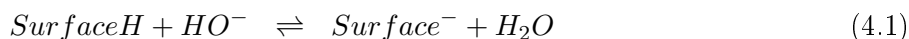
Mécanismes de rétention des ETM sur la MO du sol

4.1 Généralités

Les mécanismes de rétention des éléments traces métalliques (ETM) sur la matière organique (MO) sont nombreux. Ils incluent la complexation, la substitution, la précipitation, l'adsorption de surface et l'inclusion (également dénommé coprécipitation) (Manceau et al., 2002). Ces processus peuvent avoir lieu simultanément, rendant alors la description du phénomène difficile. Cela nécessite une approche multi-outils combinant des échelles d'observations différentes (potentiométrie, spectroscopies des rayons X -EXAFS, XANES-, modélisation moléculaire). La diversité des souches bactériennes utilisées, les conditions de préparation des échantillons et la nature de l'ETM considéré, différents d'une étude à l'autre, compliquent la comparaison des résultats (Fein, 2006). L'émergence des nouvelles techniques de spectroscopie depuis les années 1990, comme les spectroscopies infra rouge ou d'adsorption des rayons X (EXAFS) appliquées à des systèmes environnementaux ont permis de confirmer¹ que se sont majoritairement les groupements carboxyles ($\equiv\text{COOH}$), phosphates ($\equiv\text{POH}$), amines ($\equiv\text{NH}_2$) et hydroxyles ($\equiv\text{OH}$) qui sont impliqués dans la rétention des métaux sur les bactéries (Kelly et al., 2002; Boyanov et al., 2003; Leone et al., 2007). Dans une moindre mesure, Guine et al. (2006) ont mis en évidence l'importance des groupements $\equiv\text{SH}$ dans la rétention des ETM.

4.2 Définition du point de charge nulle

Les groupements fonctionnels de type $\equiv\text{COOH}$, $\equiv\text{POH}$, $\equiv\text{NH}_2$, $\equiv\text{OH}$ et $\equiv\text{SH}$ sont protiques, et peuvent donc réagir avec les ions hydroxydes et hydroniums en milieu aqueux. Les réactions de protonation/déprotonation peuvent être formalisées selon les équations suivantes :



Ces équilibres génèrent une charge surfacique négative ou positive selon le pH. Cette charge de surface, propre à chaque constituant de la MO, est accessible expérimentalement par des titrages

1. En effet, l'existence des groupements réactifs de surfaces avait été proposé préalablement par des études titrimétriques (Beveridge and Murray, 1980; Beveridge, 1989)

potentiométriques ou par la mesure de la mobilité électrophorétique (mesure de la vitesse des particules dans un champ électrique). Le pH pour lequel cette charge de surface est nulle est appelé le point de charge nulle et est noté pH_{PCN} ². Ce pH_{PCN} est d'un intérêt particulier, car il définit la limite entre la charge nette positive et la charge nette négative d'une surface.

Le pH_{PCN} est évalué expérimentalement sur les colloïdes minéraux (argiles, silicates, oxydes de fer, d'aluminium ou de manganèse, etc.) et bactériens. Le tableau 4.1 propose une synthèse des valeurs du pH_{PCN} pour différents substrats minéraux et organiques bactériens.

	Surface	pH_{PCN}	Source
Minéraux	MgO	12.4	Sigg 2000
	Calcite	8.5	Sigg 2000
	α -FeOOH (goethite)	8	Sigg 2000
	kaolinite (argile)	4.6	Sigg 2000
	SiOH	2-3	Sigg 2000
Bactéries libres	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1.8	Heinrich 2008
	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	2.8	Heinrich 2008
	<i>Lysteria monocytognes</i>	$\text{pH}_{PCN} < 2$	Chavant 2002
Biofilm ou bactéries âgées ^a	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	4.5	Heinrich 2008
	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	3.8	Heinrich 2008
	<i>Pseudomonas putida</i>	2.5-3.8	Muris 2004

^aOn désigne par "bactéries âgées" des cultures liquides prélevées 24h après la phase de croissance exponentielle, et donc riches en substances extracellulaires

TABLE 4.1 pH du point de charge nul (pH_{PCN}) pour différentes surfaces environnementales : solides minéraux, bactéries libres et biofilms. D'après Sigg et al. (2000); Chavant et al. (2002); Muris (2004); Heinrich et al. (2008)

Pour les minéraux, le pH_{PCN} est très variable selon le minéral étudié : il peut varier de $\text{pH}_{PCN}=2$ pour la silice à $\text{pH}_{PCN}=12$ pour les oxydes de manganèses ((Sigg et al., 2000), cf. tableau 4.1).

Pour les colloïdes bactériens, le pH_{PCN} est systématiquement acide, et donc parfois difficile à évaluer (car inférieur à 2) (Chavant et al., 2002; Heinrich et al., 2008)³ (cf. tableau 4.1). La conséquence directe de ce bas pH_{PCN} pour les colloïdes bactériens est que la surface des colloïdes bactériens reste négativement chargée sur une grande gamme de pH (pour $\text{pH} > \text{pH}_{PCN} \approx 2$). Pour Chavant et al. (2002), le bas pH_{PCN} chez les bactéries libres est en accord avec le fait que la densité de sites acides (carboxyliques et phosphomonoesters) est beaucoup plus importante que la densité de sites neutres et basiques (cf. Borrok et al. (2005); Johnson et al. (2007) pour qui les rapports [sites acides]/[sites totaux] valent respectivement 62% et 43%).

Cette tendance au pH_{PCN} est moins prononcée pour les biofilms, qui ont un pH_{PCN} acide de l'ordre de 4 à 4.5 (cf. tableau 4.1). Qualitativement, l'augmentation du pH_{PCN} dans le biofilm par rapport aux bactéries libres peut être vue comme une diminution relative des groupements de surface

2. En réalité la mobilité électrophorétique donne accès au point isoélectrique (noté *pie*) qui diffère du pH_{PCN} du fait de l'adsorption spécifique des cations ou anions à la surface réactive. En l'absence d'anions ou cations ou d'autres impuretés (cas d'un titrage acide/base sans métaux), le pH_{PCN} est égal au *pie*

3. C'est pour cette raison - pH_{PCN} très acide difficile à évaluer- que les courbes de titrages acide/base de bactéries sont reproductibles à un paramètre de calage près : H_0 , correspondant à l'état de protonation initial du système (en début de titrage) qui reste difficilement évaluable.

ayant un bas pK (e.g. groupements carboxyliques et phosphomonoesters) au profit de groupements ayant un pK plus neutre (e.g. groupes phosphodiesters, amines). Cette vision serait d'ailleurs en accord avec la thèse de [Matsukawa and Greenberg \(2004\)](#) soutenant que le biofilm augmente sa composition en acides nucléiques et protéines (riches en groupements non acides) par fixation sur la matrice d'EPS (riches en groupements acides). Quoiqu'il en soit, **la matière organique d'origine bactérienne est généralement considérée comme ayant une charge de surface négative**, dans la gamme des pH environnementaux (i.e. $4 < \text{pH} < 10$). Par conséquent, les surfaces d'origines bactériennes (les bactéries libres et les biofilms) vont être particulièrement efficaces dans la rétention des éléments traces positivement chargés. La figure 4.1 propose une comparaison de la charge de surface pour la souche bactérienne *Geobacillus stearothermophilus* juvénile et âgée (i.e. respectivement à l'état de bactéries libres ou entourées de substances extracellulaires). Cette figure illustre la différence de comportement en terme de charge de surface bactérie libre v.s. biofilm, et met en évidence que les substrats bactériens sont généralement négativement chargés pour les $\text{pH} > 4$.

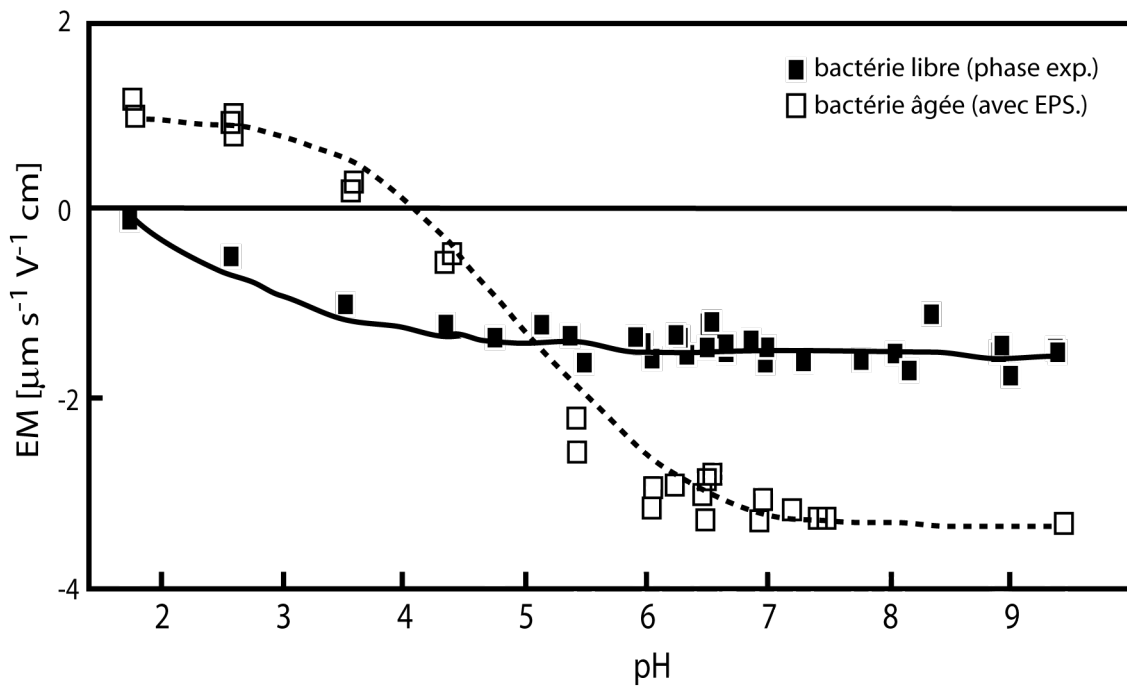


FIGURE 4.1 Mobilité électrophorétique (EM) de la souche bactérienne *Geobacillus stearothermophilus* à l'état juvénile (phase exponentielle de croissance) ou âgée après 24h en phase plateau (et donc comportant des substances extracellulaires), d'après [Heinrich et al. \(2008\)](#). Données expérimentales (carrés) collectées pour $FI = 0.1M$ en $NaNO_3$ et modèles associés (lignes). Le pH_{PCN} est respectivement de 1.8 et 4.5 pour les bactéries jeunes et âgées. La charge de surface des deux substrats bactériens est négative pour les $\text{pH} > pH_{PCN}$

Nous allons voir que les cations métalliques ont une grande affinité avec les surfaces négativement chargées de la MO d'origine bactérienne. Cette tendance se généralise bien aux autres composantes de la MO du sol, mais notre propos n'est pas ici de justifier cette tendance sur les autres substances que les substrats bactériens.

4.3 Les trois grands mécanismes de rétention des ETM sur la MO

Si l'on exclue les mécanismes de pénétration des ions à l'intérieur de la phase solide (e.g. inclusion dans le solide, bioaccumulation intracellulaire), les trois principaux mécanismes de rétention des métaux par une surface réactive sont :

1. L'échange d'ions en sphère externe (ou complexation en sphère externe)
2. La complexation en sphère interne
3. La précipitation de surface

Avant de détailler ces trois mécanismes, il paraît important de rappeler la définition de la sphère d'hydratation.

L'atome d'oxygène d'une molécule d'eau, de part sont caractère électronégatif, constitue le pôle négatif du dipôle électrique créé par la molécule d'eau. Il va chercher à partager ses deux doublets non-liants d'électrons avec des atomes électrophiles comme les cations métalliques des ETM. Ainsi, en milieu aqueux, il se forme une liaison faible entre le cation métallique et l'atome d'oxygène de la molécule d'eau. Chaque cation métallique d'ETM va se retrouver entouré de plusieurs molécules d'eau pointant leur atome d'oxygène en direction du centre métallique : c'est la sphère d'hydratation (cf. figure 4.2). Elle est généralement formée de six molécules d'eau pour les ETM monovalents et divalents (géométrie octaédrique), et de huit molécules d'eau pour les cations trivalents (Limousin, 2007). Dans certains cas, le débat reste ouvert quant au nombre de molécules d'eau coordonnant un cation métallique. Burgess (1988) donne ainsi une coordination octaédrique distordu par l'effet Jahn Teller (Garcia, 1989) pour l'ion Cu^{2+} dans l'eau alors que Benfatto et al. (2002) (par étude EXAFS) attribue au Cuivre (II) une sphère d'hydratation constituée de cinq molécules d'eau. Nous reviendrons sur la notion de sphère d'hydratation dans la dernière partie de ce manuscrit, lors de l'étude de nos résultats EXAFS et modélisation moléculaire.

4.3.1 L'échange d'ions en sphère externe

L'échange d'ions en sphère externe (ou physisorption) est attribuable à l'effet électrostatique qui attire les charges positives (cations métalliques et sa sphère d'hydratation) à la surface réactive chargée négativement. Dans ce processus, les ETM adsorbés conservent totalement leur sphère d'hydratation, sont retenus électrostatiquement par la surface réactive (cf. figure 4.2). Il s'agit donc de liaisons purement électrostatiques avec formation de paires d'ions (anion/cation), les molécules d'eau de la couche de solvation restant autour des ions sorbés. Plusieurs couches d'atomes ou de molécules peuvent être nécessaires pour écranter la charge de surface. Ces complexes de sphère externe sont facilement échangeables (Sigg et al., 2000).

4.3.2 La complexation en sphère interne

La complexation en sphère interne (ou chimisorption) met en jeu la création de liaisons chimiques, directement entre le cation métallique et la surface réactive, sans molécule d'eau interposée. La sphère d'hydratation du cation métallique et la couche d'hydratation de surface sont modifiées pour établir le complexe de sphère interne, via un partage de liaison covalente surface-métal suite au départ d'au moins une des molécule d'eau de la couche d'hydratation de l'ion sorbé (cf. figure 4.2). Ces complexes sont plus difficilement échangeables (Sigg et al., 2000).

La chimie des solutions décrits les complexes de sphères interne par des constantes d'équilibre thermodynamique. Le ligand se lie au cation métallique en créant une (ou des) liaison(s) de coordination pour former une entité dénommée complexe. Si le ligand fournit les deux électrons nécessaires

à la formation de la (des) liaison(s) chimique(s), ce qui est le cas lors de la complexation d'un cation métallique, on parle de liaison dative.

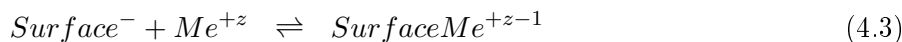
4.3.3 La précipitation de surface

L'attraction d'un ion vers une surface réactive entraîne une augmentation locale de sa concentration au voisinage de la surface. Si cette concentration locale dépasse le produit d'activité ionique de précipitation (K_s), une nouvelle phase minérale précipite à la surface du solide, alors même que le K_s n'est pas atteint loin de la phase solide. Ce processus s'appelle la précipitation de surface (cf. figure 4.2) [Dzombak and Morel \(1990\)](#). C'est un mécanisme lent, d'une durée comprise entre quelques heures et plusieurs mois. Il n'est généralement pas pris en compte dans les modèles de spéciation géochimique.

4.4 Constantes de complexations typiques MO-Métaux

4.4.1 Formalisme de la complexation en solution aqueuse

Au niveau de l'analyse en chimie aqueuse, la question de la sorption des métaux se résume à déterminer la phase de l'espèce métallique, i.e. le cation est-il toujours dissout dans la phase aqueuse ou bien a-t-il quitté cette phase au profit de la phase solide (complexation de surface)? Cette définition, proposée par [Sposito \(1989\)](#) ne précise pas la nature de la réaction entre le métal sorbé et la surface réactive. En réalité, l'hypothèse initiale est la complexation de surface en sphère interne. Pourtant, rien ne permet d'affirmer *a priori* qu'il s'agisse du mécanisme de complexation prépondérant. La complexation réelle est probablement l'addition des différents phénomènes (complexation en sphère interne et sphère externe), et seuls des outils spectroscopiques de pointe (EXAFS) permettant d'établir l'existence et la longueur des liaisons chimiques entre les centres métalliques et les ligands peuvent permettre de valider l'une ou l'autre des hypothèses. Ce débat théorique peut être important dans la compréhension des phénomènes d'adsorption de surface, et peut éventuellement expliquer la différence de force de complexation entre deux substrats. Quoiqu'il en soit, même si la nature de la complexation n'est pas toujours connue, on pourra tout de même utiliser le formalisme de la chimie des solutions pour modéliser la complexation : l'équilibre thermodynamique et sa constante associée. Dans le cas d'une stœchiométrie équimolaire dans la formation d'un complexe monodentate, le formalisme suivant peut être employé :



La constante thermodynamique d'équilibre est alors définie par :

$$K_{Me} = \frac{[SurfaceMe^{+z-1}]}{[Surface^-] * a(Me^{+z})} \quad et \quad pK_{Me} = -LogK_{Me} \quad (4.4)$$

avec $a(Me^{+z})$ l'activité des cations métalliques et $[SurfaceMe^{+z-1}]$ et $[Surface^-]$ les concentrations en sites de surface occupés et libres.

4.4.2 Condition préalable aux comparaisons des constantes thermodynamiques

Il paraît alors intéressant de comparer la force des ligands de la matière organique, en comparant la valeur de leur $LogK_{Me}$. Avant de comparer les valeurs de $LogK_{Me}$ il est nécessaire de rappeler que cette comparaison n'a de sens que lorsque la spéciation prépondérante de l'ETM est celle du cation libre Me^{+z} ; c'est à dire que le pH auquel on travaille n'a pas engendré l'hydrolyse du métal par la

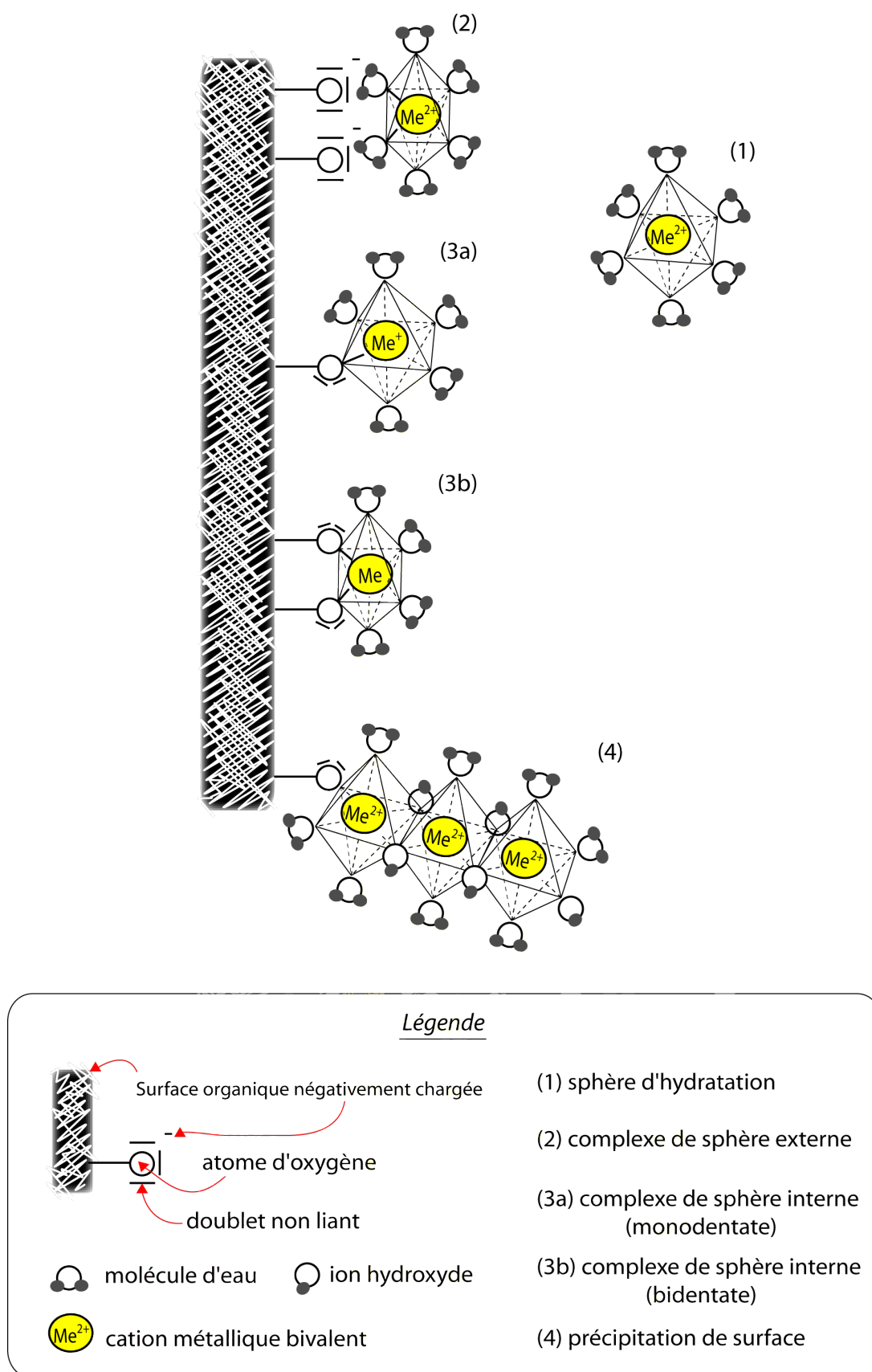


FIGURE 4.2 Schématisation des principaux mécanismes d'adsorption d'un cation métallique bivalent hexacoordonné sur les surfaces organiques négativement chargées en solution, d'après Sigg et al. (2000)

formation d'hydroxydes : $\text{Me}(\text{OH})^{+z-1}$, $\text{Me}(\text{OH})_2^{+z-2}$, ... En pratique, ces limites de solubilités sont évaluées pour chaque expérience, et dépendent du pH ainsi que de la concentration en métal. D'une manière général, pour les métaux caractéristiques des pollutions urbaines (Zn, Pb, Cd, Cu), et pour des concentrations totales en métal inférieures à 1mM, on n'observe pas d'hydrolyse pour les $\text{pH} < 6$, sauf dans le cas du Pb qui reste l'élément le moins soluble.

4.4.3 Constantes de complexation ligands organiques-métaux

Les tableaux 4.2 et 4.3 proposent une synthèse des constantes thermodynamiques de complexation des métaux caractéristiques des pollutions urbaines (Zinc, Cadmium et Cuivre) sur des ligands organiques simples ou des substrats organiques : SH, bactéries, biofilm. Plus la valeur de cette constante sera élevée, moins le métal sera susceptible d'être présent sous forme libre (Me^{+z}) en solution. La détermination de ces constantes thermodynamiques est essentielle pour l'évaluation de la spéciation des polluants. La spéciation couplée au modèle de transferts permet de prédire le transport des polluants. Ils pourront se trouver dissouts dans la phase aqueuse, ou complexés à des colloïdes mobiles ou immobiles, ou encore complexés à la matrice solide immobile. Le tableau 4.2 montre que l'affinité des ligands organiques simples pour les métaux augmente selon le sens :

$$\text{LogK}_{\text{Me-acides carboxyliques}} < \text{LogK}_{\text{Me-groupements phosphatés}} < \text{LogK}_{\text{Me-groupements aminés}}$$

Les ligands chélatants sont des ligands présentant plusieurs groupements complexants sur une même molécule. Ils peuvent donc créer plusieurs liaisons datives avec le centre métallique. Un ligand chélatant a une plus grande constante de complexation des métaux que les ligands simples ne présentant qu'un site de fixation des ETM par molécule (cf. tableau 4.2). Dans le cas de la présence de deux sites complexants aux extrémités d'une même molécule, l'organisation du complexe peut être cyclique. Les cycles à 5 ou 6 centres sont favorisés thermodynamiquement, puis plus la taille du cycle augmente, moins l'effet chélatant est observé (cf. figure 4.3). Pour une chaîne infiniment longue comportant à ses deux extrémités un site de fixation métallique, la probabilité de fermeture du cycle sur lui même devient de plus en plus faible. En pratique, pour les acides dicarboxyliques linéaires, l'effet chélatant est maximal pour l'oxalate et le malonate qui forment des cycles à 5 ou 6 centres avec les cations métalliques et les oxygènes des carboxyles impliqués dans la complexation (Guine et al., 2007), et il n'est pratiquement plus observé pour des longueurs de chaîne carbonées de plus de 6 carbones conduisant à des cycles improbables de 9 atomes (cf. figure 4.3 et tableau 4.2).

$$\text{LogK}_{\text{Me-ligand simple}} < \text{LogK}_{\text{Me-ligand chélatant}}$$

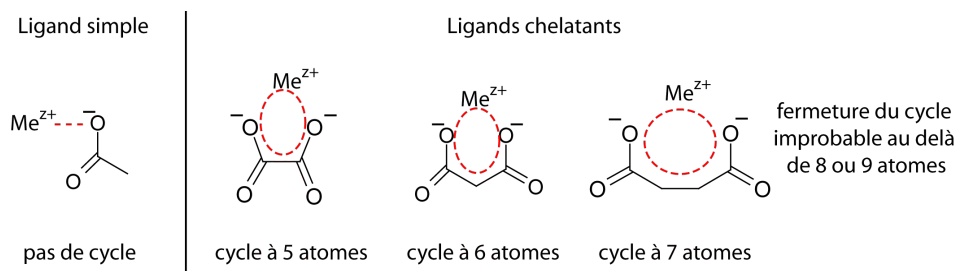


FIGURE 4.3 Maximisation de l'effet chélatant pour les complexes formant des cycles à 5 ou 6 atomes.

Ligand	Structure chimique	Stoechiométrie	Log $K_{Me-Ligand\ organique}$ (I=0.1 ou indiqué sinon)				
			Zn	Cd	Cu		
Lignads SIMPLES	Acide méthanoïque (formique)		HL / M+L=ML	1.01	1.15 (I=0.5)	1.61	
	Acide éthanoïque (acétique)		HL / M+L=ML	1.07	1.52	1.79	
	Acide propanoïque		HL / M+L=ML	1.01	1.19 (I=1)	1.91	
	Acide butanoïque		HL / M+L=ML	1	1.25 (I=2)	1.7 (I=2); 2.14 (I=0)	
	Acide pyruvique		HL / M+L=ML	1.26 (I=0.5)	0.78 (I=1)	1.64	
	Acide glucuronique		HL / M+L=ML	ND	1.1 (I=1)	1.44 (I=0.5)	
	Acide galacturonique		HL / M+L=ML	ND	1.15 (I=1)	1.8 (I=0.5)	
	Acide benzoïque		HL / M+L=ML	0.9	1.4	1.6	
	Acide Phosphorique	H_3PO_4	H3L / M+HL=MHL	2.46	2.85	3.27	
	Butyl phosphate (3759)		H2L / M+L=ML	2.3	2.61	3.12	
	Phenyl phosphate (3760)		H2L / M+L=ML	2.11	2.38	2.69	
	Acetyl phosphate (3772)		H2L / M+L=ML	2.04	2.18	2.86	
	Ammoniaque	NH_3	L / M+L=ML	2.31	2.56	4.08	
	Ethanolamine (1319)		L / M+L=ML	2.41	2.65 (I=2)	4.5	
	Cytosine (51555)		L / M+L=ML	ND	ND	1.7	
	Lignads CHELATANTS	Phenol (3806)		HL / M+L=ML	ND	ND	4.48
		Acide oxalique		H2L / M+L=ML	4	2.65 (I=1); 3.89 (I=0)	4.85
Acide malonique			H2L / M+L=ML	2.91	2.58	5.04	
Acide glutarique			H2L / M+L=ML	1.64	2	2.37	
Acide pimélique			H2L / M+L=ML	1.3	1.8	2.2	
Hydrogen diphosphate		$H_2PO_3-O-PO_3H_2$	H4L / M+L=ML	8.7 (I=0)	8.7 (I=0); 6.15 (I=1)	7.3	
Butyl diphosphate			H3L / M+L=ML	4.4	4.51	5.59	
Phenyl diphosphate			H3L / M+L=ML	4.06	4.21	5.17	
Ethylène diamine		$H_2N-CH_2-CH_2-NH_2$	L / M+L=ML	5.69	5.4	10.49	
2-Méthylène-1,3-propylènediamine			L / M+L=ML	4.63 (I=0.5)	4.32 (I=0.5)	9.27 (I=0.5)	

TABLE 4.2 Constantes thermodynamiques de complexation des cations métalliques par des ligands organiques simples, d'après *Martell and Smith (2004)*. Avec L=Ligand, H=hydrogènes, M=cation métallique et I=Force Ionique.

4.4.4 Constantes de complexation MO-métaux

Les études des réactions MO-métaux ont été explorées très tôt, tant sur la matière humique (Gamble et al., 1970) que sur les substances extracellulaires bactérienne (Brown and Lester, 1979). Le tableau 4.3 présente les constantes de complexations par les principaux constituants de la MO du sol (bactéries, biofilms, substances humiques). Les constantes de complexation des métaux par la MO sont supérieures à celles des ligands simples. Elles sont plus proches des constantes des ligands chélatants. Est-ce que les surfaces de la MO présentent des groupements chélatants, ou s'agit-il de la proximité de deux sites différents jouant le même rôle qu'un chélatant ? Cette question est étudiée depuis une quinzaine d'année par spectroscopie EXAFS. D'autre part, il est très remarquable de voir que quelque soit la MO étudiée (bactérie, biofilm, SH, boues activées), les constantes de complexation des cations métalliques sur les sites acides et neutres de la MO sont du même ordre de grandeur :

$$3 < \text{LogK}_{Me-MO} < 5$$

Les constantes de complexation par les sites basiques des bactéries peuvent être très importantes (jusqu'à $\text{LogK}_{Cu-Bacillus\ licheniformis} = 9.1$ d'après Daughney and Fein (1998)) mais en pratique, ces sites aminés interviennent peu dans la complexation des métaux du fait de l'hydrolyse des cations métalliques prépondérante à pH basique.

La synthèse des résultats proposés met également clairement en évidence la grande affinité du cuivre avec la matière organique. En effet, pour tous les ligands organiques proposés, les constantes de complexation du cuivre sont toujours supérieures à celles du zinc ou du cadmium :

$$\text{LogK}_{Cu-MO} > \text{LogK}_{Cd-MO} > \text{LogK}_{Zn-MO}$$

De la même manière que Borrok et al. (2005) a introduit un modèle universel pour la réactivité des bactéries aux protons, Fein et al. (2001) a proposé une méthode permettant d'évaluer les constantes de liaison métal/bactérie par une corrélation linéaire entre $\text{LogK}_{Me-acetate}$ et $\text{LogK}_{Me-bacterie}$. Les résultats récents de Johnson et al. (2007) (cf. figure 4.4) valident cette méthode sur trois autres souches bactériennes. Ces études permettent en particulier d'établir des relations entre des constantes bien connues de la littérature (ligand Acétate + cation métallique) et les données expérimentales des constantes bactéries + cations métalliques. Les relations trouvées permettent de valider les extrapolations de ces données expérimentales, et ainsi d'estimer l'adsorption entre une souche bactérienne et un métal non encore étudié.

Johnson et al. (2007) précise même la corrélation linéaire liant $\text{LogK}_{Me-acetate}$ et $\text{LogK}_{Me-bacterie}$ (cf. figure 4.4) pour les différents sites réactifs bactériens. D'une manière plus générale, nos synthèses de données des tableaux 4.2 et 4.3 permettent d'établir une règle générale : les valeurs des constantes de complexation par les substrats bactériens sont toujours supérieures d'au moins 1 à 2 ordre de grandeurs que les constantes des ligands simples :

$$\text{LogK}_{Me-bacterie} \geq \text{LogK}_{Me-ligand\ simple} + 1 \text{ (ou } +2)$$

4.4.5 Contribution des EPS à l'augmentation de réactivité des substrats bactériens ?

Guine et al. (2006) ont montré que la densité théorique de site à la surface des bactéries n'était pas assez importante pour expliquer les importantes quantités de métaux (Zn) adsorbées par trois souches bactériennes à gram négatif. Ces auteurs suggèrent que cette réactivité augmentée de complexation des métaux peut être due aux EPS bactériens. D'autre part Guine et al. (2007); Ngwenya (2007)

Ligand	Log K_{Me-MO}^*			Source	FI		
	Zn	Cd	Cu				
Bactéries libres	bactéries isolées de rivière	2.6	3.1	3.8	Johnson 2007	c	
	bactéries isolées de sol forestier	2.8	3.4	3.9	Johnson 2007	c	
	bactéries isolées de sol agricole	3.5	4.3	5.5	Johnson 2007	c	
	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	siteCOOH	2.2	3.6	ND	Guine 2007	a
		sitePOH	4.2	4.7	ND	Guine 2006	a
		siteNH ₂	5.6	5	ND	Guine 2006	a
	<i>Escherichia coli</i>	siteCOOH	3.3	ND	ND	Guine 2006	a
		sitePOH	5.3	ND	ND	Guine 2006	a
		siteNH ₂	6.5	ND	ND	Guine 2006	a
	<i>Pseudomonas putida</i>	siteCOOH	2.2	ND	ND	Muris 2004	b
		sitePOH	4.6	ND	ND	Muris 2004	b
		siteNH ₂	5.6	ND	ND	Muris 2004	b
	<i>Rhodococcus erutropolis</i>	siteCOOH	1.9	2.2	ND	Plette 1995 et 1996	b
		sitePOH	4.1	4.2	ND	Plette 1995 et 1996	b
	<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	siteCOOH	3.3	ND	4.4	Ngwenya 2003	b
		sitePOH	5.1	ND	6.0	Ngwenya 2003	b,c
	<i>Bacillus subtilis</i>	siteCOOH	3.9 (Pb)	3.2	3.8	Daughney & Fein 1998	b,c
			3.4 (Pb)	3.4	ND	Fein 2001; Yee & Fein 2001	b,c
		sitePOH	5.6 (Pb)	4.5	3.8	Daughney & Fein 1998	b,c
			4.9 (Pb)	5.4	ND	Fein 2001; Yee & Fein 2001	b,c
<i>Bacillus licheniformis</i>	siteROH	8.1 (Pb)	7.0	8.4	Daughney & Fein 1998	b,c	
		4.5	4.1	4.8	Daughney & Fein 1998	b,c	
	siteCOOH	4.5	3.9	4.8	Fein 2001; Yee & Fein 2001	b,c	
		7.3	6.5	7.1	Daughney & Fein 1998	b,c	
Biofilm	<i>Pseudomonas putida</i>	sitePOH	7.3	4.4	Fein 2001; Yee & Fein 2001	b,c	
		siteROH	8.5	8	9.1	Daughney & Fein 1998	b,c
Boues actives**	<i>Pseudomonas putida</i>	siteCOOH	4.6	ND	ND	Muris 2004	b
		sitePOH	5.6	ND	ND	Muris 2004	b
		A	3.3 (Pb)	4.2	3.5	Guibaud2003	c
		B	4.1 (Pb)	4.6	4.4	Guibaud2003	c
		C	3.8 (Pb)	4.3	3.8	Guibaud2003	c
		D	3.2 (Pb)	4.3	3.4	Guibaud2003	c
		E	3.3 (Pb)	4.1	3.3	Guibaud2003	c
Substances Humiques	HA	siteCOOH	ND	ND	2.5	Matynia2009	c
		FA	siteCOOH	ND	ND	3.8	Matynia2009

* dans le cas d'une stoechiométrie apparente $M + L = ML$ et d'un modèle non électrostatique, par soucis de comparaison des constantes

** Les boues actives peuvent être considérées comme un mélange de biofilms et de substance humiques, puisqu'on y dose EPS, protéines, Acides Nucléiques et acides humiques.

^a: constantes recalculées pour FI = 0 M

^b: constantes apparentes pour FI = 0.01 M

^c: constantes apparentes pour FI = 0.1 M

TABLE 4.3 Constantes thermodynamiques de complexation des cations métalliques par des constituants de la MO du sol : SH, bactéries, biofilm. D'après : Plette et al. (1995, 1996); Daughney and Fein (1998); Fein et al. (2001); Yee and Fein (2001); Guibaud et al. (2003); Ngwenya et al. (2003); Muris (2004); Comte et al. (2006); Guine et al. (2006, 2007); Johnson et al. (2007); Matynia et al. (2009)

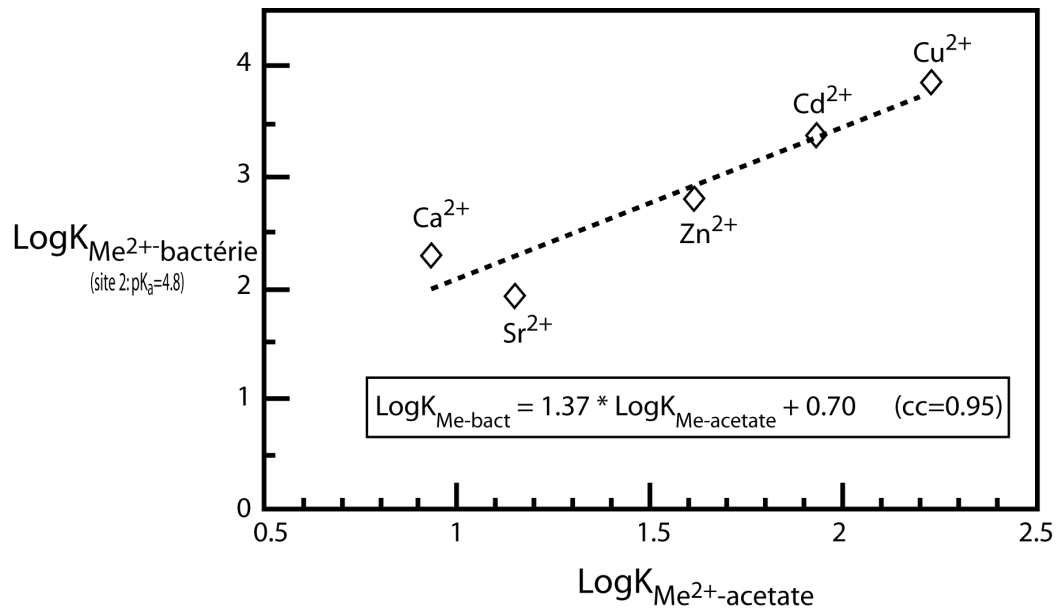


FIGURE 4.4 Corrélation linéaire entre les valeurs des $\log K_{Me-acetate}$ et $\log K_{Me-bactérie}$, pour un consortium de bactéries extraites de rivières, de sols forestiers et de sols cultivés, d'après *Johnson et al. (2007)*

ont montré que les bactéries âgées ou mortes (connues pour avoir une plus importante part de matrice extracellulaire par rapports aux bactéries en phase de croissance exponentielle) sont plus réactives aux métaux lourds : elles complexent plus de métal que les souches juvéniles. Est-ce que cette réactivité augmentée de complexation des métaux peut être due aux EPS bactériens ?

C'est cette question scientifique que nous proposons d'aborder, à travers un système d'étude modèle entre un exopolysaccharide bactérien, le xanthane, et un cation métallique de référence : Cu^{2+} . Le chapitre suivant détaillera le choix de ce système d'étude modèle.

4.5 Ce qu'il faut retenir :

La MO du sol, et plus particulièrement les substrats bactériens, ont la propriété d'adsorber des cations métalliques à leur surface. Cette capacité de sorption est notamment due à leur propriétés de charge de surface : les bactéries libres possèdent un charge de surface négative pour les $\text{pH} > \text{pH}_{PCN} \approx 2$, et les biofilms ou les bactéries âgées (entourées de leur gangue de substances extracellulaires) possèdent également une charge de surface négative, mais pour des $\text{pH} > \text{pH}_{PCN} \approx 4$. Les substrats bactériens sont donc négativement chargés sur la gamme de pH environnementale ($4 < \text{pH} < 10$). Du fait de cette charge surfacique négative, la complexation des cations métalliques va être particulièrement efficace sur les substrats bactériens. Théoriquement, la complexation des métaux sur les surfaces de la MO peut s'effectuer selon différentes voies : i) l'échange d'ions en sphère externe, ii) la complexation en sphère interne, iii) la précipitation de surface. Le formalisme utilisé en chimie des solutions aqueuse, mettant en jeu les constantes thermodynamiques d'équilibre ne permet pas de distinguer quel type de complexation est mis en jeu, mais permet d'évaluer la spéciation des métaux en solutions, en particulier la fraction libre (solvatée) et la fraction adsorbée sur la surface réactive (sans préciser la nature du lien métal-surface réactive). D'une manière expérimentale, seule les méthodes de spectroscopie EXAFS peuvent conclurent à l'existence de liaison chimique entre le centre métallique et le ligand organique, et donc, déterminer si on a affaire à une complexation en sphère interne. L'étude des constantes thermodynamiques de complexation $K_{Me-ligand\ simple}$ entre les ligands organiques simples et les cations métalliques caractéristiques des pollutions urbaines (Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} et Cu^{2+}) et leur comparaison avec les constantes de complexation K_{Me-MO} entre la matière organique du sol et ces mêmes métaux met clairement en évidence une réactivité accrue de la MO sur les métaux. Quantitativement, les valeurs de $\text{Log}K_{Me-MO}$ sont toujours au moins 1 à 2 ordres de grandeurs supérieurs à celles de $\text{Log}K_{Me-ligand\ simple}$ et proches des valeurs des constantes de complexation des ligands chélatants :

$$\underbrace{\text{Log}K_{Me-bacterie} \approx \text{Log}K_{Me-chelant}}_{\in[3,5]} \geq \text{Log}K_{Me-ligand\ simple} + 1 \text{ (ou } + 2)$$

D'autre part, le métal ayant le plus d'affinité avec la matière organique est le cuivre, suivi du cadmium puis du zinc :

$$\text{Log}K_{Cu-MO} > \text{Log}K_{Cd-MO} > \text{Log}K_{Zn-MO}$$

Guine et al. (2006) montrent que la surface limitée des bactéries ne suffit pas à expliquer la totalité des métaux qu'elles complexent. Ces auteurs suggèrent donc que cette augmentation de réactivité provient des substances extracellulaires produites par les bactéries, comme les EPS.

Chapitre 5

Définition du système modèle d'étude

Xanthane + Cu²⁺

Le fil des précédents chapitre nous a permis de mettre en évidence l'importance de la réactivité de la MO du sol (chapitre 1), et en particulier des substrats bactériens vis à vis des protons et des cations métalliques (cf. chapitre 2 et 4). La réactivité supérieure des biofilms bactériens par rapport aux bactéries libres tant en terme de capacité d'échange de protons (cf. chapitre 2) que d'adsorption des ETM (cf. chapitre 4) met en évidence la réactivité potentielle des substances extracellulaires, tels que les EPS (cf. chapitre 3). Les arguments exposés aux précédents chapitres nous permettent donc de proposer un système modèle d'étude des interactions entre EPS et cations métalliques, afin de mieux comprendre les capacités de fixation des métaux lourds par la biomasse bactérienne. L'objet du présent chapitre est de justifier le système d'étude choisi : xanthane + cuivre.

Afin d'étudier les interactions EPS v.s. métaux, il faut convenir d'un polysaccharide bactérien modèle et d'un polluant métallique. Dans un premier temps, nous détaillerons le choix du xanthane, puis nous exposerons les arguments soutenant le choix du cuivre comme polluant métallique de référence.

5.1 le choix de l'exopolysaccharide xanthane

Les critères que nous avons définis pour choisir l'EPS modèle sont les suivants :

1. Un EPS d'origine bactérienne
2. Un EPS de structure chimique déterminée
3. Un EPS a priori réactif (i.e. possédant des groupements réactifs)
4. Un EPS non gélifiant (soluble en solution aqueuse)
5. UN EPS ayant si possible une littérature abondante sur son comportement en solution aqueuse

Le xanthane est un EPS respectant ces cinq critères. Il est synthétisé par les souches bactériennes *Xanthomonas campestris* et *Xanthomonas phaseoli*, et sa structure chimique est bien connue. Les EPS produits par les bactéries planctoniques (libres) et par les biofilms étant généralement de même nature (Marcotte et al., 2007; Sutherland, 2001), le xanthane est un EPS représentatif des différents substrats bactériens. De plus, ce polyélectrolyte possède des groupements carboxyliques : acide uronique (acide glucuronique) et acide pyruvique, et possède donc a priori une capacité d'échange de protons et de complexation des cations métalliques en solutions. Etant très utilisé dans l'industrie agroalimentaire (comme additif dans les yaourts en particulier), une littérature abondante caractérise

sont comportement en solution aqueuse (plus de 2000 références !) en terme de rhéologie, et d'études conformationnelles. Cependant, très peu d'études concernent sa réactivité, ce qui renforce l'intérêt de travaux de recherche ayant pour objectif de la déterminer. Enfin, le xanthane présente l'avantage d'être facile à produire et purifier, et n'est pas gélifiant, ce qui permet d'aborder plus simplement le travail expérimental en solution aqueuse.

5.2 le choix du polluant métallique Cu²⁺

Nous avons vu que les polluants caractéristiques les plus abondants en milieu urbain étaient, le plomb, le zinc et le cuivre, ainsi que le cadmium (moins représenté mais plus toxique). Le cuivre est reconnu pour sa grande affinité avec la matière organique (cf. chapitre 4), [Guibaud et al. \(2003\)](#) montre sur des boues activés (mélange de bactéries, de substances extracellulaires et de substances humiques) que la densité de sites de fixation du cuivre est plus élevée que celle des autres métaux. [Comte et al. \(2006\)](#) montrent que l'affinité des substances extracellulaires des boues activées pour les métaux est la plus forte pour l'ion Cu²⁺, puis respectivement le Pb²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺. Les résultats de [Larmet \(2007\)](#) confirment également cette tendance sur la MO du sol d'un bassin d'infiltration. Enfin, la plus grande affinité du cuivre pour la matière organique purement bactérienne a également été démontré par de nombreux auteurs ([Johnson et al., 2007](#); [Fein et al., 2001](#); [Daughney and Fein, 1998](#); [de Lurdes et al., 1987](#)).

D'autre part, le cuivre présente l'avantage d'être facilement mesurable en solution aqueuse par potentiométrie. Cette facilité expérimentale dans le dosage du cuivre libre en solution paraît essentielle dans l'élaboration d'un protocole expérimental efficace limitant les moyens indirects de mesure des métaux (collecte d'échantillon, filtrations des phases colloïdales, centrifugation, ...).

C'est deux arguments, faciliter de mesure du cuivre libre en solution et comportement particulier du cuivre envers la MO d'origine bactérienne ont porté notre choix sur l'ion Cu²⁺ comme polluant métallique de référence.

La suite du manuscrit présentera les résultats obtenus sur le système modèle d'étude xanthane + cuivre, en terme de réactivité aux protons et au cuivre par une étude expérimentale par titrages et spectroscopie (EXAFS) couplée à une étude de modélisation moléculaire.

Deuxième partie

Etude à l'échelle macroscopique des complexes Xanthane-Cu²⁺

Chapitre 6

Introduction

Le présent chapitre a pour objectif de dresser un état de l'art rapide des travaux effectués sur le xanthane. On s'attachera à aborder les thèmes de la structure chimique du polysaccharide, de ses différentes conformations en solution (ordonné-désordonné), guidé par les travaux de synthèse de Laneuville (2004) et Stokke et al. (1998). Puis, après avoir rappelé les fondements théoriques des titrages de surfaces réactives, nous nous attacherons à décrire les propriétés connues de réactivité du xanthane aux protons et aux métaux. Nous verrons alors que la réactivité de cet exopolysaccharide a été peu explorée

6.1 Structure chimique du xanthane

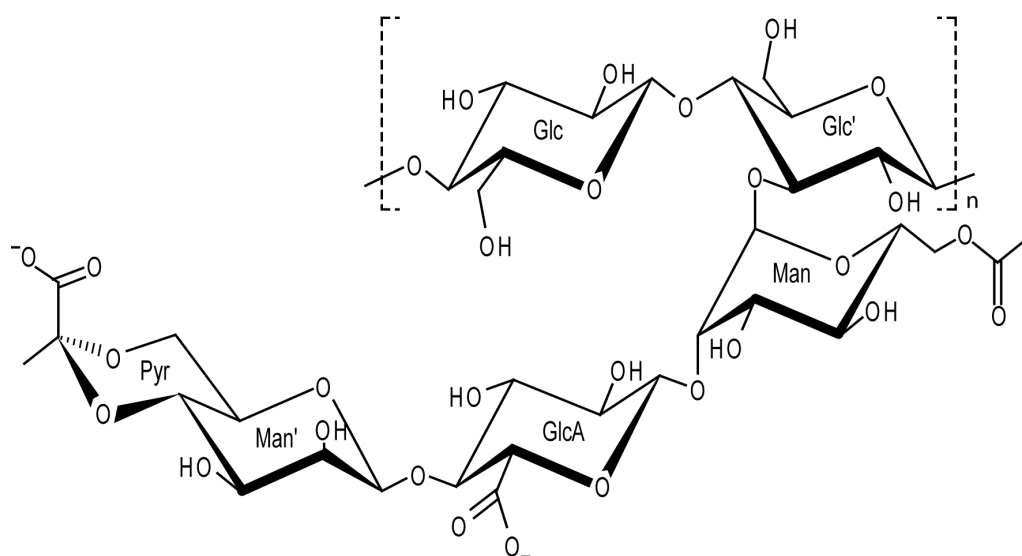


FIGURE 6.1 Structure moléculaire d'une unité répétitive du xanthane.

Le xanthane est le polysaccharide extracellulaire synthétisé par les souches bactériennes *Xanthomonas campestris* et *Xanthomonas phaseoli* (Morris et al., 1977). Sa structure chimique, présentée en figure 6.1, a été élucidée dès 1975 par Jansson et al. (1975) par une étude fine de méthylation, oxydation et élimination sur les oligosaccharides : le polysaccharide est un polymère d'unité répétitive pentasaccharidique (cf. figure 6.1). Le monomère (ou unité répétitive) comporte une chaîne principale de glucose (type cellulose : $\beta\text{Glc}(1\rightarrow4)\beta\text{Glc}'$) sur laquelle est branchée une chaîne latérale trisaccharidique ($\alpha\text{Man}(2\rightarrow1)\beta\text{GlcA}(4\rightarrow1)\beta\text{Man}'(+\text{Pyr})$) tous les deux glucose via une liaison

$\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\beta\text{Glc}'$ (cf. figure 6.1). Le résidu interne de mannose est généralement acétylé sur le carbone 6. Entre 30 et 80 % des résidus de mannose terminal portent un groupement pyruvate lié sous forme chélatée entre les carbones 4 et 6 (Kang and Pettitt, 1992; Holzwarth, 1976). Il est important de noter que le contenu des résidus pyruvates et acétates varie selon la souche bactérienne (Sutherland, 1981), le procédé de fermentation, les conditions après fermentation et les étapes de purification (Rao and Sureshkumar, 2001; Flores-Candia and Deckwer, 1999; Shu and Yang, 1990). Des études RMN ^1H et ^{13}C (Rinaudo et al., 1983; Horton et al., 1985; Cheetham and Mashimba, 1992) vont confirmer cette structure chimique, présentée à la figure 6.1.

Les acides glucuroniques et pyruviques sont responsables de la nature anionique du xanthane en solution (charge négative au dessus de pH 1, ce qui en fait un bon modèle de substrat bactérien -cf. section 1.4.2-), le xanthane possède donc des capacités d'échange de protons en solution aqueuse (Young et al., 1994; Kang and Pettitt, 1992; Richardson and Ross-Murphy, 1987; Zhang et al., 1987), sur lesquelles nous reviendrons à la section 5.5. On parle donc de polyélectrolyte, car le xanthane réunit les propriétés d'un polymère et d'un électrolyte¹. Un polysaccharide pouvant échanger des ions hydroniums en fonction du pH est appelé polyélectrolyte. Les groupements négativement chargés peuvent être neutralisés dans les produits commerciaux par les cations Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} (Laneuville, 2004), ou convertis en forme acide par échange d'ions ou par dialyse d'une solution acide (Jeannes et al., 1961).

6.2 Les hélices 5-1 du xanthane : l'état ordonné

Moorhouse et al. (1977) proposent une structure 3D pour le xanthane à l'état solide, à partir de clichés de diffraction des rayons X (DRX). Cette structure hélicoïdale à 5 résidus par tour (notée 5_1), d'une hauteur de 4.7 nm par tour d'hélice est présentée en figure 6.2. Bien que, le plus souvent, les méthodes utilisées en préparation des échantillons DRX forcent l'orientation des fibres, afin d'obtenir un cliché mieux résolu, la structure 5_1 de Moorhouse, n'a pas, faute de mieux, été remise en cause jusqu'à ce jour.

Parallèlement aux études sur le solide, permettant de résoudre la structure cristalline des molécules, les travaux de Morris et al. (1977) vont s'intéresser aux conformations du xanthane en solution. La structure cristalline du xanthane en 5_1 est admise par la communauté scientifique comme la structure ordonnée du xanthane en solution (Laneuville, 2004; Sato et al., 1984; Morris et al., 1977; Milas and Rinaudo, 1979). La structure en hélice 5_1 du xanthane est stabilisée par quatre liaisons hydrogènes intramoléculaires par unité pentasaccharidique : une entre le α -D-mannose et le β -D-glucuronate de la chaîne latérale, une entre un glucose de la chaîne principale et le α -D-mannose qui s'y rattache, et les deux autres entre les glucoses adjacents de la chaîne principale (Okuyama et al., 1980). La structure hélicoïdale du xanthane, avec l'alignement des chaînes latérales le long de l'axe de l'hélice, lui confère une grande rigidité et stabilité en solution (Morris, 1995; Young et al., 1994; Sato et al., 1984). D'autre part, les ponts H intramoléculaires gênent presque complètement la rotation interne autour des oxygènes glucosidiques entre deux glucoses : ceci a pour effet de raidir la chaîne davantage résultant en une augmentation de ses dimensions et de sa viscosité intrinsèque (Stokke et al., 1998). Certains auteurs, par des études sur les rayons hydrodynamiques ou DRX vont même affiner la structure ordonnée du xanthane en solution, en suggérant que les hélices 5_1 se combinent par deux pour former des doubles hélices parallèles ou antiparallèles (Sato et al., 1984,a,b; Okuyama et al., 1980; Holzwarth and Prestidge, 1977). Si le débat existe toujours quant à savoir si les hélices doubles sont parallèles ou antiparallèles, la pertinence de l'existence de ces doubles hélices

1. La définition de l'électrolyte en chimie des polymères (polymère pouvant échanger des protons en fonction du pH) diffère de celle utilisée en chimie inorganique (milieu conducteur).

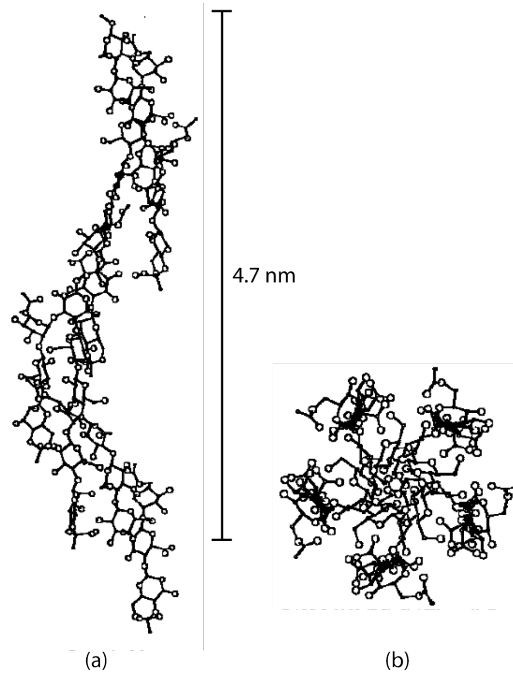


FIGURE 6.2 Structure hélicoïdale du xanthane : (a) vue longitudinale et (b) vue axiale. D'après Moorhouse et al. (1977).

en solution ne paraît souffrir aucun doute : la transition double hélice - simple hélice a été observée expérimentalement dès 1987 par microscopie électronique (Foss et al., 1987) puis en microscopie à force atomique (Capron et al., 1998; Camesano and Wilkinson, 2001) cf. figure 6.3.

6.3 Transitions conformationnelles du xanthane : hélice rigide-brin flexible

6.3.1 Etats ordonné (hélices) et désordonné (coil)

Il est reconnu de nos jours que la conformation du xanthane peut être celle d'une hélice simple ou d'une hélice double selon la force ionique, la température, le type de solvant et la structure primaire (contenu en pyruvate et en acétate). Un autre facteur particulièrement important est l'histoire thermique de l'échantillon, c'est-à-dire, les traitements subis pendant et après la fermentation (extraction par solvant, pasteurisation, séchage, dialyse, centrifugation, filtration) (Morris, 1990; Lecourtier et al., 1986; Muller et al., 1986).

La conformation hélicoïdale ordonnée peut subir une transition (ordre-désordre) qui résulte en une chaîne flexible et désordonnée (nommée coil) (cf. figures 6.4 et 6.5) (Dentini et al., 1984; Paoletti et al., 1983; Morris et al., 1977; Holzwarth, 1976). Cette transition peut être induite à de faibles forces ioniques ($< 10^{-3}$ M NaCl) ou lors d'un chauffage au-delà d'une certaine température nommée température de transition (notée T_m). La T_m a été détectée par plusieurs méthodes incluant la rotation optique (Norton et al., 1984; Milas and Rinaudo, 1979). Sous ces conditions de désordre, les répulsions électrostatiques entre les groupements carboxyliques ionisés entraînent un relâchement des chaînes latérales et résultent en une conformation désordonnée (Young et al., 1994; Liu et al., 1987; Norton et al., 1984). Cette transition est accompagnée d'une importante diminution du poids moléculaire (PM) et de la viscosité des solutions (Rocherfort and Middleman, 1987; Lecourtier et al., 1986; Muller et al., 1986; Pettitt, 1979).

La T_m se situe autour de $\approx 55^\circ\text{C}$ pour une solution libre de sels et avec une concentration de

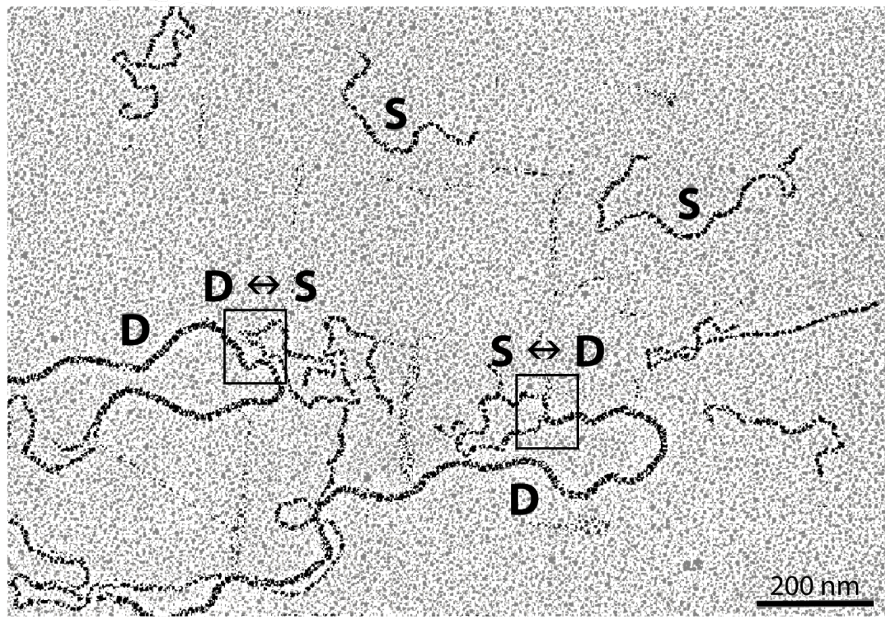


FIGURE 6.3 Observation en microscopie électronique des hélices simples (*S*) et doubles (*D*) du xanthane, et des transitions hélices simples \rightleftharpoons hélices doubles ($S \rightleftharpoons D$), pour du xanthane à pH 7, FI=0.1 mM en acétate d'ammonium dans du glycérol 50%. D'après *Foss et al. (1987)*.

1% p/p de xanthane (i.e. 1g/L) (*Morris, 1990; Sutherland, 1990; Milas and Rinaudo, 1979*). La T_m dépend du poids moléculaire (*Liu and Norisuye, 1988; Milas and Rinaudo, 1986*), du contenu en pyruvate et en acétate (*Christensen and Smidsrød, 1991; Shatwell et al., 1990; Dentini et al., 1984; Rees et al., 1982; Smith et al., 1981*), de la force ionique et du type d'ions (*Kitamura et al., 1991; Milas et al., 1986; Norton et al., 1984; Paradossi and Brant, 1982; Milas and Rinaudo, 1979; Morris et al., 1977*). En fait, la T_m augmente toujours linéairement avec le logarithme de la force ionique totale (*Kitamura et al., 1991; Rinaudo and Milas, 1982*). Ainsi, la présence de faibles quantités d'électrolytes accentue la stabilité thermique de la molécule en réduisant la répulsion électrostatique entre les anions carboxylates des chaînes latérales qui s'effondrent sur la chaîne principale (cf. figure 6.4). La température de transition passe alors de $\approx 63^\circ\text{C}$ à 0.05 % NaCl à plus de 100°C à 5 % NaCl (*Rocherfort and Middleman, 1987; Milas and Rinaudo, 1979; Morris et al., 1977*).

D'autre part, *Kitamura et al. (1991)* ont trouvé qu'à la même force ionique, le xanthane riche en pyruvate (0.9 groupement pyruvate/monomère) est plus sensible à la température ($T_m = 48.8^\circ\text{C}$) que le xanthane faible en pyruvate (0.14 groupement pyruvate/monomère) ($T_m = 85.3^\circ\text{C}$). Des résultats similaires ont été trouvés par d'autres auteurs (*Muller et al., 1986; Dentini et al., 1984; Norton et al., 1984; Rinaudo et al., 1983; Smith et al., 1981; Holzwarth and Ogletree, 1979*) démontrant que le pyruvate cause une déstabilisation de la structure ordonnée par des répulsions électrostatiques et des contraintes stériques qui s'opposent à la formation d'une hélice compacte (*Lecourtier et al., 1986; Dentini et al., 1984; Smith et al., 1981*). Les groupements acétates quant à eux, ont un rôle stabilisateur de la conformation ordonnée, car ils sont impliqués dans la formation des liens intermoléculaires avec la chaîne principale, du fait qu'ils possèdent des atomes d'oxygène qui peuvent fonctionner comme accepteurs de liens hydrogène (*Dentini et al., 1984; Tako and Nakamura, 1984; Rinaudo et al., 1983; Smith et al., 1981*).

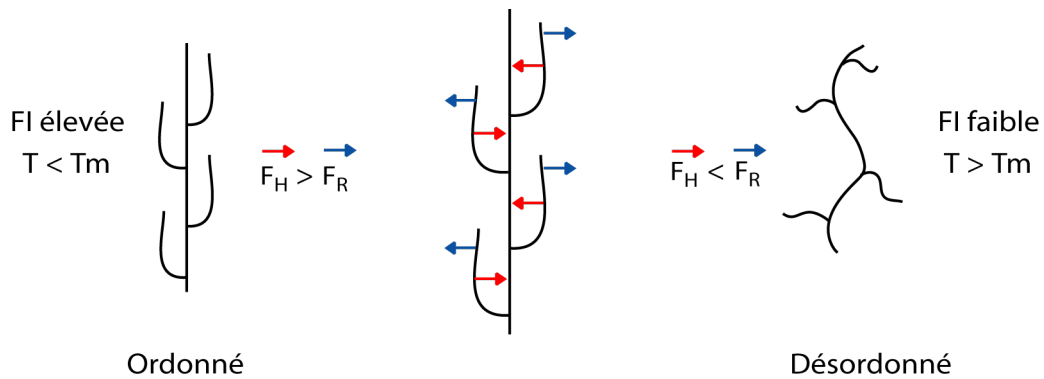


FIGURE 6.4 Conceptualisation des forces stabilisatrices dues aux liaisons hydrogènes F_H et des forces de répulsions électrostatiques dues aux carboxylates négativement chargés F_R . A température fixée, lorsque la FI augmente F_R est neutralisée par les contre ions du sel du fond ionique, alors $F_H > F_R$ on s'oriente vers une structure rigide, avec les chaînes latérales le long de la chaîne principale, il y a formation des hélices 5_1 simples ou doubles. Lorsque la FI est faible ou la température élevée ($T > T_m$), les forces de répulsions électrostatiques deviennent prédominantes, les chaînes latérales ne sont plus stabilisées vers la chaîne principale par les ponts hydrogènes, la structure est désordonnée : elle forme des brins flexibles ou coils.

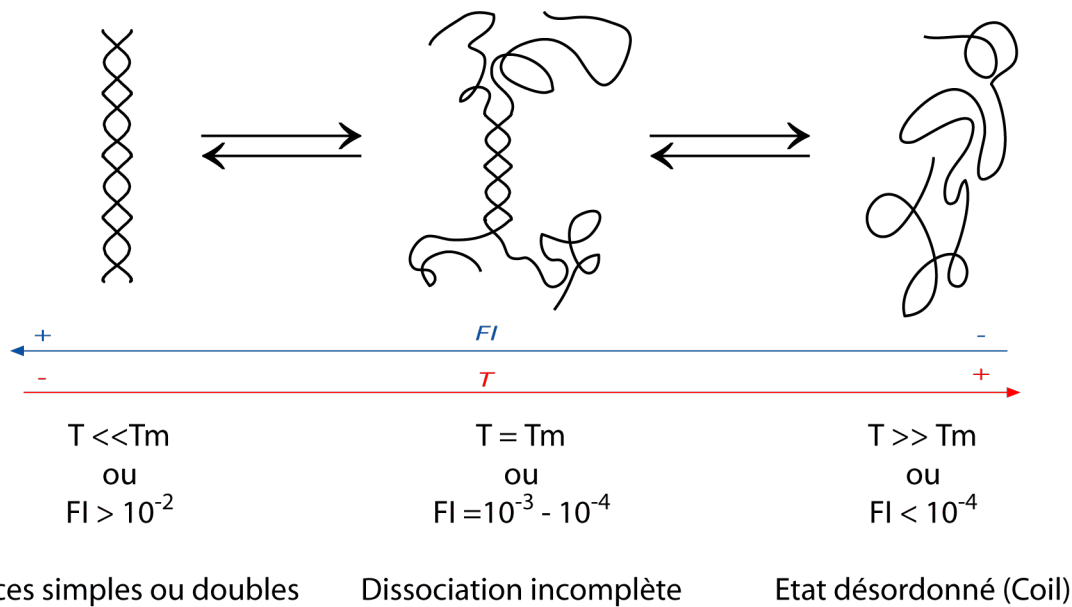


FIGURE 6.5 Transitions conformationnelles ordre-désordre du xanthane en fonction de FI, T. Adapté de Morris (1995); Milas and Rinaudo (1979); Morris et al. (1977).

6.3.2 Scénarios des transitions conformationnelles

L'explication de la transition de conformation du xanthane est reliée à sa structure moléculaire. Selon qu'il s'agisse d'une structure native ou renaturée, les scénarios suivants pour la transition ont été proposés.

Si la molécule se trouve sous la forme d'une hélice en brin simple (état natif), la transition ordre-désordre est un processus intramoléculaire (hélice rigide \rightleftharpoons chaîne flexible) (Rocherfort and Middleman, 1987; Milas et al., 1986; Muller et al., 1986; Norton et al., 1984; Dea, 1982; Frangou et al., 1982; Rees et al., 1982; Rinaudo and Milas, 1978; Morris et al., 1977). Cette théorie est basée sur des études montrant que les changements de conformation sont dus à des arrangements intramoléculaires plutôt qu'intermoléculaires. Les chaînes latérales deviennent alors mobiles (les liaisons H sont brisées), avant la chaîne principale, résultant en une diminution du volume hydrodynamique et de la viscosité mais sans diminution du PM (Kang and Pettitt, 1992; Rees et al., 1982). Appuyant ce modèle, Dea (1982) explique le caractère thixotropique du xanthane et sa capacité à stabiliser les émulsions, par une association intermoléculaire des hélices simples et rigides. La diminution de la viscosité, sous l'influence de la température, s'expliquerait par l'effondrement de ce réseau.

Si le xanthane se trouve en forme de double hélice, alors la transition implique une dissociation ordre-désordre en brins simples. Dans ce cas, il y a une diminution du PM, du volume hydrodynamique et de la viscosité (Christensen et al., 1996; Morris, 1995; Christensen and Smidsrød, 1991; Kitamura et al., 1991; Milas et al., 1985). En ramenant cette solution sous des conditions favorisant une structure ordonnée, les hélices simples s'associent à nouveau pour former des hélices doubles renaturées. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour la dissociation de la double hélice. Le plus répandu est celui proposé par Liu and Norisuye (1988) et Milas and Rinaudo (1984) et concerne une dissociation incomplète de l'hélice double à de hautes températures et/ou à de faibles forces ioniques. La double hélice se déferait à partir des extrémités, à cause des répulsions entre les groupements chargés de la molécule, pour donner une conformation de brin double étendu présentant quelques segments d'hélice double. La figure 6.6(a) illustre ce phénomène. Un arrangement via l'association d'hélices doubles (figure 6.6(b)) expliquerait le comportement de gel faible Morris (1995). Il a aussi été proposé que les agrégats de xanthane sont formés par des molécules adjacentes qui s'agrègent de façon parallèle en hélices simples (Norton et al., 1984), tel que vu par microscopie en force atomique (Capron et al., 1998).

Stokke et al. (1989) suggèrent que la dissociation en brins simples est rarement obtenue quand du xanthane est exposé à des conditions de désordre en solution aqueuse, à moins que des conditions très sévères soient appliquées (i.e. moins de 10^{-5} M NaCl ou exposition à des températures $T > T_m$ pour des périodes prolongées). Muller and Lecourtier (1988) proposent une théorie de dissociation en deux étapes. Dans la première étape (chauffage jusqu'à la T_m ou exposition à 10^{-3} - 10^{-4} M NaCl), l'hélice compacte s'étend en une conformation plus lâche, sans diminution du PM mais avec une augmentation de la viscosité. En retournant aux conditions de départ, la conformation originale est récupérée. La deuxième étape est plus lente et a lieu seulement à des températures beaucoup plus élevées que la T_m ou des FI inférieures à 10^{-5} M NaCl. Sous ces conditions il y a une séparation complète de la double hélice avec une diminution du PM. Plusieurs études ont trouvé, qu'entre les deux conformations extrêmes, des conformations intermédiaires peuvent exister (Muller and Lecourtier, 1988) et que des séquences ordonnées ou désordonnées peuvent coexister dans la même molécule Norton et al. (1984). Dans ce sens, les études par microscopie électronique (Christensen et al., 1993; Stokke et al., 1989; Foss et al., 1987; Holzwarth, 1976) sont particulièrement indéniables.

D'autre part, Milas and Rinaudo (1986) ont trouvé que le xanthane renaturé a une conformation

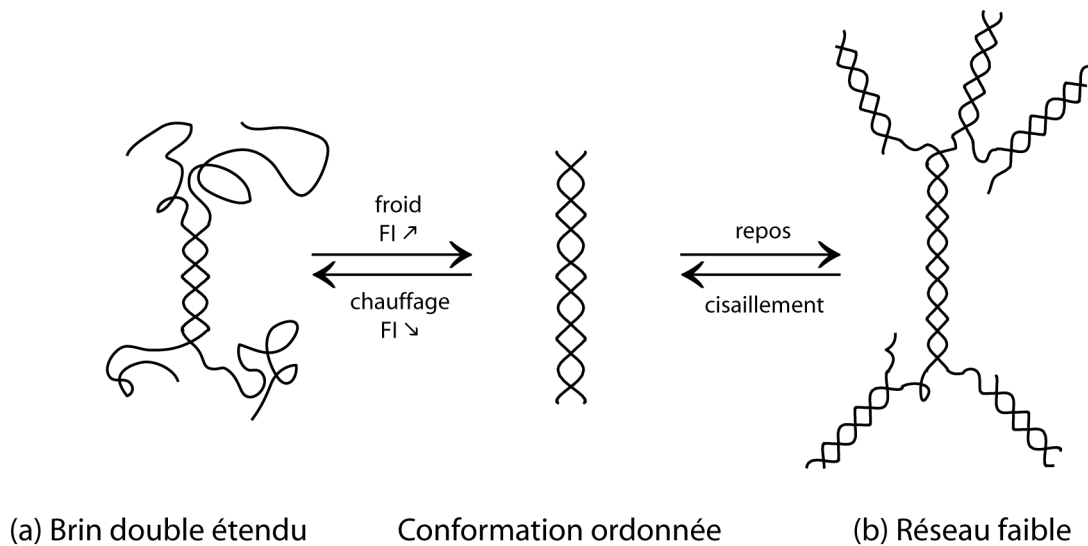


FIGURE 6.6 *Dissociation incomplète du xanthane et association d'hélices doubles, adapté de Laneuville (2004); Morris (1995); Milas and Rinaudo (1984); Morris et al. (1977).*

de la chaîne principale plus étendue, présentant le même PM que le xanthane en double hélice qui n'a jamais été chauffé, mais avec une viscosité plus élevée. Milas and Rinaudo (1986) soutiennent que ceci n'est pas nécessairement lié à la formation d'hélices doubles possédant des régions discontinues ou des extrêmes non appariés, leur permettant de s'associer entre elles, pour donner des valeurs plus élevées de PM et de viscosité, comme proposent d'autres auteurs (Rocherfort and Middleman, 1987). Ce comportement serait plutôt dû à des modifications dans le patron d'interaction entre la chaîne principale et les chaînes latérales, résultant en un volume hydrodynamique plus grand.

Il est des nos jours accepté que le xanthane possède une conformation native en hélice simple, avec un poids moléculaire de $\approx 2 \cdot 10^6$ Da (Southwick et al., 1982), mais qu'après les traitements subis pendant sa purification, incluant pasteurisation et séchage, il se présente sous forme d'une hélice double (Sutherland, 1990; Muller et al., 1986). Donc, en général, les échantillons commerciaux sont considérés sous forme d'hélices doubles (Young et al., 1994; Holzwarth, 1976). En effet, plusieurs études ont trouvé que des traitements tels que l'atomisation et la lyophilisation, pratiqués en industrie, induisent la formation d'agrégats intermoléculaires (Lagoueyte and Paquin, 1998; Muller et al., 1986). D'où la grande variabilité des PM rapportés en littérature pour le xanthane, qui varient entre $2 \cdot 10^6$ Da et $5 \cdot 10^7$ Da, soit entre 2 000 et 50 000 unités répétitives. Cette variation est le résultat du phénomène d'association entre les molécules (Young et al., 1994; Sutherland, 1990; Holzwarth, 1976).

Différentes études montrent les interactions synergiques du xanthane avec d'autres polysaccharides : dans des conditions défavorables à sa configuration ordonnée (faible FI, haute T°) le xanthane peut tout de même recréer sa conformation en hélice 5_1 grâce aux interactions (dites synergiques) avec d'autres polysaccharides en solution (e.g. glucomanan) (Paradossi et al., 2002; Bresolin et al., 1998).

6.3.3 Liens avec la longueur de persistance q

Les valeurs rapportées en littérature sur la longueur de persistance q (une mesure de la rigidité de la molécule) obtenues à basses températures et hautes forces ioniques, par viscosimétrie à partir des solutions diluées, ou par diffusion de la lumière du xanthane, sont de l'ordre de $q = 110 - 150$

nm (Morris, 1990; Zhang et al., 1987; Lecourtier et al., 1986; Muller et al., 1986, 1984; Sato et al., 1984a,b; Paradossi and Brant, 1982; Holzwarth and Prestridge, 1977). Ceci indique que le xanthane est autour de 10 fois plus rigide que la cellulose et comparable à la double hélice de l'ADN ($q = 150$ nm à des forces ioniques élevées), au polysaccharide schizophyllan ($q = 150-200$ nm) et au polypeptide collagène ($q = 170$ nm) (Laneuville, 2004). Ces deux dernières macromolécules étant des triple-hélices, cela indique que le xanthane est un des biopolymères les plus rigides dans la nature (Shatwell et al., 1990; Richardson and Ross-Murphy, 1987; Zhang et al., 1987; Lecourtier et al., 1986; Sato et al., 1984b). Toutefois, à de faibles FI, sa longueur de persistance est plus faible, soit $q = 50-60$ nm, ce qui est relié à une conformation désordonnée (Morris, 1990; Milas and Rinaudo, 1986; Muller et al., 1986; Sho et al., 1986; Holzwarth and Prestridge, 1977). Zhang et al. (1987) ont étudié la longueur de persistance du xanthane en fonction du pH. Ils montrent, sur une grande variété de lots de xanthane, qu'à FI fixée (0.01 M NaCl), la longueur de persistance chute quand le pH diminue. Ainsi à pH 7, $q \approx 120$ nm tandis qu'à pH 2 $q \approx 70$ nm, cette diminution de près de la moitié de la longueur de persistance est interprétée comme une perte du caractère double hélice du xanthane, soit par des portions n'étant plus ordonnées en double hélice, soit par des hélices doubles plus flexibles (Zhang et al., 1987).

6.4 Le xanthane en solution

Par la nature anionique des chaînes latérales et les contraintes stériques qu'elles imposent, l'eau peut pénétrer plus facilement dans les espaces intramoléculaires, facilitant ainsi la solubilisation du xanthane (Morris, 1995). D'autre part, toujours par contrainte stérique, les chaînes latérales limitent la formation de liens intermoléculaires évitant ainsi la gélification du xanthane (Kang and Pettitt, 1992). Au-dessus d'une certaine concentration, les molécules rigides s'enchevêtrent pour former un réseau stabilisé par des liaisons spécifiques entre les chaînes de xanthane, notamment des liens hydrogène (Richardson and Ross-Murphy, 1987), mais d'autres types d'interactions non-covalentes ont aussi lieu, telles des interactions ioniques (Rocherfort and Middleman, 1987; Frangou et al., 1982). Les propriétés rhéologiques d'un tel système ressemblent plus à celles d'un gel très faible qu'à une solution gouvernée par les enchevêtrements (Capron et al., 1997; Kang and Pettitt, 1992; Norton et al., 1984; Rees et al., 1982). Cette structuration est responsable du seuil d'écoulement et de la viscosité exceptionnellement haute des solutions de xanthane à de faibles forces de cisaillement. Sous une agitation plus forte, le réseau est déstructuré. Les molécules s'alignent dans le sens du cisaillement et confèrent un important caractère pseudoplastique à la solution. Lorsque l'agitation cesse, le réseau se forme à nouveau très rapidement (Doublier, 1993) (cf. figure 6.6). Ce faible réseau sera à la base de la capacité du xanthane de maintenir des particules en suspension ou de stabiliser une émulsion contre la remontée ou la fusion des gouttelettes de matière grasse pour de longues périodes de temps (Lapasin and Pricl, 1995; Kang and Pettitt, 1992; Rees et al., 1982; Morris et al., 1977).

Il a été aussi suggéré que les propriétés inusitées du xanthane soient dues à la formation d'une phase nématique en solution (orientation moléculaire) Carnali (1991). Ce type de comportement est typique des polymères rigides ou semi-rigides en solution, qui forment spontanément des phases ordonnées au-dessus d'une certaine concentration critique, pour réduire au minimum le volume exclu du polymère (Richardson and Ross-Murphy, 1987). Finalement, il a été trouvé que les échantillons avec un haut contenu en pyruvate possèdent une viscosité et un caractère pseudoplastique plus élevés car le pyruvate induit des associations intermoléculaires (Flores-Candia and Deckwer, 1999; Hassler and Doherty, 1990; Smith et al., 1981). En effet, les associations intermoléculaires sont encouragées par des interactions entre les groupements méthyles localisés à la périphérie des molécules. L'asso-

ciation entre les molécules de xanthane est maximale à de hautes teneurs en pyruvate et quand la répulsion entre chaînes est minimisée par de hautes forces ioniques (Smith et al., 1981). Les groupements acétates possèdent aussi des groupements méthyles, mais ils ne sont pas disponibles, ils interagissent plutôt avec la chaîne principale.

Le traitement par ultrasons a pour effet de diminuer le PM du xanthane, de même que la viscosité des solutions obtenues. Cette dégradation semble être aléatoire et les changements induits n'ont pas une grande influence sur la Tm, montrant que la force ionique et l'état d'agrégation des molécules ont plus d'influence sur la Tm (Kitamura et al., 1991; Milas et al., 1985).

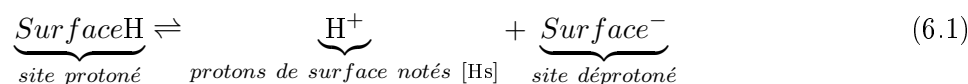
6.5 Titrages potentiométriques du xanthane

6.5.1 Rappels théoriques sur les titrages de surface réactive

6.5.1.1 Définition des protons de surface

De même qu'un acide (ou une base) dissout(e) en solution, une surface minérale, organique ou bioorganique (SH, paroi cellulaire, EPS -comme le xanthane-) peut posséder des propriétés acidobasiques et relarguer des protons H_S dans le milieu réactionnel : on parle alors de surface réactive.

Par convention on désigne $[H_S]$ comme la concentration en protons relargués par la surface vers le milieu extérieur et on considère cette grandeur comme une valeur positive :



A cet équilibre acide/base est associée la constante thermodynamique :

$$K_a = \frac{[Surface^-] * a(H^+)}{[SurfaceH]}, \quad pK_a = -\log K_a \quad (6.2)$$

Remarque importante :

Conceptuellement, pour tout proton relargué par la surface on crée un site déprotoné ce qui se traduit par l'égalité des concentration suivante² :

$$\boxed{[H_S] = [Surface^-]} \quad (6.3)$$

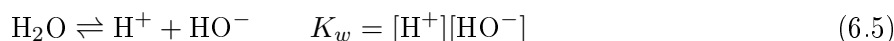
Pour le xanthane, nous avons deux sites capables de se déprotoner : les groupements pyruviques et les groupements glucuroniques. L'expression de H_S est donc donnée par l'expression 6.4³ :

$$[H_S] = [\equiv PyrCOO^-] + [\equiv GlcCOO^-] \quad (6.4)$$

6.5.1.2 Expression expérimentale des protons de surface

La présente section s'attachera à décrire les équations chimiques lors du dosage par une base forte d'une surface réactive (ici le xanthane) initialement placée dans un milieu acide.

Considérons une eau pure, à pH 7. L'autoprotolyse de l'eau est alors la seule réaction mise en jeu⁴ :



2. Précisons que si on ne connaît pas la charge de la surface au point de départ du titrage, on obtient une valeur de H_S non "normalisée" : $[H_S] + [H_{ORef}] = [Surface^-]$

3. Le signe \equiv symbolise l'attachement du groupe fonctionnel à la surface réactive étudiée : le xanthane.

4. Par la suite l'indice w fera référence aux ions créés par l'autoprotolyse de l'eau

Les seuls ions en solution sont donc les ions hydroxydes et hydroniums, l'équation d'électroneutralité nous donne :

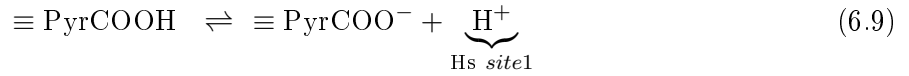
$$[+] = [-] \Leftrightarrow [H^+] = \sqrt{K_w} = [HO^-] \quad (6.6)$$

Ajoutons à cette eau une solution d'acide fort : HCl, de concentration $[H_0]$ alors l'équation (6.6) devient :

$$\underbrace{[H^+]_w + [H^+]_{HCl}}_{\text{non discernables analytiquement} = [H^+]} = [HO^-]_w + \underbrace{[Cl^-]}_{[H_0]} \quad (6.7)$$

$$i.e. [H^+] = [H_0] + [HO^-] \quad (6.8)$$

Ajoutons un premier site réactif dans ce mélange réactionnel, par exemple le site acide carboxylique de l'acide pyruvique défini par l'équilibre suivant :



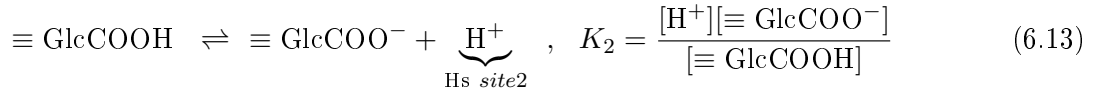
$$K_1 = \frac{[H^+][\equiv \text{PyrCOO}^-]}{[\equiv \text{PyrCOOH}]} \quad (6.10)$$

L'équation (6.8) devient :

$$\underbrace{[H^+]_w + [H^+]_{HCl} + [H_S]_{\text{site1}}}_{\text{non discernables analytiquement}} = [H_0] + [HO^-]_w + [\equiv \text{PyrCOO}^-] \quad (6.11)$$

$$i.e. [H^+] = [H_0] + [HO^-] + [\equiv \text{PyrCOO}^-] \quad (6.12)$$

Nous pouvons ajouter d'autres sites réactifs. Considérons le modèle de la surface réactive du xanthane, comportant deux sites réactifs carboxyliques : acide pyruvique et glucuronique. Le site réactif à ajouter est défini par :



En suivant le même raisonnement que pour le site pyruvique, (6.12) s'étend à (6.14) :

$$\underbrace{[H^+]_w + [H^+]_{HCl} + [H_S]_{\text{site1}} + [H_S]_{\text{site2}}}_{\text{non discernables analytiquement}} = [H_0] + [HO^-]_w + \underbrace{[\equiv \text{PyrCOO}^-] + [\equiv \text{GlcCOO}^-]}_{\text{Hs}} \quad (6.14)$$

$$i.e. [H^+] = [H_0] + [HO^-] + [H_S] \quad (6.15)$$

Enfin, lors du dosage du xanthane par une base forte (NaOH) le bilan de charge aura sa forme finale (6.16)

$$[H^+] + \underbrace{[Na^+]_{\text{égale à } [HO^-]_{\text{versé burette}}}} = [H_0] + \underbrace{[HO^-]_w + [HO^-]_{\text{versé burette}}}_{\text{non discernables analytiquement}} + [H_S] \quad (6.16)$$

égal à $[HO^-]_{(total)} = \frac{K_w}{[H^+]}$

Finalement on tire de (6.16) l'expression expérimentale de $[H_S]$:

$$\boxed{[H_S] = [H^+] - [H_0] - \frac{K_w}{[H^+]} + [HO^-]_{\text{burette}}} \quad (6.17)$$

A partir de (6.17), il est possible d'obtenir point par point les valeurs de $[H_S]$ en fonction du pH. En effet tous les termes du membre droit de l'équation (6.17) sont déterminés expérimentalement (mesure de pH ou connaissance de la soude ajoutée). On obtient alors après traitement numérique des données brutes une courbe expérimentale $[H_S]=f(\text{pH})$.

6.5.1.3 Expression théorique de Hs : Modèle non électrostatique

Les sites réactifs peuvent être protonés ou déprotonés, en fonction du pH. En notant T_{site} la concentration totale en site de surface, le bilan de masse pour un site réactif nous donne, pour une réaction simple (un seul pK) :

$$T_{site} = [Surface^-] + [SurfaceH] \quad (6.18)$$

Dans le cas où l'on assimile activité et concentration pour H^+ , l'équation 6.2 nous donne

$$[SurfaceH] = \frac{[Surface^-] * [H^+]}{K_a}$$

. Le bilan de masse 6.18 peut se réécrire :

$$T_{site} = [Surface^-] * \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right) \quad (6.19)$$

Et puisque $[H_S] = [Surface^-]$, l'expression théorique de Hs est donc, pour une réaction simple (un seul pK) :

$$[H_S] = \frac{T_{site}}{1 + \frac{[H^+]}{K_a}} \text{ i.e. } [H_S] = \frac{T_{site}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (6.20)$$

Pour une surface ayant plusieurs sites réactifs il vient :

$$[H_S] = \sum_{j \text{ site}} \frac{T_j}{1 + \frac{[H^+]}{K_j}} = \sum_{j \text{ site}} \frac{T_j}{1 + 10^{pK_j - pH}} \quad (6.21)$$

6.5.1.4 Expression théorique de Hs : Modèle électrostatique

Lorsque l'on a affaire à un composé dissout assimilable à un ensemble de charges ponctuelles réparties de façon homogène dans la solution (c'est le cas d'un acide carboxylique) on peut définir une constante de dissociation intrinsèque K_{intr} qui caractérise l'équilibre $COOH \rightleftharpoons COO^- + H^+$. Dans le cas où on assimile activité et concentration nous avons :

$$K_{intr} = \frac{[COO^-] [H^+]}{[COOH]} \text{ et } pK_{intr} = -\log K_{intr} \quad (6.22)$$

On définit α_{intr} , le degré d'ionisation intrinsèque :

$$\alpha_{intr} = \frac{[COO^-]}{\underbrace{[COO^-] + [COOH]}_{T_{COOH}}}$$

Il est important de noter que α correspond à $[H_S]$ normalisé par la concentration totale de sites réactifs en solution. Dans l'exemple choisi (un seul site carboxylique) nous avons $\alpha = \frac{[H_S]}{T_{COOH}}$

Le formalisme rappelé ci-dessus est valide pour un composé ponctuel dissout, ou pour une surface (hypothétiquement) neutre. Dans la plupart des cas, nous pouvons utiliser ces constantes comme des constantes apparentes (de la même manière que les constantes conditionnelles corrigés d'activité en concentration sont utilisées). Pour une surface réactive en solution, non assimilable à une charge ponctuelle, la charge de la surface va jouer un rôle sur la force de liaison des cations et des anions. Ainsi la constante de complexation apparente est la sommes des effets purement chimiques (ou intrinsèques), liés aux propriétés chimiques des groupements réactifs, et des effets purement

électrostatiques, liés à l'effet de la charge de surface sur l'attraction ou la répulsion des ions. Le champ électrique généré par une surface chargée va pouvoir attirer (surface négative, e.g. surface bactérienne) ou repousser (surface positive, e.g. oxyde métallique) les protons. Comme nous l'avons vu au cours de la première partie du manuscrit, de nombreux colloïdes organiques sont chargés négativement dans les eaux naturelles, du fait de la prépondérance des groupements fonctionnels acides carboxyliques, déprotonés à pH neutre. Ceci est valable en particulier pour les particules biologiques (bactéries, biofilms) et les colloïdes bioorganiques (substances humiques, exopolysaccharides riches en acides uroniques). Dans le cas de la constante d'acidité d'un polyélectrolyte (comme le xanthane), le travail intrinsèque $\Delta G_{\text{intrinsèque}}$ correspond à l'énergie intrinsèque de la liaison chimique d'un acide carboxylique liant un proton (traité par le formalisme classique rappeler à l'équation 6.22) et le travail supplémentaire $\Delta G_{\text{électrostatique}}$ correspond au travail électrique nécessaire pour arracher de la surface du polyélectrolyte jusqu'à l'infini, un proton H^+ retenu par le potentiel d'origine électrostatique créé le long de la chaîne du polysaccharide. L'énergie libre d'adsorption est donc la somme du travail intrinsèque (purement chimique) et du travail électrique (engendré par la charge de surface), cf. équation 6.23 (d'après [Sigg et al. \(2000\)](#); [Stumm \(1992\)](#)) :

$$\begin{aligned} \underbrace{\Delta G_{\text{adsorption}}}_{-2.3RT \log K} &= \underbrace{\Delta G_{\text{intrinsèque}}}_{-2.3RT \log K_{\text{intr}}} + \underbrace{\Delta G_{\text{électrostatique}}}_{\Delta z F \Psi_0} \\ \log K &= \log K_{\text{intr}} - \underbrace{\frac{\Delta z F}{2.3 RT} \Psi_0}_{\text{Elec}} \end{aligned} \quad (6.23)$$

i.e. $pK = pK_{\text{intr}} + \text{Elec}$

Rappelons que dans le cas sans effet électrostatique, l'équation suivante est vérifiée (elle découle de l'expression de la constante intrinsèque) :

$$pH = pK_{\text{intr}} + \log \left(\frac{\alpha_{\text{intr}}}{1 - \alpha_{\text{intr}}} \right) \quad (6.24)$$

Dans le cas avec effet électrostatique, l'équation 6.24 devient :

$$pH = \underbrace{pK}_{= pK_{\text{intr}} + \text{Elec}} + \log \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \text{ avec } \alpha \neq \alpha_{\text{intr}} \quad (6.25)$$

L'expression de 6.25 permet de calculer α et $[H_S]$:

$$\begin{aligned} pH &= pK_{\text{intr}} + \text{Elec} + \log \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \text{ i.e. } pH = pK_{\text{intr}} + \text{Elec} - \log \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) \\ \text{i.e. } pH &= pK_{\text{intr}} + \text{Elec} + p \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) \end{aligned}$$

On pose $\Phi = 10^{-\text{Elec}}$ i.e. $p\Phi = \text{Elec}$

$$\begin{aligned}
 \text{D'où } pH &= pK_{\text{intr}} + p\Phi + p\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \text{ i.e. } 0 = pK_{\text{intr}} + p\Phi + p\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) - pH \\
 \text{i.e. } 0 &= pK_{\text{intr}} + p\Phi + p\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) + p\frac{1}{H} \\
 \text{i.e. } 0 &= p\left(\frac{K_{\text{intr}}\Phi(1-\alpha)}{\alpha H}\right) \\
 \text{i.e. } 1 &= \frac{K_{\text{intr}}\Phi(1-\alpha)}{\alpha H} \\
 \text{i.e. } \alpha H &= K_{\text{intr}}\Phi - \alpha K_{\text{intr}}\Phi \\
 \text{i.e. } \alpha(H + K_{\text{intr}}\Phi) &= K_{\text{intr}}\Phi \\
 \text{i.e. } \alpha &= \frac{K_{\text{intr}}\Phi}{H + K_{\text{intr}}\Phi} \\
 \text{i.e. } \alpha &= \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_{\text{intr}}\Phi}} = \frac{1}{1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-pK_{\text{intr}}}10^{-\text{Elec}}}} \\
 \text{i.e. } \alpha &= \frac{1}{1 + 10^{pK_{\text{intr}} + \text{Elec} - pH}}
 \end{aligned}$$

Il vient donc :

$$\boxed{[H_S] = \sum_{\text{j site}} \frac{T_j}{1 + 10^{pK_{\text{intr}} + \text{Elec} - pH}}} \quad (6.26)$$

Le formalisme de H_S avec prise en compte des effets électrostatiques engendrés par la charge de surface présenté à l'équation 6.26 paraît simple. Pourtant, tout va dépendre de la loi choisie pour le terme électrostatique **Elec**. En pratique, ce terme est souvent fonction de α : $\text{Elec} = f(\alpha)$, mais l'expression simple de $\alpha_{\text{intr}} = \frac{[\text{COO}^-]}{[\text{COO}^-] + [\text{COOH}]}$ n'est pas correcte pour exprimer α (puisque l'on considère l'existence d'un effet électrostatique !). En d'autre terme, $\alpha(\text{pH}) \neq \alpha_{\text{intr}}(\text{pH})$. La solution analytique de H_S n'est pas triviale (quand elle existe) et donc, c'est par des méthodes d'analyse numérique que l'on cherche à évaluer les valeurs de H_S pour différents pH. En partant d'une valeur hypothétique pour α à pH nul (l'hypothèse choisie, et généralement bien vérifiée, est qu'à pH nul $\alpha = \alpha_{\text{intr}}$) on calcule pas par pas de pH la valeur de H_S au $\text{pH}(i+1)$ en fonction de α au $\text{pH}(i)$ selon :

$$\boxed{[H_S]_{(\text{pH}(i+1))} = \sum_{\text{j site}} \frac{T_j}{1 + 10^{pK_{\text{intr}} + f(\alpha(\text{pH}(i)) - \text{pH}(i+1))}}$$

Différents modèles électrostatiques ont été proposés au cours du $\text{XX}^{\text{ème}}$ siècle pour modéliser les effets électrostatiques dus au potentiel crée par la charge de surface : modèle à capacitance constante, modèle de Gouy et Chapman, modèle de Stern, modèle de Donnan. Enfin, pour palier aux distributions discrètes de concentrations de sites, ne convenant pas pour décrire l'hétérogénéité de certains matériaux organiques (e.g. SH), des distributions de sites continues ont été proposées (e.g. modèle de NICA).

Remarque : Le calcul développé ci-avant conduisant à l'établissement de l'équation 6.26 peut être obtenu plus directement en substituant pK_a par $(pK_{\text{intr}} + \text{Elec})$ dans l'équation 6.20. Le développement du calcul précédemment proposé est à visée pédagogique : il permet de relier les deux domaines de recherches que sont la géochimie (expression de type H_S) et la potentiométrie des polyelectrolytes (expression type $\text{pH} = pK + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$).

6.5.2 Titrages acide/base du xanthane

Malgré le nombre très important d'études sur le xanthane en solution aqueuse (plus de 2000 références), un nombre restreint d'études s'est intéressé aux propriétés du xanthane en fonction du pH. Les travaux concernant le pH s'intéressent la plupart du temps à déterminer les conditions optimales de pH pour la production du xanthane par différentes souches de *Xanthomonas* (Esgalhado et al., 1995; Thonart et al., 1985). Cependant, Young et al. (1994); Holzwarth (1976); Zhang et al. (1987) ont plus particulièrement étudié le xanthane par potentiométrie en titrage acide/base. Ces différentes études ont permis d'établir le pKa apparent du xanthane en fonction de la FI (cf. tableau 6.1). Pour mieux prendre en compte ces variations de pKa apparent du xanthane en fonction de la FI, certains auteurs ont proposé des modélisations des effets électrostatiques afin de déterminer le pK_{intrinsèque} du xanthane. Le premier modèle est le plus simple possible : Holzwarth (1976) définit le terme électrostatique des équations 6.25 ou 6.26 par $\mathbf{Elec} = \mathbf{W}^* \alpha$ où α est le degré d'ionisation et où le paramètre W n'a pas de sens physique direct. Ce modèle convient bien pour modéliser le comportement du xanthane en fonction de la FI mais laisse une très grande subjectivité et une latitude importante pour évaluer le paramètre W , difficilement associable à des paramètres physiques. Le second modèle proposé par Zhang et al. (1987) est fondé sur des considérations structurales, en prenant en compte la distance entre deux acides carboxyliques consécutifs dans le modèle hélicoïdal du xanthane de Okuyama et al. (1980), l'effet des charges de surface réparties de façon discrète sur le xanthane a été formalisé par l'équation : $\mathbf{Elec} = -2\alpha \sum_{j=1}^{\infty} \log u_j$ où $u_j = \exp\left(-\frac{\omega_{0j}}{kT}\right)$ avec $\omega_{0j} = \frac{e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r r_{0j}} * \exp(-\lambda r_{0j})$. Avec α le degré de dissociation, u_j l'interaction entre un groupement acide carboxylique et son voisin numéro j . Cette interaction u_j entre deux acides carboxyliques est fonction de l'énergie d'interaction électrostatique d'une paire d'ions (numérotés 0 et j) distants de r_{0j} (avec λ longueur de Debye, $\epsilon_0 \epsilon_r$ permittivité diélectrique du solvant, et e la charge élémentaire). Le modèle de Zhang et al. (1987) a le mérite d'être fondé sur des données structurales. Cependant il s'avère que le modèle converge jusqu'à $j=4$ voisins mais diverge pour j tendant vers l'infini, sans que les auteurs eux-mêmes puissent expliquer cette divergence. L'adaptation du modèle de Stigter (1975) considérant un cylindre chargé entouré d'une double couche de Gouy et Chapman n'est pas concluante non plus d'après Zhang et al. (1987). Enfin, ces différents auteurs (Zhang et al., 1987; Holzwarth, 1976) proposent une modélisation électrostatique seulement qualitative, puisqu'ils attribuent des valeurs différentes de pK_{intrinsèque} en fonction de la FI (cf. tableau 6.1), alors qu'une modélisation rigoureuse implique un pK_{intrinsèque} constant quelque soit la FI (la variation dans le pK_{apparent} en fonction de la FI devant alors être exclusivement modélisée par la loi choisie pour décrire l'effet électrostatique). En définitive il est clair qu'il existe des effets électrostatiques sur le xanthane, mais la question de leur modélisation reste ouverte. Le tableau 6.1 résume les résultats obtenus par les auteurs ayant travaillé sur les titrages acides bases du xanthane.

TABLE 6.1 Résultats des titrages acide/base de Holzwarth (1976) et Zhang et al. (1987)

		FI [mol/L]				
		0.01	0.02	0.05	0.1	0.2
pKa apparent	Zhang 1987a	3.25	3	2.75	2.6	ND
	Holzwarth 1976	3.2	ND	ND	ND	2.6
pKintrinsèque	Zhang 1987a	2.81	2.74	2.61	2.53	ND
	Holzwarth 1976	2.8	ND	ND	ND	2.6

ND: non déterminé

D'autre part aucun auteur n'a cherché à modéliser le xanthane comme le mélange de deux acides carboxyliques (pyruvique et glucuronique) ayant des concentrations fixées structurellement et des pKa différents (respectivement 2.26 et 3.05 pour FI=0.1M d'après [Martell and Smith \(2004\)](#)) ce qui est pourtant le modèle non électrostatique discret le plus simple et le plus cohérent structurellement qu'il conviendrait d'appliquer dans un premier temps aux données de titrage.

6.5.3 Titrages en présence de métaux

Alors que quelques études se sont intéressées à la réactivité acide base du xanthane, seulement deux études se sont focalisées plus récemment sur ses propriétés de complexation des métaux. Les travaux de [Woods et al. \(1992\)](#) se sont intéressés au comportement rédox de l'argent en présence d'éthyl-xanthane. Ils ne nous apportent pas d'information déterminante pour comprendre la sorption des métaux sur ce polysaccharide. Très récemment [Bergmann et al. \(2008\)](#) s'est intéressé à la complexation des cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} et Pb^{2+}) par le xanthane. Ce travail expérimental combine des titrages conductimétriques avec des études RMN. Les conclusions de [Bergmann et al. \(2008\)](#) sont que le xanthane adsorbe les cations divalents préférentiellement sur ses sites pyruviques, et non sur les sites glucuroniques. Les auteurs proposent même une structure chelatante entre deux pyruviques d'une même chaîne pour le complexe bipyruvique. Cependant, les propositions structurales émises sont à prendre avec beaucoup de précaution puisqu'aucune analyse de la caractérisation chimique du xanthane n'a été présentée (en particulier on ne connaît pas le taux de pyruvate du xanthane étudié, alors même que l'hypothèse des auteurs en terme de site de sorption impliquerait un groupement pyruvique sur chaque chaîne latérale -ce qui est rare-). Enfin malgré le nombre important d'expériences, [Bergmann et al. \(2008\)](#) n'a proposé aucun moyen d'évaluer les constantes thermodynamiques de complexations des métaux sur le xanthane (aucun titrage acide/base en présence de métaux, pas de mesure d'isotherme d'adsorption). Ces constantes étant des paramètres importants dans la compréhension de la sorption des métaux par le xanthane, il convient à des études futures de les évaluer (c'est ce que nous proposons de faire sur le système xanthane-cuivre). Toutefois, même si [Bergmann et al. \(2008\)](#) ne propose pas de valeur numérique pour les constantes de complexation des cations métalliques, ses résultats indiquent tout de même de façon qualitative que les métaux lourds (comme le cuivre, le cadmium et le plomb) sont plus fortement liés au xanthane que les cations légers majeurs (calcium, magnésium) et soutient que cette propriété pourrait avoir une importance écologique.

Chapitre 7

Matériel & Méthode

Le travail sur une molécule modèle impose des processus de purification et caractérisation poussés. Il est nécessaire de connaître le plus précisément possible la structure moléculaire de l'objet étudié, afin de permettre par la suite une modélisation des résultats expérimentaux la plus fine possible. Dans la suite du document, toute utilisation du mot xanthane, réfèrera au polysaccharide ayant subi le traitement préliminaire décrit ci-après.

7.1 Purification du xanthane

Le xanthane a été fourni par la société Rhodia (pureté 90%), et mis en solution dans l'eau distillée à 2g/L. Cette solution brute, encore riche en débris cellulaires, a été purifiée par 4 filtrations successives utilisant des filtres de plus en plus sélectifs : de 8 à 0.32 μm . Puis l'ajout de sel NaCl à la concentration 0.5M permet la neutralisation de la charge négative du polysaccharide et l'augmentation de la viscosité de la solution. Le xanthane est ensuite précipité par l'addition progressive d'éthanol à 96% -Merck p.a.- (environ jusqu'à volume égal de la solution saline). Dès l'apparition du précipité, le solide est récupéré par filtration. Finalement l'eau résiduelle est éliminée par 5 rinçages successifs à l'éthanol de plus en plus concentré (50% à 100%) puis lyophilisé.

7.2 Caractérisations CPG et RMN du xanthane

Comme nous l'avons vu lors de l'étude bibliographique, le xanthane peut présenter des variations dans sa structure moléculaire au niveau des taux d'acétates et de pyruvate présents par unité répétitive. Afin de déterminer le taux d'acétylation et de pyruvate dans notre xanthane, nous avons caractérisé sa structure chimique par Chromatographie en Phase Gaz (CPG), Résonances Magnétiques Nucléaires (RMN) du carbone ^{13}C et des protons ^1H , et spectroscopie Infra Rouge (IR). Les résultats les plus importants permettant l'affinement de la structure de notre échantillon de xanthane sont donnés par l'analyse des spectres CPG et RMN ^1H présentés ci-après.

7.2.1 Chromatographie Phase Gaz du xanthane

Protocole expérimental :

Hydrolyse du polysaccharide : Le xanthane solide est mis en solution dans de l'acide trifluoroacétique (TFA) 4N pendant 4h à 100°C afin de subir une hydrolyse acide, en présence d'une quantité connue d'inositol (étalon interne). Après l'hydrolyse acide, la solution est reprise dans environ 5 mL d'eau distillée puis évaporée à sec. Cette dernière opération est effectuée à plusieurs reprises (5 fois) jusqu'à ce que la solution soit neutre.

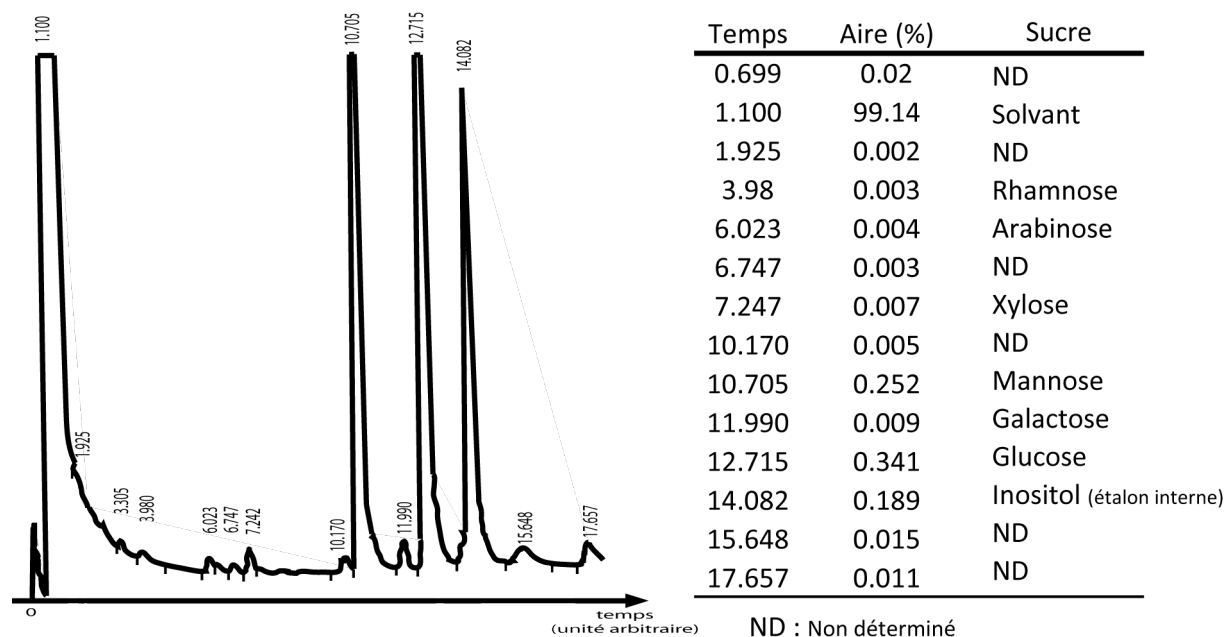


FIGURE 7.1 Résultats de la CPG pour les sucres neutres contenus dans l'échantillon de xanthane. Les deux oses majoritaires sont le glucose (Glc) et le Mannose (Man) -l'inositol étant l'étalon interne-. Le rapport expérimental $Man/Glc=0.745$

Réduction des oses : Après l'hydrolyse, les cétooses sont réduits en ositols par les hydrures de bore (Na^+, BH_4^-) en milieu basique (dans HO^-, NH_4^+) pendant 4h. Cette étape permet d'obtenir des alditols (oses réduits sous forme linéaire).

Acétylation des ositols : Finalement les ositols sont acétylés grâce à un excès d'anhydride acétique en milieu pyridine. Après solubilisation dans le chloroforme on obtient le mélange à passer en CPG.

Résultats :

Les résultats de la CPG sur les sucres neutres sont présentés en figure 7.1. Ils permettent de déterminer la quantité de chaque sucre neutre présent dans le xanthane. Les résultats donnent un rapport expérimental Mannose/Glucose=0.745. Ce rapport expérimentale est très fortement compatible avec la présence d'un acide pyruvique chaque $2N^{ème}$ unité répétitive, et donc la présence d'un mannose neutre en bout de chaîne chaque $2N+1^{ème}$ monomère. Le rapport Man/Glc serait alors théoriquement de 0.75 comme le montre la figure 7.2. D'autre part les résultats de CPG montrent que notre produit contient moins de 8% d'impuretés (résidus d'autres sucres : xylose, galactose, rhamnose, arabinose), ce qui confirme que le procédé de purification est bon.

7.2.2 Résonance Magnétique Nucléaire des protons

Protocole expérimental :

Le xanthane purifié a été mis en solution dans de l'eau distillée à 2g/L environ. Il a ensuite subi une dégradation par ultrason pendant 30 minutes, afin de réduire son PM, et d'obtenir des pics bien résolus en RMN. Le xanthane a ensuite été lyophilisé afin d'éliminer l'eau présente, avant d'être solvatisé dans l'eau lourde (D_2O) pour être analysé en RMN (sur un spectromètre Bruker AVANCE 400, au CERMAV).

Résultats :

Les résultats de RMN 1H (cf. figure 7.3) permettent de déterminer le taux de pyruvate et d'acétate par monomère de xanthane. Les protons aisément reconnaissables étant le proton anomérique du α -mannose ($\delta = 5.1$ ppm), et les protons des méthyles du pyruvate ($\delta = 1.3$ ppm), des acétates liés

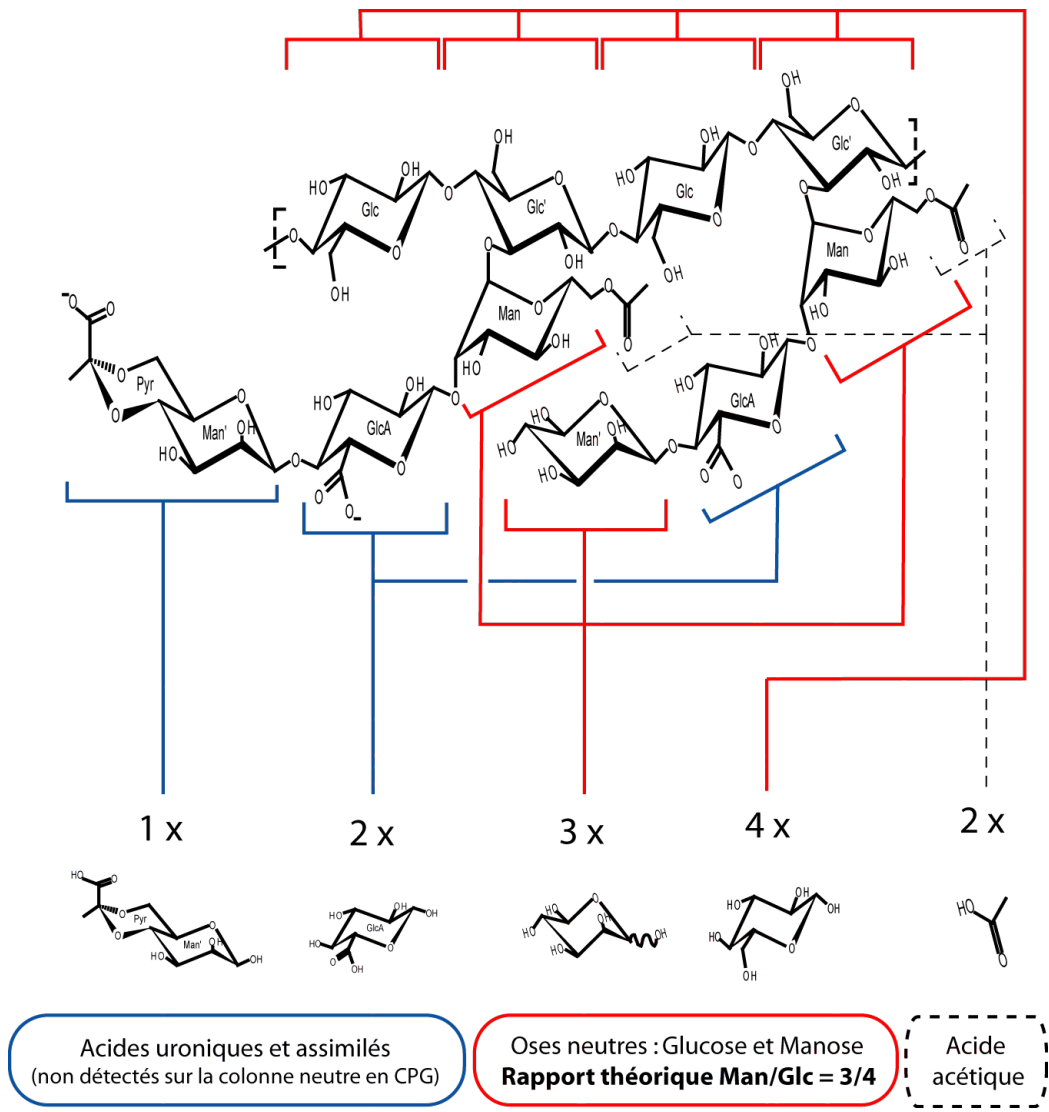


FIGURE 7.2 Bilan de l'hydrolyse acide du xanthane. Les liaisons éthers rompues lors de l'hydrolyse acide au TFA sont préférentiellement les liaisons affaiblies par la présence d'un oxygène en β , i.e. les liaisons entre deux sucres successifs et celles entre le sucre et les acétates. Les résultats expérimentaux montrent que les acides pyruviques ne sont pas détachés des mannoses auxquels ils sont liés par l'hydrolyse simple, cela nécessiterait une hydrolyse enzymatique spécifique (Laneville, 2004; Christensen and Smidsrød, 1991; Yalpani, 1988).

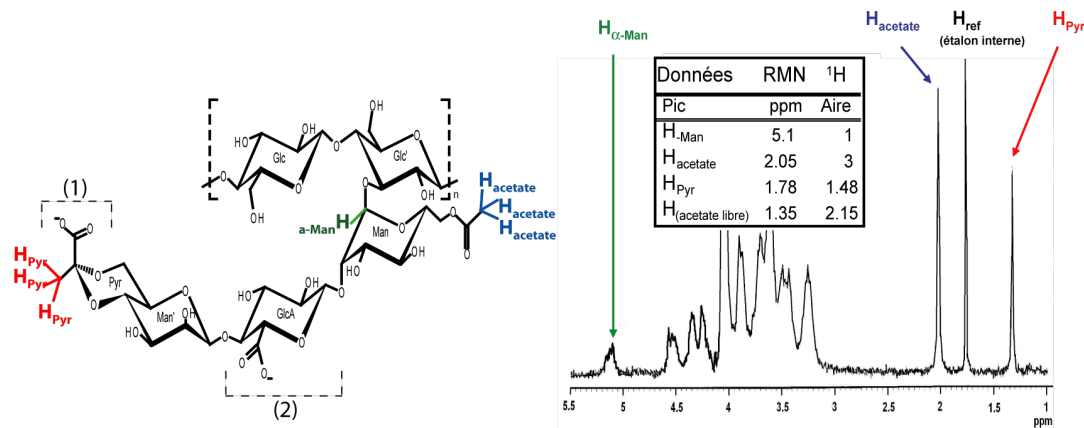


FIGURE 7.3 Structure chimique de l'unité répétitive du xanthane avec ses protons caractéristiques en RMN ¹H et spectre et données RMN ¹H. Dans notre échantillon de xanthane, l'acide glucuronique (2) -GlcA- est présent sur chaque monomère alors que l'acide pyruvique (1) -Pyr- n'est présent qu'un monomère sur deux.

($\delta = 1.75$ ppm) et des acétates libres ($\delta = 2.0$ ppm) (étalon interne). Les aires d'intégrations des pics assignés à ces protons particuliers nous permettent de conclure que notre échantillon de xanthane possède un groupement pyruvate un monomère sur deux, et un acétate sur chaque motif (cf. figure 7.3). Ces résultats confirment ceux de la CPG (présence de pyruvate une unité répétitive sur deux).

7.2.3 Conclusion sur la caractérisation chimique du xanthane

Les analyses chimiques effectuées sur notre échantillon purifié de xanthane permettent de préciser sa structure chimique. Le xanthane étudié présente un groupement acétate sur chaque α -mannose interne, et un groupement pyruvique en bout de chaîne latérale porté par le β -mannose seulement un motif sur deux. Nous pouvons ainsi calculer le PM du xanthane qui vaut 965 Da. 1 g/L de xanthane en solution correspond donc à une concentration en monomère de $1.036 \cdot 10^{-3}$ mol/L (que nous approximerons par la suite à 1 mmol/L). Ces informations caractéristiques seront très utiles lors de la modélisation de la réactivité du xanthane, et lors des calculs en modélisation moléculaire.

7.3 Titrages acidobasiques

7.3.1 Définition du mélange équivalent

Les caractérisations RMN et CPG du xanthane ont permis de conclure sur les taux d'acétate, de pyruvate et le PM de notre échantillon de xanthane. La présence des acides pyruviques (1 motif sur 2) et des acides glucuroniques (sur chaque motif) confère au xanthane ses propriétés acidobasiques. Le tableau 7.1 propose une synthèse des concentrations équivalentes en acides pyruviques, glucuroniques et monomères contenus dans une solution à 1 g/L de xanthane.

Lors de nos expériences de titrage, nous avons voulu comparer la réactivité du xanthane avec le mélange d'acides pyruviques et glucuroniques qui le constituent. Nous avons donc défini un mélange équivalent au xanthane en solution à 1 g/L. **Cette mixture équivalente sera notée «Mix» ou «Pyr+GlcA» dans la suite du manuscrit, et réfèrera à une solution aqueuse contenant 1 mmol/L d'acide glucuronique et 0.5 mmol/L d'acide pyruvique**, elle contient la même quantité de matière en acides pyruviques et glucuronique que celle présente dans une solution de xanthane à 1 g/L.

TABLE 7.1 Concentrations équivalentes en mmol/L correspondant à 1g/L de xanthane.

Entité	[] mmol/L (contenue dans une solution de xanthane à 1g/L)
Monomère	1
Acide glucuronique (GlcA)	1
Acide pyruvique (Pyr)	0.5
Concentration totale en groupements carboxyliques (Mix = Pyr+GlcA)	1.5

7.3.2 Protocole expérimental des titrages

50 mL d'une solution de 1 à 2 g/L de xanthane -ou de mélange équivalent Pyr+GlcA-, est placée sous agitation pendant 24h (temps nécessaire à l'hydratation du xanthane en solution) -ou 1h- dans 50 mL d'une solution de HNO₃ à 0.001 M (ou de NaOH à 0.001 M pour les "titrages retour") le tout dans un FI de NaNO₃ à 0.1 M, dans un réacteur fermé de 150 mL. Le FI est gardé constant tout au long de l'expérience à 0.1 M, ainsi que la température qui est maintenue fixée à 25°C ± 1°C grâce à un bain thermostaté. Chaque titrage s'effectue sous un flux continu d'argon, afin d'éviter la réaction de dissolution du dioxyde de carbone dans l'eau qui acidifierait le milieu (CO₂ + H₂O ⇌ H⁺ + HCO₃⁻). Une électrode pH (Methrom 6.0253.100) reliée à une interface informatique permet une mesure en continu du potentiel E de la solution. Ce potentiel E est relié à la concentration des protons libres en solution ([H⁺]) par l'équation de Nernst ([H⁺] = 10 ^{$\frac{E-E^{\circ}}{k}$} -voir détail au paragraphe suivant équation 7.3). Les valeurs de E° ≈ 410 mV et k ≈ -58 mV ont été préalablement estimées avec précision avant chaque titrage par une calibration de l'électrode pH sur au moins 20 points de mesure. Le dosage s'effectue par l'ajout de la base forte NaOH (ou de l'acide fort HNO₃ lors des "titrages retour") dans un FI en NaNO₃ à 0.1 M, via une burette (Metrohm, titrino 665) pilotée par une interface informatique. L'ajout suivant d'un volume de base de 0.1 mL est conditionné par une dérive du potentiel de l'électrode pH qui doit être inférieure à ± 0.1 mV avec une durée maximale de 15 minutes. Dans ces conditions, la durée moyenne de chaque expérience est de 8h.

Le protocole présenté ci-avant décrit les titrages effectués à FI constante en [NaNO₃] = 0.1 M. D'autres séries de titrages ont été réalisées à des FI différentes fixés à [NaNO₃] = 0.01 M et [NaNO₃] = 0.5 M. Selon le type de matériel et le FI considéré, 2 à 10 titrages ont été effectués. La figure 7.4 présente le montage expérimental utilisé lors des titrages.

7.3.3 Traitement des données

La concentration des protons relâchés par la surface réactive vers la solution, évaluée expérimentalement, est donnée par la concentration [H_S]_{exp} définie par l'équation 7.1 (Guine et al., 2006) (démontrée aux équations 6.6 à 6.17) :

$$[H_S]_{\text{exp}} = [H^+] - [H_0] - \frac{K_w}{[H^+]} + [HO^-]_{\text{burette}} \quad (7.1)$$

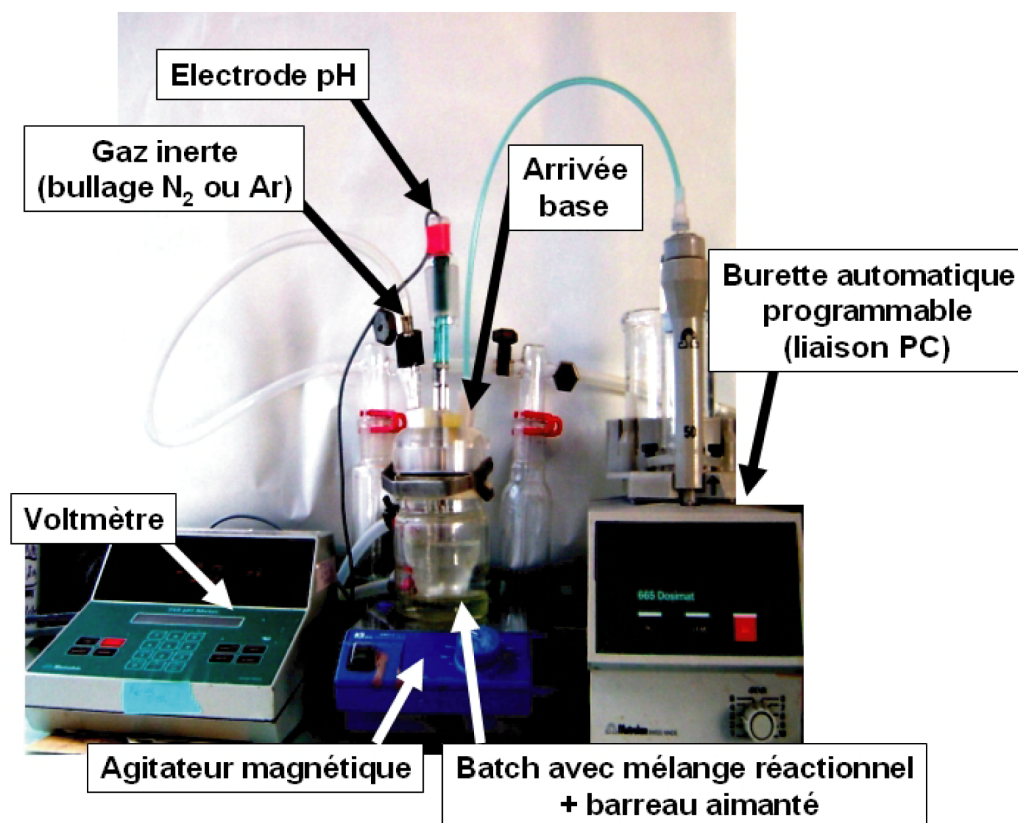


FIGURE 7.4 Montage expérimental pour la mesure des courbes de titrage.

Où les concentrations sont données en mol/L (ou M), avec :

- $[H_S]_{exp}$: la concentration en protons de surface, relargués par la surface réactive vers la solution. C'est l'inconnu que l'on cherche à déterminer.
- $[H^+]$: la concentration en ions hydroniums (protons libres) en solution accessible via la mesure du pH par l'électrode de verre.
- $[H_0] = \frac{v \times [H_{initial}]}{v_0 + v}$: la concentration en proton due à l'apport initial en acide fort ou base forte dans le cas d'un "titrage retour". $[H_{initial}] = 0.001$ M dans le cas d'un "titrage aller" et $[H_{initial}] = -0.001$ M dans le cas d'un "titrage retour". Avec v_0 le volume initial et v le volume de titrant ajouté au réacteur depuis le début du titrage.
- $K_W = 10^{-13.8}$: constante d'autoprotolyse de l'eau pour FI = 0.1 M. Le terme $\frac{K_w}{[H^+]}$ correspond aux protons consommés ou produits par l'autoprotolyse de l'eau, il est calculable en tout point du titrage.
- $[HO^-]_{burette} = \frac{v \times [Base]}{v_0 + v}$: la concentration en protons consommés par l'ajout du titrant provenant de la burette. $[Base] = 0.005$ M dans le cas d'un "titrage aller" (par une base forte) et $[Base] = -0.005$ M dans le cas d'un "titrage retour" (par un acide fort). Avec v_0 le volume initial et v le volume de titrant ajouté au réacteur depuis le début du titrage.

A partir de l'équation 7.1 il est possible de calculer $[H_S]$ point par point pour chaque valeur de pH expérimental. Les courbes $[H_S] = f(pH)$ ainsi obtenues représentent un diagramme de spéciation acide/base du matériel titré : on déduira de ces diagrammes le nombre de sites réactifs, leurs concentrations respectives ainsi que leurs pKa par la modélisation. Puisque $[H_S]_{initial}$ (la valeur de $[H_S]$ au point de départ du titrage) est difficile à évaluer expérimentalement, les courbes $[H_S] = f(pH)$ sont comparables à un facteur de calage ΔH_S près. Nous avons fixé arbitrairement la valeur $[H_S] = 0$ à

pH = 6 afin de comparer les courbes de relargage des protons obtenues.

Le coefficient d'activité de l'ion i en solution, défini par la relation $a(i) = \gamma_i * [i]$, où $a(i)$ est l'activité de l'ion i en solution et $[i]$ sa concentration, est déterminé, dans ce manuscrit, par la loi de Davies :

$$\log \gamma_i = -A * z_i^2 * \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - B * I \right) \quad (7.2)$$

Avec :

- A : Distance minimale d'approche ($\approx 0,5 \text{ mol}^{1/2}\text{L}^{1/2}$ dans l'eau).
- B : Paramètre fixé, tel que $B \in [2,3]$.
- z_i charge de l'ion i .
- $I = \frac{1}{2} * \sum c_i z_i^2$ force ionique (FI) de la solution en mol/L avec c_i concentration de l'ion i en solution en mol/L.

La FI étant maintenue constante tout au long du titrage, les coefficients d'activités sont constants, en particulier γ_{H^+} est constant. L'équation de Nernst donne alors :

$$\begin{aligned} E &= E^{00} + k \times \log (a(H^+)) \\ &= E^{00} + k \times \log (\gamma_{H^+} \times [H^+]) \\ &= \underbrace{E^{00} + k \times \log \gamma_{H^+}}_{E^\circ} + k \times \log [H^+] \end{aligned} \quad (7.3)$$

i.e. $E = E^\circ + k \times \log [H^+]$

Les valeurs typiques de E° et k sont respectivement 410 mV et -58 mV.

Tous les pH reportés dans cette étude réfèrent donc à la concentration en protons ($\text{pH} = -\log [H^+]$) et non à l'activité des protons.

Toutes les courbes de titrage ont été normalisées par rapport à la quantité de xanthane en solution ou par rapport à la quantité équivalente de xanthane (pour les titrages du mélange GlcA+Pyr) afin de permettre la comparaison des résultats des différents titrages entre eux.

7.3.4 Modélisation des titrages acide/base

7.3.4.1 Modélisation sans effet électrostatique

La modélisation acide/base, a d'abord été basée sur une approche non électrostatique, permettant de déterminer la concentration modélisée en protons de surface : $[H_S]_{\text{mod}}$, obtenue d'après l'équation 7.4 (cf. section précédente pour la démonstration). En première approximation, le xanthane est considéré contenir deux sites réactifs (acides glucuronique et pyruvique) ayant différentes concentrations totales T_j et différentes forces de liaisons des protons K_j (avec $K_j = \frac{[\text{site}_j^-][H^+]}{[\text{site}_j H]}$).

$$[H_S]_{\text{mod}} = \sum_{\text{sites } j} \frac{T_j}{1 + \frac{[H^+]}{K_j}} = \frac{T_1}{1 + 10^{pK_1 - \text{pH}}} + \frac{T_2}{1 + 10^{pK_2 - \text{pH}}} \quad (7.4)$$

Les valeurs des concentrations totales en sites pyruviques ($T_1 = 5 \text{ mmol/g}_{\text{xanthane}}$) et glucuroniques ($T_2 = 1 \text{ mmol/g}_{\text{xanthane}}$) ont été déduites des données RMN et CPG (cf. section 2.2.2). Les valeurs des deux pK_a associés à ces sites ont été ajustées. L'estimation du meilleur modèle a été obtenue en minimisant la somme des moindres carrés normalisée (Normalized Sum Square noté NSS) définie par l'équation sous Matlab™ 7.5 :

$$\text{NSS} = \frac{\sum_{\text{donnees}} ([H_S]_{\text{exp}} - [H_S]_{\text{mod}})^2}{\sum_{\text{donnees}} ([H_S]_{\text{exp}})^2} \quad (7.5)$$

7.3.4.2 Modélisation avec effet électrostatique

Pour modéliser l'effet de la force ionique sur les titrages acide/base du xanthane, la simple loi de Davies s'est révélée insuffisante. Lors de l'étude bibliographique, nous avons vu que les résultats acide/base en fonction de la FI ont déjà été décrits de deux façons par Zhang et al. (1987); Holzwarth (1976) qui ont introduit des effets électrostatiques, de manière très simple pour Holzwarth (1976) et plus physique chez Zhang et al. (1987). Nous avons modélisé les données de titrage acide/base en adaptant un modèle électrostatique simple à capacité constante aux caractéristiques structurales physiques (charge) et géométriques (double hélice) du xanthane.

Modèle structural du xanthane

Dans notre modèle, le xanthane est considéré comme une partie ordonnée en double (ou simple) hélice 5_1 et une partie désordonnée. Cette hypothèse est légitime dans le domaine de température et la haute FI employée lors de nos expériences ($T=25^\circ\text{C}$ et $[\text{NaNO}_3]=0.1\text{M}$, cf. étude bibliographique du chapitre précédent). La partie ordonnée en double hélice 5_1 , présentée à la figure 7.5, est assimilée à un cylindre de diamètre $D = 2 \text{ nm}$, d'une longueur de $h = 4.7 \text{ nm}$ par tour d'hélice (Moorhouse et al., 1977; Okuyama et al., 1980) et de charge surfacique σ créée par les charges négatives des carboxylates des acides pyruviques et glucuroniques à l'état déprotoné.

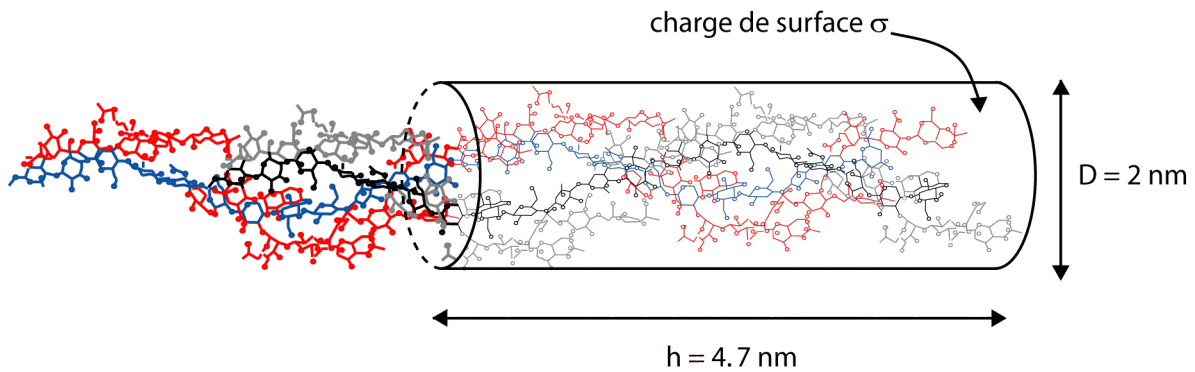


FIGURE 7.5 Caractéristique géométriques du cylindre contenant la double hélice 5_1 du xanthane. Adapté de Moorhouse et al. (1977); Okuyama et al. (1980).

Fort de ces considérations structurales, et connaissant la masse molaire d'un monomère du xanthane, nous pouvons calculer la surface spécifique du xanthane en conformation double (et simple) hélice 5_1 ainsi que la densité de charge maximale σ_{max} présente à la surface du cylindre (lorsque tous les groupements carboxyliques sont déprotonés). Le tableau 7.2 synthétise ces résultats.

Le condensateur cylindrique xanthane/FI

Nous avons ensuite assimilé les parties ordonnées du xanthane en hélice (simple ou double) à des portions cylindriques, jouant le rôle d'une plaque d'un condensateur cylindrique chargé négativement en solution, la seconde plaque du condensateur étant constituée par les contre ions positifs du FI (Na^+) qui entourent le xanthane en formant un cylindre concentrique au polyélectrolyte. La figure 7.6 schématise cette modélisation.

La capacitance de ce condensateur va dépendre de l'épaisseur $d=R_2-R_1$ du diélectrique (l'eau chargée en NaNO_3) entre les deux plaques et de sa permittivité ϵ_r . Pour les FI étudiées (variant de 0.01M à 0.5M) la permittivité relative de l'eau salée est connue pour très peu varier ($75 < \epsilon_r < 80$), et donc la capacitance du condensateur va principalement dépendre de la distance $d=R_2-R_1$ entre les plaques du condensateur, ainsi que de la géométrie cylindrique du condensateur.

TABLE 7.2 Caractéristiques géométriques et physiques (charge et surface spécifique) du xanthane à l'état ordonné en hélice 5_1

Dimensions du cylindre élémentaire			
h (hauteur en [m])	D (diamètre en [m])	S = πDh (surface en [m ²])	
$4.7 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-9}$	$2.95 \cdot 10^{-17}$	
Caractéristique massique d'un monomère de xanthane et nombre de site/monomère			
M_{mono} [g.mol ⁻¹] (masse molaire d'un monomère de xanthane)	965	Site_{mono} (nombre de site carboxylique par monomère)	1.5
Hélice simple		Hélice double	
n_{simple} (nombre de monomère par cylindre élémentaire)	5	n_{double}	10
M_{simple} = $M_{\text{mono}} \cdot n_{\text{simple}}$ [g.mol ⁻¹] (masse molaire du cylindre élémentaire)	4825	M_{double} = $M_{\text{mono}} \cdot n_{\text{double}}$ [g.mol ⁻¹]	9650
m_{simple} = $M_{\text{simple}} / \mathcal{N}_a$ [g] (masse du cylindre élémentaire)	$8.01 \cdot 10^{-21}$	m_{double} = $M_{\text{double}} / \mathcal{N}_a$ [g]	$1.60 \cdot 10^{-20}$
Site_{simple} = $\text{Site}_{\text{mono}} \cdot n_{\text{simple}}$ (nombre de site carboxylique par cylindre élémentaire)	7.5	Site_{double} = $\text{Site}_{\text{mono}} \cdot n_{\text{double}}$	15
Charge_{simple} = $-\text{Site}_{\text{simple}} \cdot e$ [C] (charge maximale contenue dans un cylindre élémentaire)	$-1.20 \cdot 10^{-18}$	Charge_{double} = $-\text{Site}_{\text{double}} \cdot e$ [C]	$-2.40 \cdot 10^{-18}$
S_{simple} = S / m_{simple} [m ² /g] (surface spécifique)	3685	S_{double} = S / m_{double} [m ² /g]	1842
σ_{max} = $\text{Charge}_{\text{simple}} / S$ [C/m ²] (densité de charge maximale à la surface d'un cylindre élémentaire)	-0.0407	σ_{max} = $\text{Charge}_{\text{double}} / S$ [C/m ²]	-0.0814

\mathcal{N}_a (nombre d'Avogadro) = $6.023 \cdot 10^{23}$

e (charge élémentaire en coulombs) = $1.602 \cdot 10^{-19}$ [C]

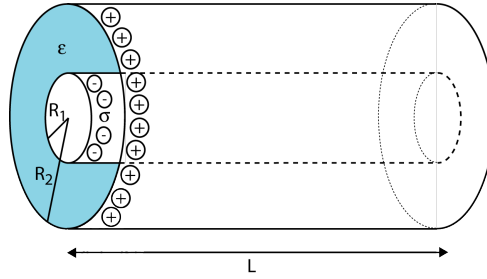


FIGURE 7.6 Condensateur cylindrique entre le xanthane (cylindre de rayon R_1 au centre négativement chargé avec la densité de charge σ) et les contre ions du FI (cylindre concentrique positivement chargé de rayon R_2). L'eau entre les plaques du condensateur a une permittivité diélectrique $\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r$.

La distance $d=R_2-R_1$ séparant les deux plaques de charges opposées en fonction de la FI peut être évaluée par la longueur de Debye λ_D . La longueur de Debye apparaît dans la théorie des solutions d'électrolyte ; elle y définit la longueur sur laquelle les ions présents en solution font écran au champ électrique, généré par une paroi chargée ou un colloïde. De manière équivalente, la longueur de Debye caractérise l'épaisseur de la double couche électrique, nom donné à la couche diffuse d'ions qui apparaît en vis-à-vis d'une surface chargée, porteuse d'une charge nette opposée à celle de la surface. Dans le modèle à capacité constante la longueur de Debye λ_D apparaît donc comme une valeur caractéristique de l'éloignement des deux plaques du condensateur considéré. La théorie de Debye résulte de la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann $\Delta\Psi = -\frac{q}{\epsilon_0\epsilon_r}$ (où Ψ est le potentiel électrostatique créé par la charge q dans le milieu de permittivité diélectrique $\epsilon_0\epsilon_r$). Appliquée aux électrolytes, la théorie permet d'établir la longueur de Debye (Stumm, 1992) :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_r kT}{\sum_i q_i^2 c_i^0}}$$

Avec :

- $\epsilon_0\epsilon_r$ la permittivité diélectrique du solvant.
- k constante de Boltzmann ($\approx 1.38 \cdot 10^{-23}$ [J/K]).
- T température en Kelvin.
- c_i^0 la concentration en ions de charge q_i à l'infini (i.e. loin de la charge écrantée, là où le champ électrique est nul). L'unité de c_i^0 dans la formule proposée est [ions/m³].

En considérant que c [ions/m³] = c [mol/L] * N_A * 10^3 ; l'application numérique pour une solution aqueuse de sel monovalent (type NaNO₃) à $T = 25^\circ\text{C}$, la longueur de Debye ne dépend plus que de la concentration en sel I , exprimée en mol/L :

$$\lambda_D \text{ [nm]} = \frac{0.3}{\sqrt{I \text{ [mol/L]}}}$$

A.N. :

- λ_D ($I=0.01\text{M}$) = 3.0 nm.
- λ_D ($I=0.1\text{M}$) = 0.95 nm.
- λ_D ($I=0.5\text{M}$) = 0.43 nm.

Calcul de la capacitance

Dans le modèle à capacité constante, l'idée est de dire que la double couche électronique considérée se comporte comme un condensateur, et que la relation suivante est vérifiée entre les armatures du condensateur :

$$|\Psi| = \frac{|\sigma|}{C} \quad (7.6)$$

Où :

- $|\Psi|$ est la valeur algébrique de la différence de potentiel électrique créé entre les deux plaques du condensateur [V].
- $|\sigma|$ est la valeur algébrique de la densité de charge sur une plaque du condensateur en coulombs par unité de surface [C.m^{-2}].
- C est la capacité surfacique du condensateur par unité de surface en Farad par unité de surface [F.m^{-2}].

Le calcul de la capacitance C nécessite donc la connaissance de Ψ . Dans la géométrie cylindrique abordée, le calcul de Ψ est simple via l'application du théorème de Gauss, variante intégrale de la première équation de Maxwell $\nabla \vec{E} = \frac{\rho}{\epsilon_0 \epsilon_r}$, avec \vec{E} le champ électrique [V/m] créé par la densité de charge ρ [C.m^{-3}] dans le milieu de permittivité diélectrique $\epsilon_0 \epsilon_r$.

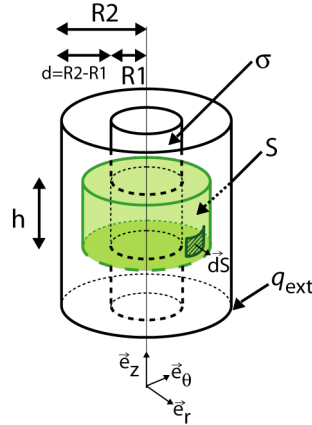


FIGURE 7.7 Application du théorème de Gauss pour le calcul du champ et du potentiel électrostatique créé par le condensateur cylindrique xanthane+FI

Appliquons le théorème de Gauss pour $R1 < r < R2$ sur la surface fermée S (en verte sur la figure 7.7) :

$$\oiint_S \vec{E} \cdot d\vec{s} = \frac{Q_{\text{int}}}{\epsilon_0 \epsilon_r} \Leftrightarrow E(r) * 2\pi h r = \frac{\sigma * 2\pi h R1}{\epsilon_0 \epsilon_r} \text{ d'où } E(r) = \frac{\sigma R1}{\epsilon_0 \epsilon_r} * \frac{1}{r}$$

Par définition, le champ électrostatique dérive du potentiel Ψ : $-\overrightarrow{\text{grad}}\Psi(r) = E(r)$. Nous pouvons donc calculer $\Psi(r)$ pour $R1 < r < R2$:

$$\underbrace{\Psi(r)}_{R1 < r < R2} - \Psi(R1) = - \int_{R1}^r E(r) dr = - \frac{\sigma R1}{\epsilon_0 \epsilon_r} [\ln(r)]_{R1}^r = - \frac{\sigma R1}{\epsilon_0 \epsilon_r} * \ln\left(\frac{r}{R1}\right) \quad (7.7)$$

Dans notre cas, la densité de charge σ est une quantité négative, donc $-\sigma = |\sigma|$. On peut calculer la différence de potentiel $|\Psi| = \Psi(R2) - \Psi(R1)$ d'après l'équation 7.7 :

$$\underbrace{\Psi(R2) - \Psi(R1)}_{=|\Psi|} = \frac{|\sigma| R1}{\epsilon_0 \epsilon_r} * \ln\left(\frac{R2}{R1}\right) \quad (7.8)$$

Succinctement, pour $r < R1$ le théorème de Gauss permet de conclure que le champ électrique est nul car la charge intérieure Q_{int} est nulle, le potentiel est donc constant et égal à $\Psi(R1)$. De même, pour $r > R2$, la charge intérieure est nulle puisque la charge cationique q_{ext} contenue sur la plaque externe du condensateur compense exactement la charge du cylindre interne (car par définition du condensateur $q_{ext} + \sigma * 2\pi R1 * L_{longueur\ du\ cylindre} = 0$). Le potentiel est donc constant et égal à $\Psi(R2)$.

Par identification entre les équations 7.6 et 7.8, nous déduisons finalement la capacité du condensateur par unité de surface :

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{R1} * \frac{1}{\ln\left(\frac{R2}{R1}\right)} \quad (7.9)$$

Puisque $R2 - R1 = d$, l'équation 7.9 se réécrit :

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{R1} * \frac{1}{\ln\left(1 + \frac{d}{R1}\right)} \quad (7.10)$$

Où :

- C [$F.m^{-2}$] est la capacitance par unité de surface du condensateur.
- $R1$ [m] est le rayon du cylindre interne du condensateur.
- d [m] est la distance entre les deux plaques cylindriques concentriques.
- $\epsilon_0 \epsilon_r$ [$F.m^{-1}$] la permittivité diélectrique du milieu.

A.N. : Nous pouvons donc finalement calculer la capacitance de notre condensateur xanthane/FI pour les différentes valeurs de FI, en prenant comme valeur :

- $R1 = 1 * 10^{-9}$ m (d'après [Okuyama et al. \(1980\)](#)).
- $d = \lambda_{D(I=0.01M)} = 3 * 10^{-9}$ m, $\lambda_{D(I=0.1M)} = 0.95 * 10^{-9}$ m, $\lambda_{D(I=0.5M)} = 0.43 * 10^{-9}$ m.
- $\epsilon_0 = 8.854 * 10^{-12}$ [$F.m^{-1}$].
- $\epsilon_r = 80$ pour l'eau à 25°C.

$$\begin{aligned} C_{I=0.01M} &= 0.51 \text{ [F.m}^{-2}\text{]} \\ C_{I=0.1M} &= 1.05 \text{ [F.m}^{-2}\text{]} \\ C_{I=0.5M} &= 1.98 \text{ [F.m}^{-2}\text{]} \end{aligned}$$

Compléments structuraux du modèle

Notre modèle d'inspiration structurale a finalement été complété par les résultats expérimentaux établis sur la variation de longueur de persistance q des hélices du xanthane. Nous avons évoqué dans la bibliographie que la longueur de persistance q de la double hélice du xanthane diminue quand la FI est faible. Ces variations restent modeste (inférieure à 10%) pour des FI supérieures à 0.005M (ce qui est notre cas). Pour [Sho et al. \(1986\)](#) la longueur de persistance maximale est de : $q_{max} = 106$ nm pour $FI > 0.1M$, et pour $FI = 0.01M$ on a alors $q = 0.9 * q_{max}$. Cette variation de la portion du xanthane modélisable comme un cylindre entraine donc une variation dans l'effet électrostatique associé. L'effet électrostatique induit par le condensateur cylindrique a été pondéré par l'introduction du paramètre β qui donne la fraction d'ordonnement du xanthane à chaque FI. D'après les résultats expérimentaux de [Sho et al. \(1986\)](#) nous avons fixé les valeurs de β pour les FI étudiées :

- $\beta = 1$ pour $I = 0.5M$ (tout le xanthane est ordonné).
- $\beta = 0.95$ pour $I = 0.1M$ (95 % du xanthane est ordonné, 5% désordonné).
- $\beta = 0.9$ pour $I = 0.01M$ (90 % du xanthane est ordonné, 10% désordonné).

Les parties désordonnées du xanthane ont été considérées ne pas créer d'effet électrostatique et ont été modélisées par un modèle non électrostatique. La figure 7.8 schématise le principe adopté.

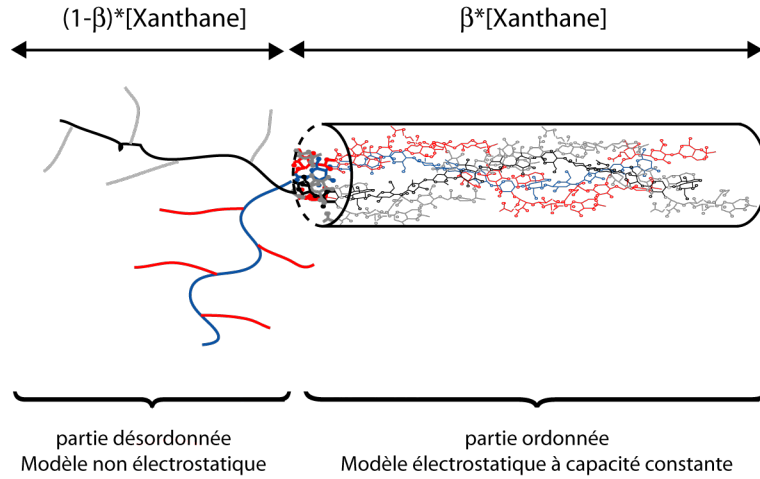


FIGURE 7.8 Schématisation des modèles adoptés pour les parties ordonnées et désordonnées du xanthane. Le facteur d'ordonnement $\beta \in [0.9; 1]$ va évoluer avec la FI.

Numérisation du modèle

Finalement, pour la partie électrostatique, nous pouvons préciser le terme électrostatique dans le cadre de notre modèle à capacité constante et en prenant en compte qu'une seule charge est échangée lors de la réaction acidobasique de déprotonation :

$$\frac{\Delta z F}{2.3 RT} \Psi = \frac{F}{2.3 RT} \frac{\sigma(\alpha)}{C(I)}$$

La charge de surface s'exprime simplement par le produit de la charge surfacique maximale pondérée par la portion de sites déprotonés : $\sigma(\alpha) = \sigma_{\max} \alpha$

Nos données ont donc été modélisées par le calcul suivant :

$$[H_S] = T_{site} * \left(\frac{\beta}{1 + 10^{pK_{intr} + \frac{F}{2.3 RT} \frac{\sigma(\alpha)}{C(I)} - pH}} + \frac{1 - \beta}{1 + 10^{pK_{intr} - pH}} \right) \quad (7.11)$$

7.4 Titrages en présence de cuivre et isothermes d'adsorption

7.4.1 Titration acidobasique en présence de cuivre

Les titrages acidobasiques en présence de cuivre (nommés *sorption edge* dans la littérature anglo-saxonne) ont été réalisés comme décrit à la section 2.2.3 en ajoutant au mélange réactionnel initial une quantité connue de cuivre sous forme d'une solution de $Cu(NO_3)_2$ (dans un FI fixé à 0.1 M en $NaNO_3$). Les expériences de *sorption edge* ont été réalisées pour trois concentrations totales initiales en cuivre différentes : $[Cu]_{tot} = 0.13$ mM (soit ≈ 8.5 ppm), $[Cu]_{tot} = 0.046$ mM (soit ≈ 3 ppm), $[Cu]_{tot} = 0.028$ mM (soit ≈ 1.8 ppm). Puisque nos expériences ont été réalisées pour des solutions contenant 1g/L de xanthane ou mélange équivalent, les concentrations totales en cuivre étaient : $[Cu]_{tot} = 0.13$ mmol/g, $[Cu]_{tot} = 0.046$ mmol/g et $[Cu]_{tot} = 0.028$ mmol/g. Le cuivre en solution a été mesuré en continu tout au long de chaque expérience grâce à une électrode spécifique au cuivre -Ionic Specific Electrode : ISE- (Metrohm 6.0502.140) et une électrode de référence Ag/AgCl (Metrohm, 6.0733.100) reliées à un système d'acquisition (interface informatique, logiciel Tiamo,

Metrohm). Avant chaque expérience, ces deux électrodes ont été calibrées avec au moins 6 points de mesure grâce à des solutions étalon de concentration connues $[\text{Cu}^{2+}]$. La figure 7.9 présente un exemple de courbe d'étalonnage de l'ISE au cuivre, avec les valeurs des potentiels E°_{Cu} (≈ 300 mV) et k_{Cu} (≈ 30 mV). L'utilisation de solutions standards ayant des concentrations connues en cuivre permet de calibrer l'ISE en concentration des ions Cu^{2+} et non en activité, de la même manière que nous l'avons fait pour le calibrage de l'électrode pH. L'équation de Nernst donne alors $[\text{Cu}^{2+}] = 10^{\frac{E_{\text{Cu}} - E^\circ_{\text{Cu}}}{k_{\text{Cu}}}}$

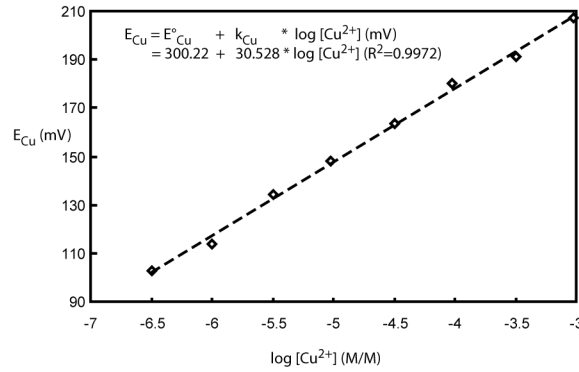


FIGURE 7.9 Courbe d'étalonnage de l'électrode spécifique au cuivre.

Connaissant à chaque pas la quantité totale de cuivre ajoutée et la quantité de cuivre libre en solution, il est possible de calculer la concentration en cuivre adsorbée sur le xanthane ou sa mixture équivalente par le bilan de matière 7.12 :

$$[\text{Cu}]_{\text{ads}} = [\text{Cu}]_{\text{tot}} - [\text{Cu}^{2+}]_{\text{aq}} \quad (7.12)$$

où $[\text{Cu}]_{\text{ads}}$ est la concentration de cuivre adsorbée donnée en mol/L et recalculée en mmol/g_{xanthane} ou eq. en fonction de la concentration en sorbant dans le réacteur (en g_{xanthane} ou eq./L) ; $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{aq}}$ est la concentration libre de cuivre en solution en mol/L ; $[\text{Cu}]_{\text{tot}}$ la concentration totale en cuivre ajouté au réacteur en mol/L, recalculée en mol/g_{xanthane} ou eq.

Deux réplicats ont été effectués pour chaque expérience sur le xanthane, tandis que les expériences sur le mélange équivalent, plus facilement reproductibles, n'ont pas été répliquées.

7.4.2 Isothermes d'adsorption du cuivre

L'affinité du cuivre sur le xanthane et son mélange équivalent Pyr+GlcA a été estimée par la mesure des isothermes d'adsorption. 50 mL d'une solution de xanthane à 1 ou 2 g/L (ou le mélange équivalent Pyr+GlcA) est préparée dans l'eau distillée et placée sous agitation dans un réacteur fermé de 150 mL pendant 24h, le tout dans un FI = 0.1 M en NaNO₃ (Sigma-Aldrich). Le réacteur est protégé de l'action du CO₂ grâce à un flux continu d'argon. La température du réacteur est maintenue constante à 25° ± 1° C. Un pHstat (718 Stat Titrino, Metrohm) est programmé pour maintenir le pH de la solution à une valeur fixe de 3.5 ± 0.1 ou 5.5 ± 0.1 en ajoutant un volume connu de NaOH (Fixanal, Sigma-Aldrich) à 0.10 M au réacteur à chaque fois que cela est nécessaire (le pH initial de la solution étant ≈ 2.8). Des volumes connus d'une solution de Cu(NO₃)₂·3H₂O, de concentration en $[\text{Cu}^{2+}]$ variant entre 1.10⁻³ M et 0.1 M, ont été successivement ajoutés au réacteur. Après équilibre (atteint après 5 minutes), dont la durée a été déterminée par nos expériences de cinétique (données non présentées), la concentration en cuivre libre ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{aq}}$) a été mesurée avec une électrode spécifique au cuivre (ISE, Methrohm 6.0502.140) et une électrode de référence Ag/AgCl

(Metrohm, 6.0733.100). Avant chaque expérience, ces deux électrodes ont été calibrées avec au moins 8 points de mesure. Le cuivre adsorbé est évalué de la même manière que lors des expériences de titrage en présence de cuivre (cf. paragraphe précédent). Deux répliqués ont été effectués pour chaque expérience.

7.4.3 Détermination de l'incertitude de nos mesures

Les incertitudes d'un résultat expérimental, pouvant être liées aux instruments de mesure et/ou à l'expérimentateur, doivent être estimées afin d'évaluer la justesse de ce résultat. En pratique, il existe deux façons d'évaluer l'incertitude d'un résultat liée à des mesures.

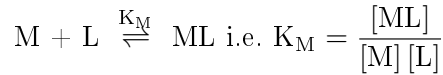
La première méthode utilise le calcul différentiel et nécessite une connaissance de l'erreur Δx de chaque grandeur x mesurée.

La deuxième méthode consiste à enregistrer un nombre important de mesures et à calculer la valeur moyenne des mesures ainsi que leur écart type.

Comme l'estimation des Δx n'est pas triviale dans notre cas, nous avons opté pour la deuxième méthode. Tous les résultats de titrages et d'isothermes sur le xanthane ainsi que les résultats des titrages acide/base et d'isothermes sur le mélange équivalent Pyr+GlcA ont été effectués en duplicata, à partir desquels il a été possible de déterminer une valeur moyenne et une erreur expérimentale pour chaque valeur de pH. Les seules expériences pour lesquelles un seul jeu de données est disponible sont les trois titrages du mélange équivalent Pyr+GlcA en présence de cuivre. Pour ces courbes l'erreur expérimentale a été estimée à $\pm 3\%$ pour la mesure du cuivre adsorbé, et à $\pm 10^{-4}$ mmol/g pour les concentrations en protons de surface.

7.4.4 Modélisation des isothermes de sorption du cuivre

La modélisation des isothermes de sorption du cuivre sur le xanthane a été réalisée en utilisant un modèle simple de Langmuir en ne considérant qu'un seul site d'adsorption du cuivre de stœchiométrie métal(M)/ligand(L) = 1/1 formant le complexe (ML) avec la force de liaison K_M :



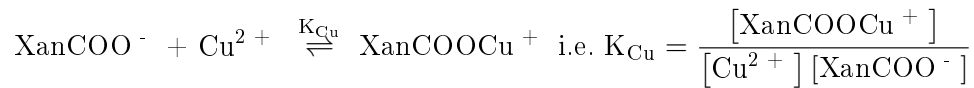
Le bilan de matière sur le ligand L nous permet alors de donner la relation liant la quantité de métal adsorbé [ML] à la concentration de métal en solution [M] (cf. equation 7.13) :

$$\begin{aligned} [L]_{\text{tot}} &= [L] + [ML] \\ \text{i.e. } [L]_{\text{tot}} &= \frac{[ML]}{[M] * K_M} + [ML] \\ \text{i.e. } [L]_{\text{tot}} &= [ML] \left(\frac{1 + [M] * K_M}{[M] * K_M} \right) \\ \text{d'où } [ML] &= \frac{[L]_{\text{tot}} [M] K_M}{1 + [M] * K_M} \end{aligned} \quad (7.13)$$

Dans l'hypothèse d'un complexe monodentate entre le cuivre et les sites carboxyliques du xanthane, 7.13 peut se réécrire 7.14 :

$$\log [\text{Cu}]_{\text{ads}} = \log [\text{Tot}_{\text{XanCOO}^-}] + \log [\text{Cu}^{2+}]_{\text{aq}} + \log K_{\text{Cu}} - \log (1 + [\text{Cu}^{2+}] * K_{\text{Cu}}) \quad (7.14)$$

Avec :



En notant $[\text{XanCOOCu}^+] = [\text{Cu}]_{\text{ads}}$ et $[\text{Tot}_{\text{XanCOO}^-}]$ la concentration totale en sites carboxyliques (acides pyruvique et glucuronique) du xanthane.

L'ajustement des constantes de complexation K_{Cu} modélisées s'est effectué par dichotomie via une routine de Newton-Raphson implémentée dans le logiciel de spéciation GRFIT ([Ludwig, 1992](#)).

7.5 Dichroïsme circulaire

Les changements conformationnels en fonction du pH ont été mis en évidence par des expériences de dichroïsme circulaire (CD), effectuées à l'Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, France. Les échantillons contenant des solutions de xanthane à 1g/L à pH 3, pH 7 et pH 11 dans un FI à 0.1 M en fluorure de potassium (KF) ont été explorés dans le domaine de longueur d'onde de 200 à 260 nm. Ces analyses ont été effectuées au LBM à l'IBS sur un dichrographe thermostaté CD6 JOBIN YVON, dans des cuves de chemin optique 0.1cm et 0.5cm.

Etant donné la complexité de la macromolécule étudiée, l'interprétation des spectres de CD reste qualitative, et se limite à l'évaluation de la hauteur, de la largeur et de l'intensité des pics caractéristiques.

Chapitre 8

Résultats

8.1 Titrages acidobasiques

8.1.1 Allure générale des courbes

Puisque nous dosons des acides carboxyliques (aussi bien dans le xanthane que dans le mélange équivalent), les courbes obtenues présentent un premier saut de $[H_S]$ pour des pH acides, car de manière générale, les acides carboxyliques ont un pK_a compris entre 3 et 5. Lors du titrage du xanthane, on observe un deuxième saut de $[H_S]$ à pH 10-11 (cf. figure 8.2). Ce deuxième saut n'est pas dû à la présence sur la molécule de groupements ayant un pK_a basique, mais il est créé par la déacétylation des α -mannose connue pour se produire vers pH 10-11. La réaction de déacétylation peut être vue selon la réaction présentée à la figure 8.1. Le bilan de la déacétylation consomme un ion hydroxyde (HO^-) ce qui est, dans notre bilan de proton, équivalent à la production d'un proton de surface (H_S).

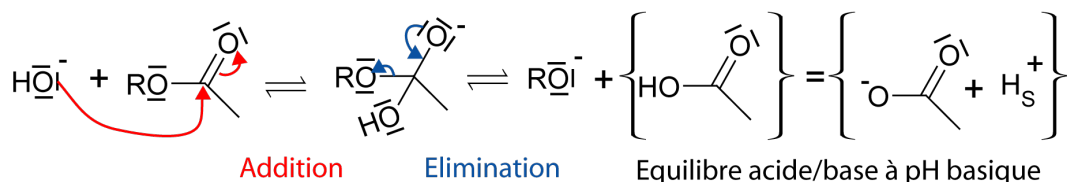


FIGURE 8.1 Production de proton de surface lors de la rupture d'une liaison acétate par hydrolyse basique.

Ainsi le deuxième saut de $[H_S]$ observé à pH 10-11 correspond à la déacétylation des mannoses internes. La valeur de $\Delta[H_S]$ observée entre pH 10 et pH 11 permet de déterminer la concentration totale en acétates contenus dans le xanthane : 1 mmol d'acétate par gramme de xanthane (cf. figure 8.2). Ce résultat préliminaire confirme bien celui obtenu lors de la caractérisation de notre produit par RMN 1H : chaque mannose interne est acétylé. La figure 8.2 résume cet information.

L'hypothèse des équilibres thermodynamiques a été validée par des titrages acide/base "aller-retour-aller", conduit d'un pH acide 2.75 à un pH basique inférieur à 10, puis du pH basique atteint à un pH acide ≈ 2.75 (toujours sur le même substrat), puis enfin à nouveau du pH acide atteint à un pH basique. La figure 8.3 montre que les courbes de titrage sont bien superposables, et donc que l'hypothèse des équilibres thermodynamique est validée. Il est à noter que la réaction de déacétylation n'est pas réversible, et donc que les titrages aller-retour poussés à des pH supérieur à 10 n'étaient pas superposables. D'autre part, nous avons fait descendre le temps de stabilisation entre deux points successifs lors du dosage acide/base aller-retour jusqu'à 10 minutes, ce qui indique que les équilibres

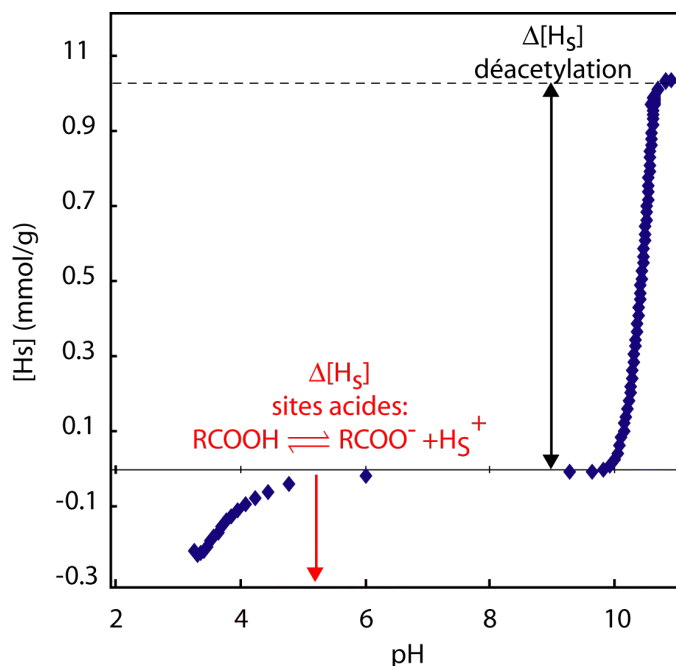


FIGURE 8.2 Allure générale d'une courbe de titrage acide/base du xanthane. On observe les deux sauts caractéristiques de $[H_S]$ en fonction du pH. Le premier saut à pH 3-5 correspond à la déprotonation des acides carboxyliques contenus dans la molécule; le second saut à pH 10-11 aux pseudo H_S créés lors de la déacétylation du xanthane.

sont atteints rapidement. Une étude approfondie des valeurs de dérive du potentiel pH lors du titrage nous permet de conclure que l'équilibre thermodynamique est atteint à $t < 5$ minutes lors des titrages acide/base.

Pour le mélange équivalent Mix = Pyr+GlcA on observe également en plus du site acide, un saut dans la courbe $[H_S]=f(\text{pH})$ pour des pH basiques de l'ordre de pH 9 avec une concentration totale d'environ 0.2 à 0.4 mmol/g eq. xanthane (cf. figure 8.5). Puisque nos produits commerciaux étaient purs à 99%, il ne peut pas s'agir d'une impureté contenue dans les produits, car alors la concentration totale du site à pK 9 due à l'impureté serait de 1% de 1mmol/g.eq.xan. soit 0.01mmol/g.eq.xan et ne serait donc pas visible lors du titrage. Nous en avons déduit que ce saut de $[H_S]$ à pH 9, correspondait à la rupture d'une liaison consommant un ion hydroxyde et produisant donc un pseudo proton de surface H_S dans le milieu (même principe que la déacétylation du xanthane). Pourtant, les acides pyruviques et glucuroniques utilisés dans le mélange sont connus pour être stable en solution, sans problème particulier rapporté pour des pH encore raisonnables de l'ordre de 9. La seule possibilité de rupture de liaison proviendrait alors de la destruction d'une molécule produite *in situ*. Il est en effet tout à fait envisageable que l'acide pyruvique réagisse sur l'acide glucuronique en milieu acide pour former un produit *in situ*, ou bien que les acides pyruviques et/ou glucuroniques se dimérisent à pH acide. L'hydrolyse basique de ces constructions moléculaires expliqueraient alors le relargage de protons observé à pH 9. En se basant sur des concepts de chimie organique simple, Vollhardt (2004); Warren (1982), concernant la protection des fonctions cétones par des diols en milieu acide $\text{C}=\text{O} + \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \xrightarrow{\text{H}^+} \text{C}(\text{OCH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O}$, on peut supposer la formation de produits *in situ* via la condensation de la cétone de l'acide pyruvique sur deux fonctions hydroxyles de l'acide uronique, comme le présente la figure 8.4 :

La vérification qu'une telle condensation a lieu *in situ* peut se faire par une étude de la bande d'adsorption de la cétone de l'acide pyruvique par spectroscopie IR. Si la réaction a lieu, la bande

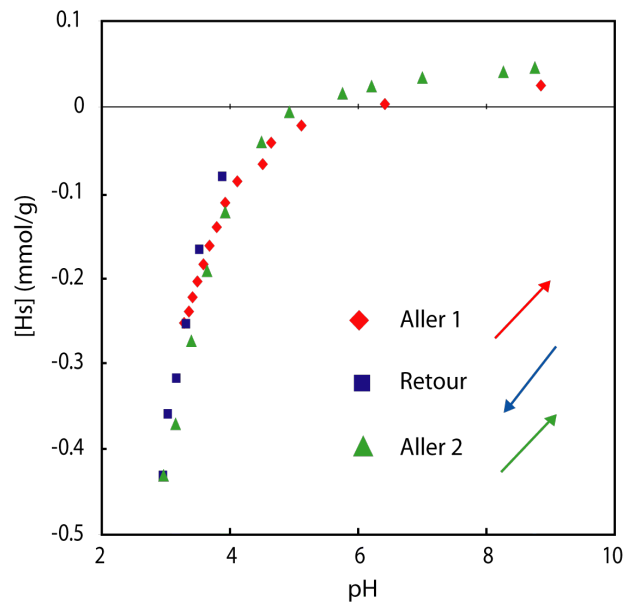


FIGURE 8.3 Titrage aller-retour-aller du xanthane avec un temps de stabilisation court entre deux point successif (10 min.). Les données expérimentales sont bien superposables, indiquant que l'hypothèse des équilibres thermodynamiques est valide pour $pH \in [2.75;8.5]$.

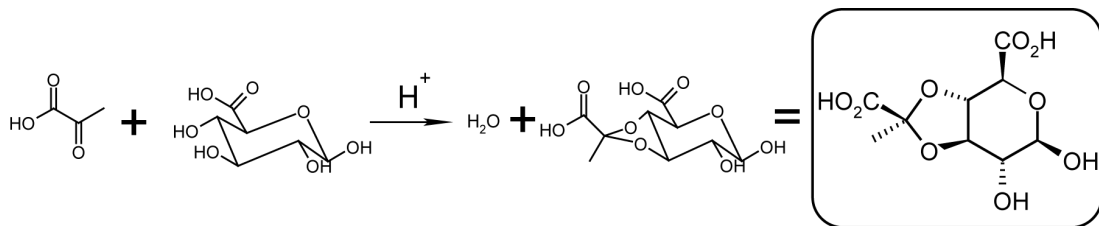


FIGURE 8.4 Réaction hypothétique de l'acide pyruvique sur l'acide glucuronique, selon la réaction de protection des cétones par les diols en milieu acide (Vollhardt, 2004; Warren, 1982). Le produit de cette condensation in situ pourrait ensuite être détruit par la réaction inverse de déprotection en milieu basique et donc relarguer des pseudo protons de surface H_S à pH 9.

caractéristique d'adsorption de la cétone doit diminuer ou disparaître. Bien que ces réactions soient hypothétiques, on peut tout de même estimer par comptage des protons relargués à pH 9 que cette réaction reste minoritaire. En effet, le relargage de proton à pH 9 est en moyenne de 0.3 mmol/g.eq.xan. (cf. figure 8.5) or le total des protons initialement mis en solution est de 1.5 mmol/g.eq.xan. Environ 20% de notre mélange équivalent Pyr+GlcA réagirait donc lors de la préparation de la solution en formant le diacide proposé en figure 8.4, puis libérerait un pseudo proton de surface lors de son hydrolyse à pH 9. Nous verrons par la suite qu'en terme de réactivité acide base cela ne change rien (puisque l'on a toujours autant de sites carboxyliques en solution), par contre, cela pourrait expliquer pourquoi nous trouvons des constantes de complexation du cuivre légèrement supérieures à celles reportées dans la littérature (car le diacide formé *in situ* peut avoir une constante de complexation du cuivre plus élevée que chaque monoacide carboxylique pris séparément).

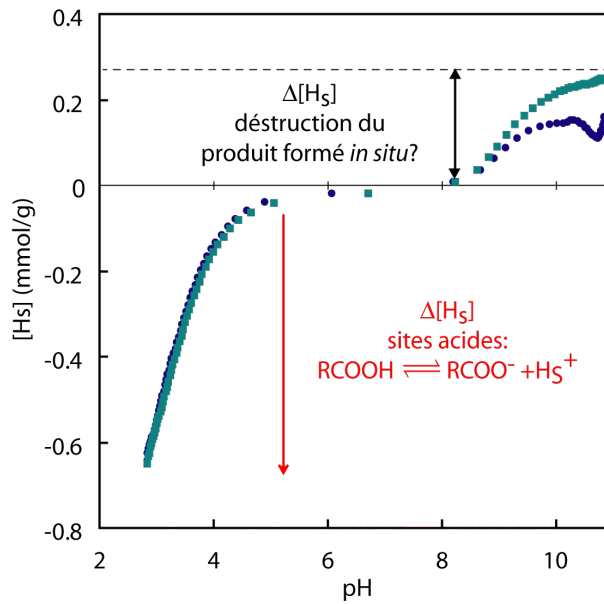


FIGURE 8.5 Allure générale d'une courbe de titrage acide/base du mélange équivalent Pyr+GlcA. On observe les deux sauts caractéristiques de $[H_S]$ en fonction du pH. Le premier saut à pH3-5 correspond à la déprotonation des acides carboxyliques contenus dans le mélange; le second saut à pH8-10 aux pseudo H_S créés lors de la rupture de liaisons formées *in situ*.

8.1.2 Titration du mélange équivalent Pyr+GlcA en fonction de la force ionique - Modélisation à un et deux sites discrets sans effet électrostatique.

La figure 8.6 présente les résultats des titrages acide base du mélange équivalent Pyr+GlcA pour différentes FI en NaNO₃ : I=0.01M, I=0.1M et I=0.5M et leur modélisation. Le tableau 8.1 synthétise les résultats des modélisations.

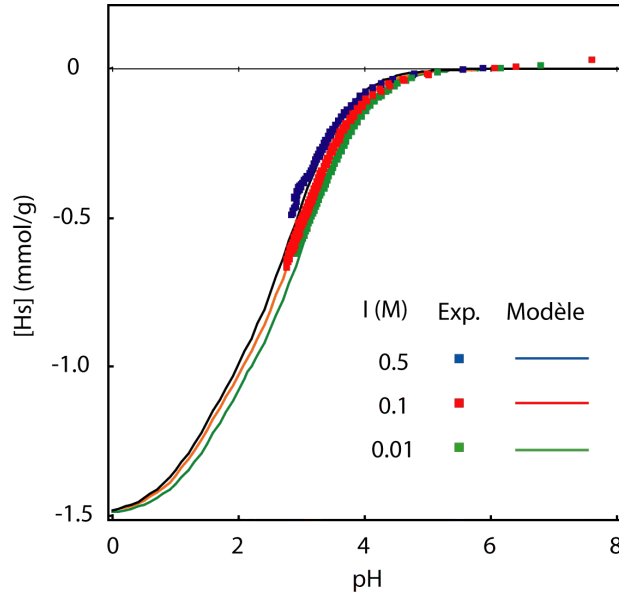


FIGURE 8.6 Titrages et modélisation du mélange équivalent $Mix = Pyr + GlcA$ en fonction de FI. La variation des pK_a apparents est bien décrite par la loi de Davies.

TABLE 8.1 Résultats des modélisations des titrages acide/base du mélange équivalent $Pyr + GlcA$

Modélisation	pK	I (M)		
		0.01	0.1	0.5
1 site [T _{site}] = 1.5 mmol/g	pK _{apparent}	2.77	2.74	2.53
2 sites [T ₁] = 0.5 mmol/g [T ₂] = 1 mmol/g	pK ₁	1.59	1.47	1.41
	pK ₂	3.15	3.02	2.96
	pK _{moyen}	2.63	2.50	2.44

La première modélisation à un seul site sans effet électrostatique a permis d’obtenir les valeurs de pKa apparents en fonction de la FI. Ainsi la première conclusion est que l’effet de la FI sur le mélange Pyr+GlcA reste limité : les variations de pKa apparents sont de 0.24 unité pH entre les FI extrêmes (0.01M et 0.5M). Cette variation expérimentale de pKa apparent est tout à fait compatible avec la loi de Davies (rappelée en figure 8.7) qui prévoit une diminution de 0.19 unité pH des pKa pour une FI variant de 0.01M à 0.5M. La figure 8.7 montre la variation expérimentale du pKa de différents acides carboxyliques en fonction de la FI (Martell and Smith, 2004) et la variation théorique prédite par la loi empirique de Davies (dont l’expression déjà donnée à l’équation 7.2 est rappelée en figure 8.7).

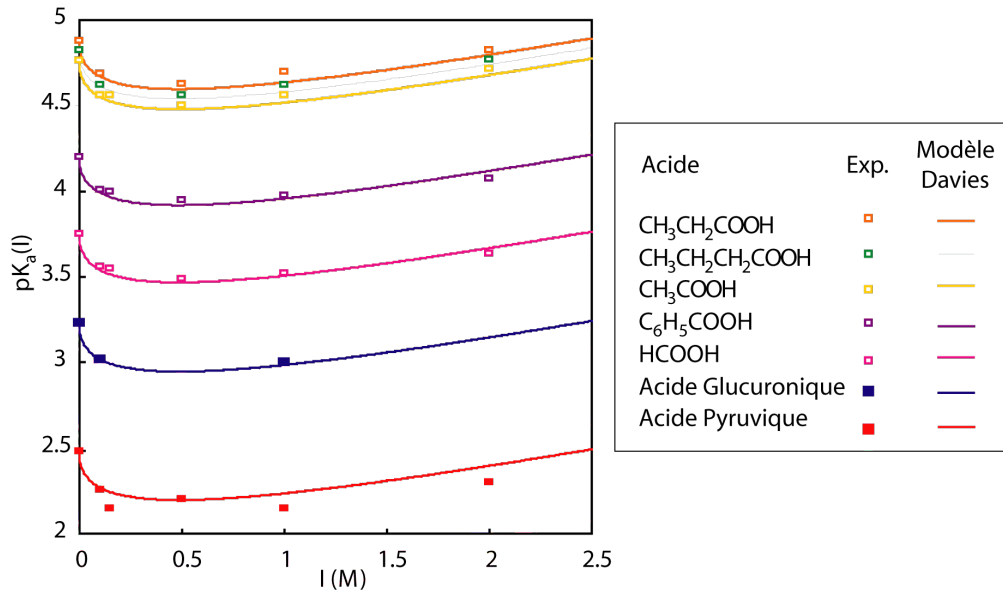


FIGURE 8.7 Evolution du pK_a de quelques acides carboxyliques simples en fonction de la FI. Les données expérimentales (Exp.) sont celles de [Martell and Smith \(2004\)](#) et les modélisations suivent la loi de Davies $\log \gamma_i = -A * z_i^2 * \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - B * I \right)$ avec : A : Distance minimale d'approche ($\approx 0,5 \text{ mol}^{1/2} \text{ L}^{1/2}$ dans l'eau), B : Paramètre fixé, tel que $B \in [0.2; 0.3]$, ici $B=0.25$, z_i charge de l'ion i , ici $z=1$ et $I = \frac{1}{2} * \sum c_i z_i^2$ force ionique (FI) de la solution en mol/L avec c_i concentration de l'ion i en solution en mol/L. Les constantes de réactions aux différentes FI peuvent se calculer à partir de la constante pour $I=0(M)$: $K_a(I) = \frac{\gamma_{H^+} [H^+] * \gamma_{A^-} [A^-]}{[HA]} = \gamma_1 * \gamma_1 * \frac{[H^+] * [A^-]}{[HA]} = \gamma_1^2 * K_a(I=0)$. Rem : la loi de Davies est généralement applicable avec la formule rappelée ci-avant jusqu'à $I=0.5$, or pour les acides carboxyliques simples étudiés, cette loi reste valable jusqu'à $I=2$.

La deuxième modélisation a donc considéré le mélange Pyr+GlcA comme 2 sites discrets de pK_a distincts, en considérant que l'effet électrostatique est pris en compte par la loi de Davies. Les valeurs des pK_a de l'acide glucuronique (3.02) et pyruvique (2.26) pour $I=0.1M$ tabulées par [Martell and Smith \(2004\)](#) ont été prises comme valeurs initiales des pK pour lancer l'algorithme de recherche de la meilleure solution de modélisation. Il s'avère que le pK_a modélisé de l'acide glucuronique respecte bien les valeurs tabulées, tandis que le pK_a de l'acide pyruvique reste trop élevé pour obtenir de bons fits. Les solutions les meilleures sont obtenues pour des pK_a de l'acide pyruvique très basses, autour de 1.5. Cette tendance semble être un argument supplémentaire justifiant que l'acide pyruvique contenu dans le mélange Pyr+GlcA n'est plus sous sa forme libre CC(=O)C(=O)O, mais lié à d'autres constituants moléculaires stabilisant le carboxylate, et engendrant donc un pK_a plus acide qu'attendu.

En résumé, le mélange Pyr+GlcA est légèrement plus acide qu'attendu ([Martell and Smith, 2004](#)), par contre l'évolution en fonction de la force ionique (FI) respecte très bien la loi de Davies, rappelée en figure 8.7. Nous avons donc affaire à des molécules dissoutes, sans développement d'effet électrostatique.

8.1.3 Titration du xanthane en fonction de la force ionique - Modélisation à un seul site avec effet électrostatique.

La figure 8.8 présente les résultats des titrages du xanthane pour différentes FI en NaNO_3 : $I=0.01\text{M}$, $I=0.1\text{M}$ et $I=0.5\text{M}$ et leur modélisation par notre modèle à capacitance constante présenté à l'équation 7.11 (cf. section 5.3.4.2). L'effet de la FI sur le xanthane est beaucoup plus sensible que sur le mélange équivalent Pyr+GlcA. Nous avons modélisé les données expérimentales en fixant le $\text{p}K_{\text{intrinsèque}}$ du système à $\text{p}K_{\text{intr}} = 2$, en fixant les capacitances précédemment calculées par l'équation 7.10 : $C_{I=0.01\text{M}} = 0.51 \text{ [F.m}^{-2}\text{]}$, $C_{I=0.1\text{M}} = 1.05 \text{ [F.m}^{-2}\text{]}$, $C_{I=0.5\text{M}} = 1.98 \text{ [F.m}^{-2}\text{]}$, et en ajustant la surface spécifique S entre 1842 et $3685 \text{ m}^2/\text{g}$ comme calculé au tableau 7.2. Les fits conduisent à des valeurs de S de $= 2850 \text{ m}^2/\text{g}$, notre modèle considère donc qu'environ la moitié du xanthane ordonné est sous forme de double hélice, et le reste sous forme d'hélice simple. Le modèle à capacitance constante d'inspiration structurale proposé permet une excellente modélisation du système pour les FI $I=0.01\text{M}$ et $I=0.1\text{M}$ (cf. figure 8.8). Le modèle évolue dans le bon sens pour la FI la plus élevée ($I=0.5\text{M}$) même si la capacitance de 1.98 F.m^2 n'est alors pas suffisante pour bien reproduire les données. La capacitance du xanthane pour $I=0.5\text{M}$ doit être ajustée au dessus de 4 F.m^2 pour obtenir un fit satisfaisant. Notre modèle ne serait donc pas applicable pour de trop hautes FI ($I>0.2\text{M}$). Le tableau 8.2 synthétise les résultats des modélisations.

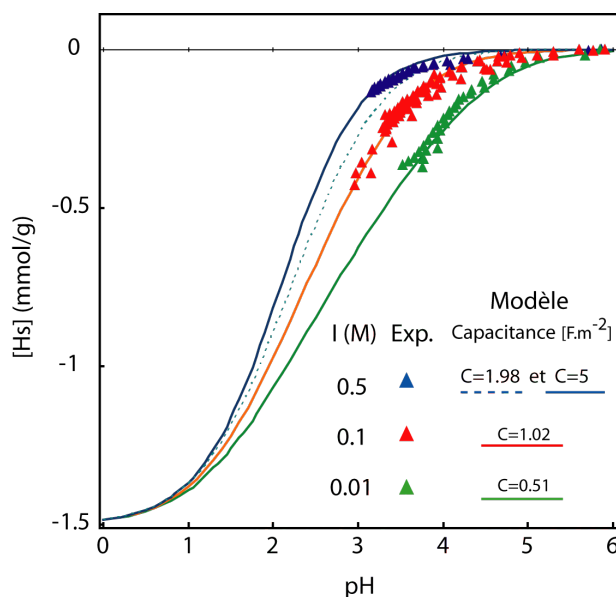


FIGURE 8.8 Titrages du xanthane en fonction de FI. Modélisation par le modèle cylindrique à capacité constante paramétré structurellement.

TABLE 8.2 Résultats des modélisations des titrages acide/base du xanthane en fonction de la FI, par le modèle structural à capacitance cylindrique. Le paramètre structural β est défini au chapitre précédent.

	Modélisations structurales			Modèle avec ajustement de la capacitance
I (M)	0.01	0.1	0.5	0.5
$\text{p}K_{\text{intr}}$	2	2	2	2
β	0.9	0.95	1	1
C [F.m^{-2}]	0.51	1.02	1.98	5
S [$\text{m}^2.\text{g}^{-1}$]	2850	2850	2850	2850

8.1.4 Comparaison du xanthane et du mélange équivalent d'acides pyruvique et glucuronique - Modélisation à deux sites discrets sans effets électrostatiques.

Afin de pouvoir définir une FI de travail pour les expériences d'adsorption du cuivre sur le xanthane et le mélange équivalent Pyr+GlcA, nous avons comparé tous les titrages acide/base. Il apparaît alors que la FI pour laquelle la réactivité acide/base du mélange équivalent Pyr+GlcA est la plus proche de la réactivité du xanthane est $I=0.1M$ (cf. 8.9).

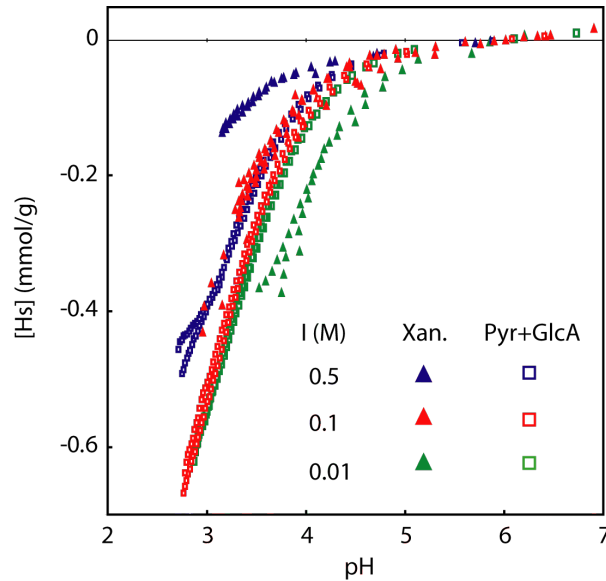


FIGURE 8.9 Comparaison des titrages du xanthane et du mélange équivalent Pyr+GlcA aux différentes FI.

En se plaçant à cette FI fixée ($I=0.1M$), les pK apparents entre xanthane et Pyr+GlcA sont très proches (cf. triangles et carrés rouge de la figure 8.9). La constante intrinsèque très basse du xanthane est alors compensée par l'effet électrostatique. Cette compensation donne une réactivité acide/base apparente très similaire au mélange Pyr+GlcA. De ce fait, nous nous sommes permis de modéliser le xanthane à $FI=0.1M$ sans effet électrostatique en utilisant les constantes apparentes. Nous avons donc modélisé les données acide/base des titrages de xanthane à $I=0.1M$ par un modèle non électrostatique à deux sites discrets de concentrations totales connues ($T_1 = 0.5$ mmol/g et $T_2 = 1$ mmol/g, fixées d'après les résultats de la caractérisation du xanthane) et nous avons cherché le meilleur couple (pK_1, pK_2) pour lequel l'erreur NSS est minimale. La figure 8.10 propose une vision graphique de la meilleure solution qui est le couple ($pK_1 ; pK_2$)=(1.85 ;2.82)

La figure 8.11 présente les résultats très proches des titrages acide/base du mélange équivalent Pyr+GlcA et du xanthane pour FI fixée à $0.1M$ en $NaNO_3$ et leur modélisation par modèle non électrostatique à deux sites discrets. Le tableau 8.3 synthétise les résultats des modélisations obtenues à $I=0.1M$ sur le xanthane et le mélange Pyr+GlcA. En définitive, le xanthane et le mélange équivalent d'acides pyruvique et glucuronique ont une réactivité acide/base très proche pour une FI fixée à $0.1M$, et sont en première approximation modélisables par un monoacide de concentration totale $T = 1.5$ mmol/g eq. xan. et de $pK_{a\text{apparent}} = 2.5$.

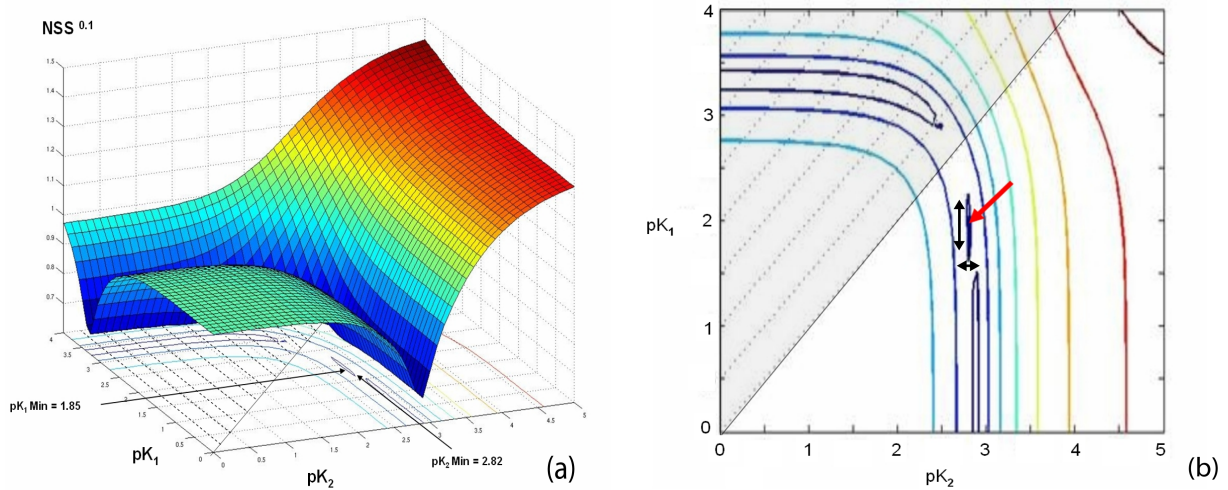


FIGURE 8.10 Modélisation acide/base à deux sites discrets non électrostatiques présentée en carte topographique de NSS en 3D (a) -à gauche- et 2D (b) -à droite-. La concentration totale des sites est fixée grâce aux données structurales : $T_1 = 0.5 \text{ mmol.g}^{-1}$ et $T_2 = 1 \text{ mmol.g}^{-1}$. Les solutions dans l'aire grisée sont exclues pour des raisons chimiques et structurales ; les solutions acceptables doivent vérifier $T_1 < T_2$ et $pK_2 > pK_1$ (i.e. $pK_{\text{Pyr}} < pK_{\text{GlcA}}$). Le meilleur fit est atteint pour $pK_1 = 1.85$ et $pK_2 = 2.82$ (flèches dans (a) et (b)). Ces valeurs sont relativement proches de celles de l'acide pyruvique et de l'acide glucuronique tabulées par [Martell and Smith \(2004\)](#) (valant respectivement 2.26 et 3.02 pour $I=0.1M$). Les doubles flèches sur la figure (b) indiquent l'incertitude sur les pK modélisés : l'incertitude sur le pK_2 (± 0.2) -le plus acide- est plus grande que celle sur pK_1 (± 0.01)

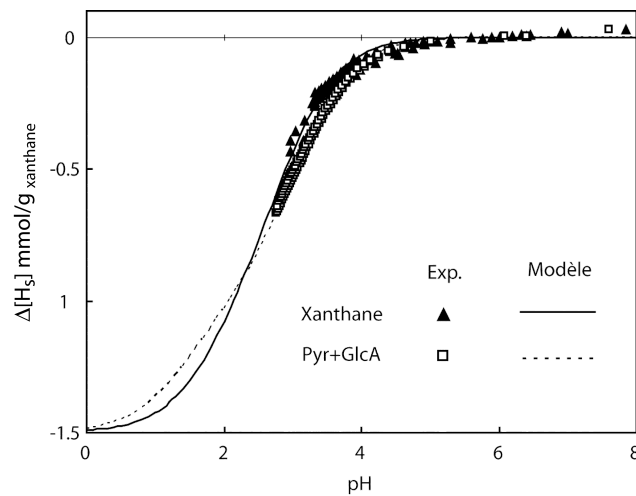


FIGURE 8.11 Comparaison des titrages du xanthane et du mélange équivalent Pyr+GlcA à FI fixé=0.1 M, et modélisation non électrostatique à deux sites discrets.

TABLE 8.3 Résultats des modélisations des titrages acide/base du xanthane et du mélange Pyr+GlcA à FI fixée=0.1M, par modélisation non électrostatique à deux sites discrets de concentrations totales respectives : $T_1=0.5\text{mmol.g}^{-1}$ and $T_2=1\text{mmol.g}^{-1}$.

Modélisation	pK_1	pK_2	pK_{moyen}	NSS
Hs Pyr+GlcA ajusté	1.47	3.02	2.50	0.003
Hs Xan theorique	2.26	3.02	2.77	0.024
Hs Xan ajusté	1.85	2.82	2.50	0.021

8.2 Titrages acide-base en présence de cuivre

Les titrages acide/base en présence de cuivre ont permis de déterminer la fraction de cuivre adsorbée en fonction du pH. La figure 8.12 montre clairement que le xanthane complexe plus de cuivre que la mixture équivalente Pyr+GlcA pour tout $\text{pH} < 6$ (i.e. avant la précipitation de l'hydroxyde de cuivre) :

- Pour une même concentration totale en cuivre, le saut d'adsorption du à l'hydrolyse du cuivre (formation de $\text{Cu}(\text{OH})_{2(s)}$) se produit à un pH plus acide ($\text{pH} \approx 6$) pour le mélange Pyr+GlcA que pour le xanthane (où la précipitation a lieu pour $\text{pH} \approx 7$). En d'autres termes, la saturation en cuivre conduisant à la formation de $\text{Cu}(\text{OH})_{2(s)}$ est atteinte plus tôt pour le mélange Mix+Cu que pour le mélange xanthane+Cu. Ainsi, à un $\text{pH} < 6$ donné, il reste moins de cuivre libre en solution dans le mélange xanthane+Cu que dans le mélange Mix+Cu, on peut donc conclure qualitativement que **le xanthane est un meilleur complexant du cuivre que le mélange équivalent des acides pyruviques et glucuroniques**.
- Pour les $\text{pH} < 6$, le xanthane adsorbe plus de cuivre que le mélange équivalent Pyr+GlcA (ou Mix). Il est donc clair que "l'effet coopératif" ou "multivalence" joue un rôle dans la formation des complexes xanthane+Cu. Ces derniers ne peuvent pas être de simples répliques des complexes GlcA+Pyr+Cu. On peut alors supposer la formation de complexes chélatants lors de l'adsorption du cuivre par le xanthane (les complexes chélatants étant connus pour avoir des constantes thermodynamiques d'équilibres plus élevées que les complexes simples -cf. Partie I, chapitre 4-).
- Pour le mélange équivalent Pyr+GlcA, on observe que la capacité d'adsorption du cuivre augmente en fonction du pH (i.e. la fonction $[\text{Cu}_{\text{ads}}]=f(\text{pH})$ est croissante). Ce comportement est classique en thermodynamique, le nombre de sites carboxylate augmentant avec le pH, et les ions Cu^{2+} se fixant sur les sites déprotonés, la thermodynamique des équilibres en solution aqueuse prévoit que la fonction décrivant le cuivre adsorbé en fonction du pH sera nécessairement croissante. **Pour les expériences xanthane+Cu, on observe une chute de l'adsorption du cuivre entre pH 3.5 et 6.** Ce comportement est tout à fait reproductible à différente concentration en cuivre. Alors que l'augmentation d'adsorption du cuivre jusqu'à pH 4 s'explique aisément : elle est liée à l'augmentation des sites déprotonés dans la molécule de xanthane (on produit de plus en plus de carboxylates quand le pH augmente, et les sites ainsi déprotonés complexent le cuivre), **la chute d'adsorption à pH 5.5 est un comportement original**, jamais rapporté dans la littérature. Les modèles de thermodynamique classique semblent au premier abord ne pas pouvoir modéliser une telle chute d'adsorption à pH neutre.

La figure 8.13 présente les résultats d'adsorption du cuivre corrélés avec ceux d'échange des protons de surface H_S pour le xanthane et le mélange Pyr+GlcA à différentes concentration totales en cuivre (de 0.028 mmol/g à 0.13 mmol/g). Nous avons également représenté les modélisations des relargages des protons en utilisant les valeurs de pKa déterminées par les titrages acide/base (sans cuivre). Il apparaît clairement que l'augmentation de l'adsorption du Cuivre par le xanthane avant pH 4 est liée à la déprotonation des sites carboxyliques (les courbes $\% \text{Cu}_{\text{ads}}=f(\text{pH})$ et $[\text{H}_S]=f(\text{pH})$ augmentent simultanément). Par contre, la chute d'adsorption à pH 5.5 n'est pas corrélée avec un échange de proton, puisqu'au moment de la désorption du cuivre sur le xanthane, la courbe de $[\text{H}_S]$ en fonction du pH est relativement plate.

Nous avons représenté la modélisation de l'adsorption du cuivre par le mélange Pyr+GlcA en utilisant les constantes de la littérature ($\text{PyrCOO}^- + \text{Cu}^{2+} = \text{PyrCOOCu}^+$ $\log K_{\text{PyrCu}}=1.64$ et $\text{GlcCOO}^- + \text{Cu}^{2+} = \text{GlcCOOCu}^+$ $\log K_{\text{GlcCu}}=1.44$, pour $I=0.1\text{M}$ d'après [Martell and Smith \(2004\)](#)).

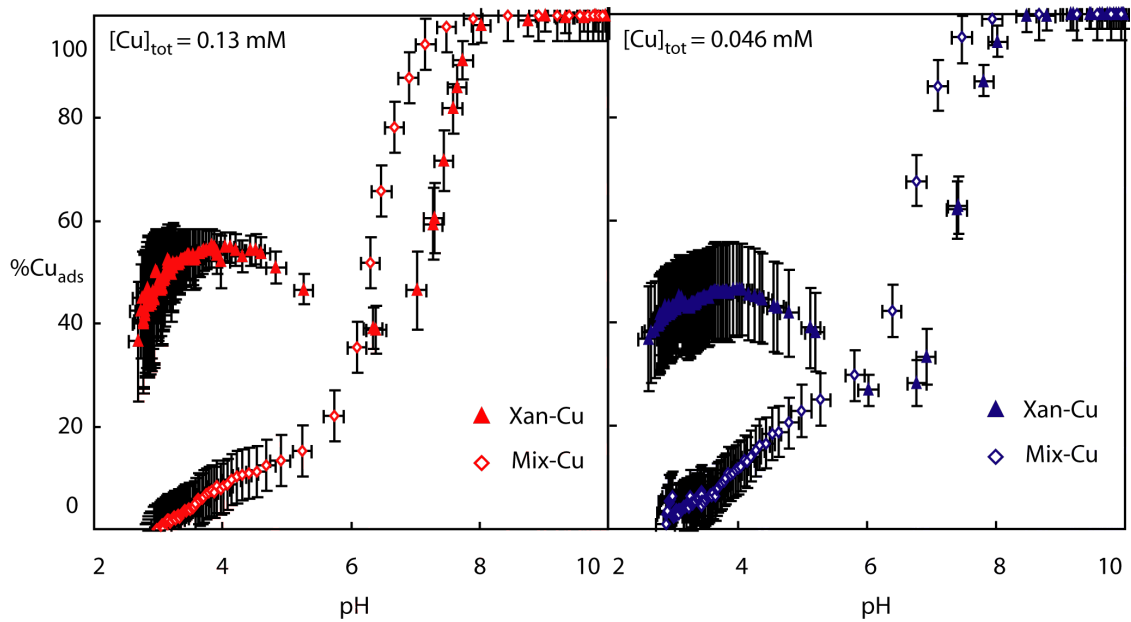
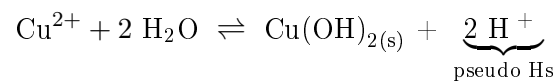


FIGURE 8.12 Comparaison de l'adsorption du cuivre par le xanthane et le mélange équivalent Pyr+GlcA pour deux concentrations totales en cuivres différentes $[Cu]_{tot}=0.13\text{mM}$ (ou mmol/g) et $[Cu]_{tot}=0.046\text{mM}$ (ou mmol/g) à FI fixé $=0.1\text{ M}$.

La plupart du temps, les valeurs modélisées pour l'adsorption du cuivre par le mélange Pyr+GlcA s'avère sous estimer les valeurs mesurées expérimentalement. Encore une fois, cette observation expérimentale conforte l'hypothèse que le mélange Pyr+GlcA expérimental (avec production possible d'une molécule *in situ*) a un pouvoir complexant légèrement supérieur au mélange Pyr+GlcA théorique, donnant une constante globale d'adsorption du cuivre pour le mélange de l'ordre de $\log K_{Cu}=2.2$.

Enfin, le deuxième saut de $[H_S]$, obtenu entre pH6 et 8, est du à la réaction d'hydrolyse du cuivre libérant deux pseudo protons de surface par entité de cuivre hydrolysée :



Cette série d'expériences met donc en évidence d'une part le bon pouvoir complexant du cuivre par le xanthane ($\log K_{XanCu} > \log K_{MixCu}$) et d'autre part le comportement original du xanthane qui adsorbe moins bien les ions Cu^{2+} à pH 5-6 qu'à pH plus acide 3-4, et que cette chute d'adsorption n'est pas liée à un échange de proton de surface. Nous verrons par la suite que les isothermes de sorption du cuivre confirment ces résultats.

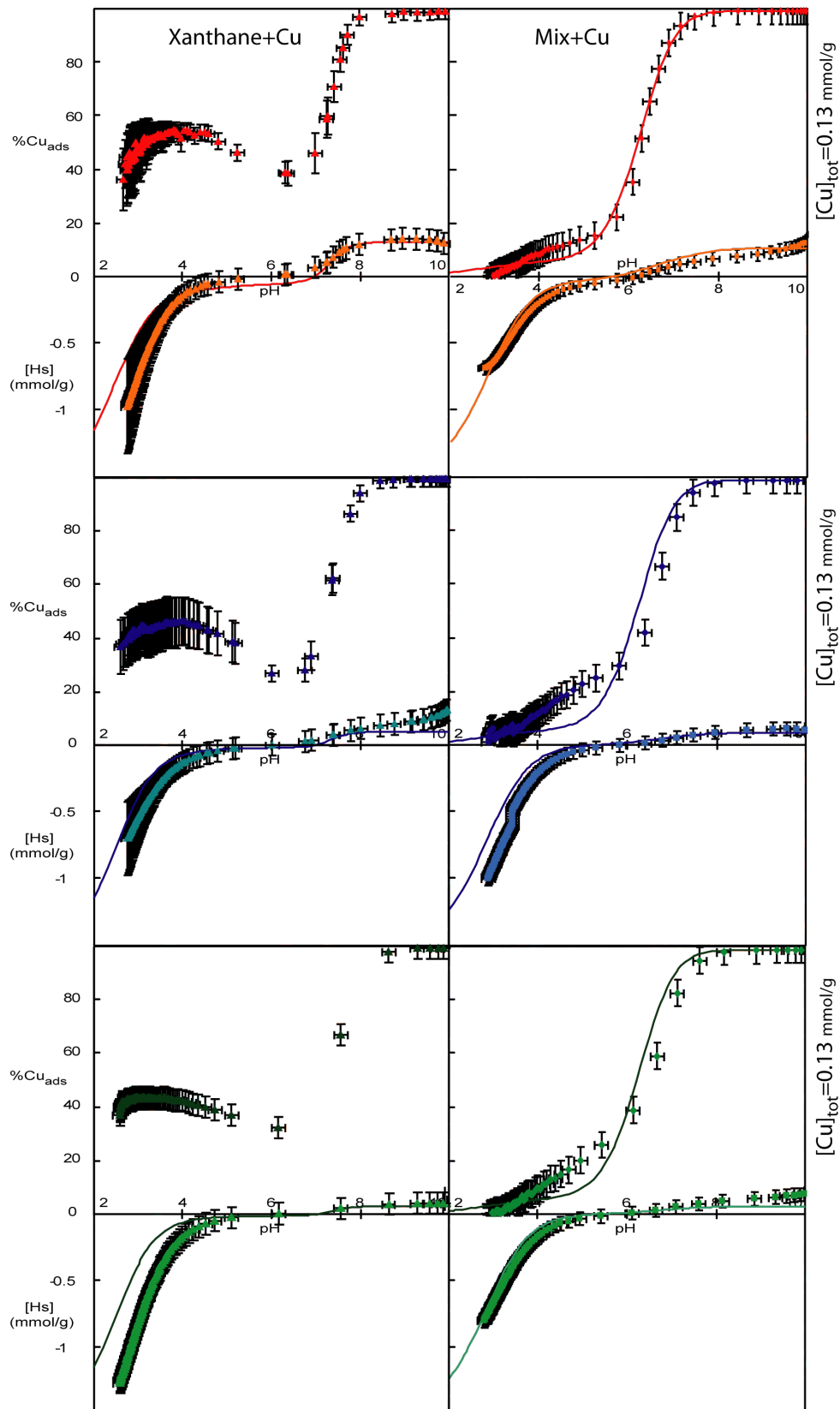


FIGURE 8.13 Adsorption du Cuivre et diagramme de relargage de protons en fonction du pH, par le xanthane (figures de gauche) et le mélange équivalent Pyr+GlcA (figures de droites) pour différentes concentrations en cuivre total (de haut en bas respectivement $[Cu_{tot}] = 0.13$ mmol/g -en rouge-, $[Cu_{tot}] = 0.046$ mmol/g -en bleu-, $[Cu_{tot}] = 0.028$ mmol/g -en vert-), pour $FI = 0.1M$.

8.3 Isothermes d'adsorption du Cuivre

Des séries d'expériences supplémentaires par isothermes de sorption du cuivre à pH3.5 et pH5.5 ont été réalisées sur le xanthane et le mélange équivalent à FI=0.1M. Ces expériences d'adsorption confirment bien les résultats obtenus par les titrages en présence de cuivre. Ainsi, on observe sur la figure 8.14 que l'adsorption du cuivre est plus importante pour les substrats classés selon l'ordre Mix à pH3.5 < Mix à pH5.5 < Xan pH3.5 < Xan pH5.5. On note à nouveau que : (i) le xanthane adsorbe plus de cuivre que le mélange équivalent Pyr+GlcA, quelque soit le pH, (ii) l'évolution de l'adsorption du cuivre en fonction du pH pour le mélange équivalent Pyr+GlcA (=Mix) est plus importante à pH5.5 qu'à pH3.5 (ce qui était prévisible) mais que par contre, pour le xanthane, l'adsorption du cuivre est plus importante à pH3.5 qu'à pH5.5 (ce qui peut être considéré en premier lieu comme une anomalie).

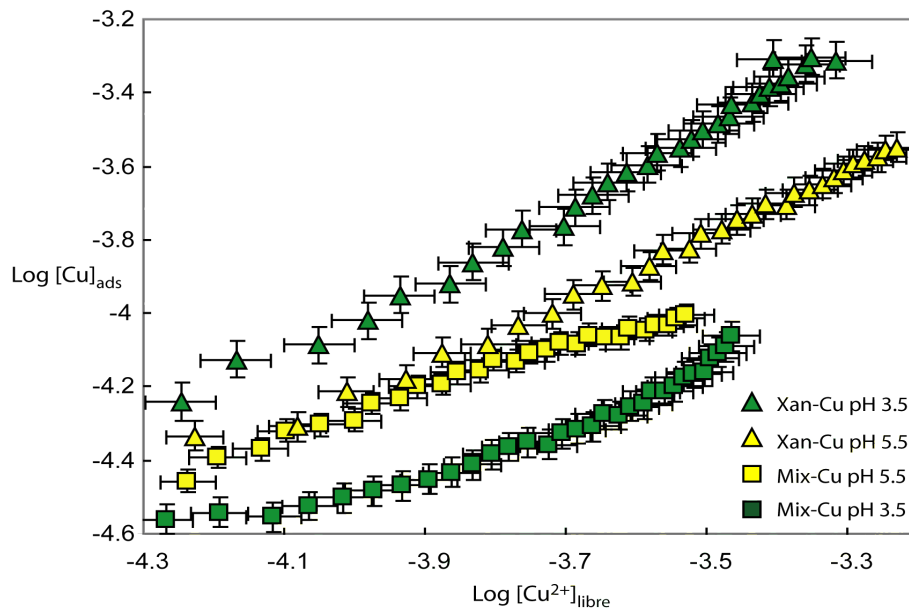
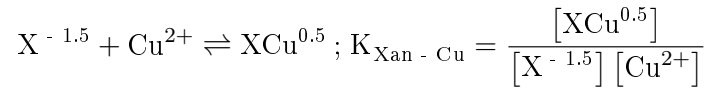


FIGURE 8.14 Isotherme d'adsorption du cuivre par le xanthane et le mélange équivalent Pyr+GlcA à pH 3.5 et pH 5.5 et FI fixée = 0.1 M.

La description de l'adsorption du cuivre par le xanthane n'est pas triviale (du fait de cette capacité accrue d'adsorption à pH acide) et la modélisation par un modèle simple de Langmuir fixant une seule constante d'adsorption du cuivre K_{XanCu} valable quel que soit le pH n'est pas possible, puisque l'adsorption évolue dans le sens inverse de la déprotonation des sites de fixations (sites carboxylates). Nous avons donc été contraints de modéliser les données expérimentales par un formalisme de **Langmuir "apparent"**, en calculant une constante de complexation apparente pour les deux pH étudiés : $K_{\text{XanpH3.5-Cu}}$ et $K_{\text{XanpH5.5-Cu}}$ liées à l'équation :



Où [X] désigne la concentration en monomère, déjà à 99% déprotoné à pH3.5.

Les meilleurs solutions ont été trouvées pour $\log K_{\text{XanpH3.5-Cu}} = 3 \pm 0.1$ et $\log K_{\text{XanpH5.5-Cu}} = 2.6 \pm 0.1$. La figure 8.15 présente les modélisations des isothermes d'adsorption du cuivre par le xanthane aux pH3.5 et 5.5 (FI=0.1M).

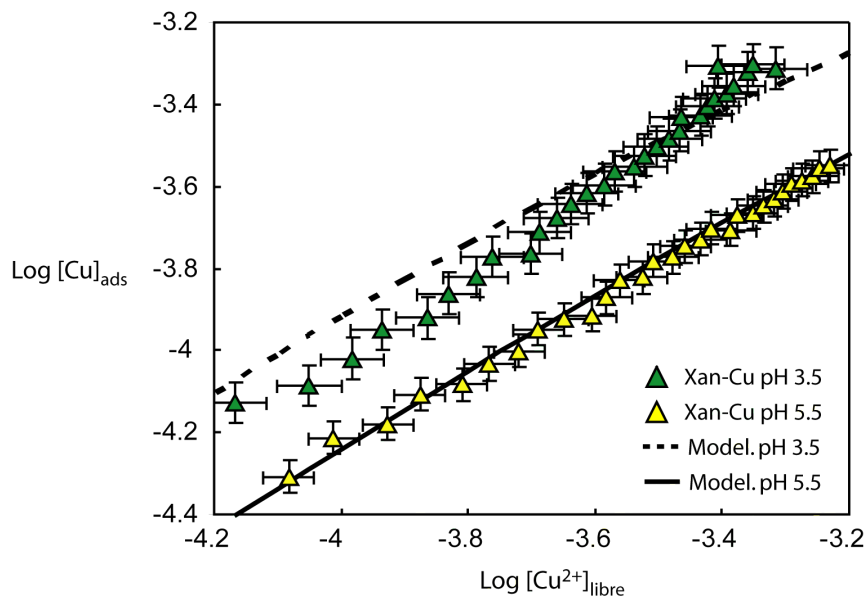


FIGURE 8.15 Modélisation des isothermes d'adsorption du cuivre par le xanthane à pH 3.5 et pH 5.5 et FI fixée = 0.1 M.

8.4 Dichroïsme circulaire

D'une part, nos résultats expérimentaux montrent que le changement de pouvoir d'adsorption du xanthane entre pH 3.5 et 5.5 n'est pas lié à un échange de proton entre le xanthane et le milieu extérieur (cf. figure 8.13), d'autre part notre étude bibliographique a montré que le xanthane pouvait exister sous différents états en solution : hélices (état ordonné) ou coil (état désordonné). Afin de comprendre ce changement d'adsorption du cuivre pH dépendant, nous avons effectué des tests en dichroïsme circulaire, sur du xanthane en solution dans un FI=0.1M, à différents pH. La figure 8.16 présente les spectres dichroïques enregistrés à pH3, pH7 et pH11.

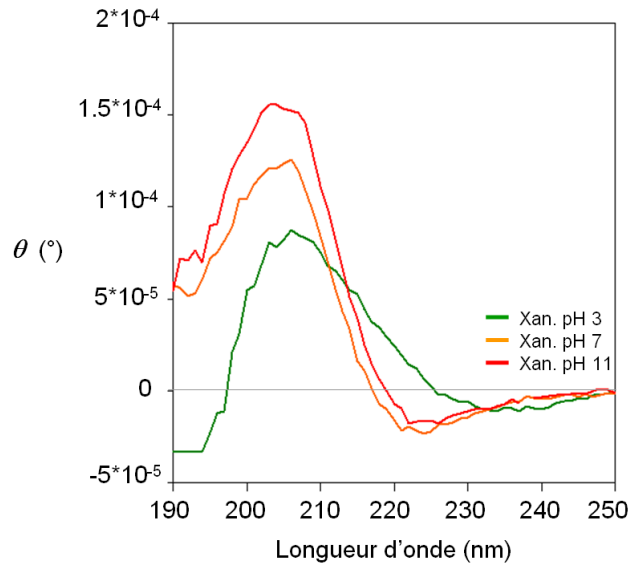


FIGURE 8.16 Spectre de dichroïsme circulaire du xanthane en fonction du pH à FI=0.1M en KF

Il apparaît qualitativement deux familles de spectres : les spectres neutres et basiques d'une part, pour lesquels les pics à 205nm sont les plus intenses et les pentes entre 210 et 220 nm parallèles conduisant à un même minima vers 225nm ; et le spectre acide d'autre part, pour lequel le pic à 205 nm est nettement moins intense, ayant une pente plus faible entre 210 et 230nm conduisant à un pic minimum moins prononcé centré à 240nm. Ces deux familles de spectres pourraient correspondre à des états plus ou moins ordonnés du xanthane.

Morris et al. (1977) a montré que plus le pic à 205nm est intense, plus le xanthane a une conformation ordonnée. En suivant cette interprétation, il apparaît que le xanthane est plutôt ordonné à pH neutre ou basique et désordonné à pH acide. De façon plus globale, ces expériences montrent que le xanthane connaît bien des changements conformationnels dépendant du pH. Cette méthode ne permet pas de faire un lien direct entre changement de conformation et variation des valeurs de $K_{\text{Xan-Cu}}$. Cependant, ces résultats appuient l'hypothèse que le comportement original $\text{Log}K_{\text{Xan-Cu}}$ à $\text{pH}3.5 > \text{Log}K_{\text{Xan-Cu}}$ à $\text{pH}5.5$ est lié à un changement de conformation du xanthane.

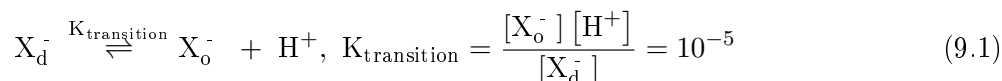
Chapitre 9

Discussion

9.1 Modélisation de la spéciation du xanthane avec 2 états de référence

Nos résultats de dichroïsme circulaire suggèrent que le xanthane change d'état en fonction du pH. [Morris et al. \(1977\)](#) avaient clairement mis en évidence une chute du pic à 205nm lors d'une augmentation de la température (pour différents lots de xanthane). Il conclue donc qu'un pic élevé à 205nm correspond à un état ordonné du xanthane, et que ce pic diminue pour du xanthane désordonné. Si l'on interprète de la même manière nos résultats, nous pouvons postuler que le xanthane à pH acide est dans un état plus désordonné qu'à pH neutre ou basique. D'ailleurs, les premières observations expérimentales de viscosité en fonction du pH ([Jeannes et al., 1961](#)) suggèrent que la viscosité augmente à pH neutre ou légèrement basique lorsque le xanthane est solvaté par des ions monovalents ou divalents. L'augmentation de cette viscosité est interprétée comme une augmentation de la rigidité du xanthane due à des portions d'hélice plus grandes, c'est à dire une conformation ordonnée. Ces résultats vont également dans le sens de ceux de [Zhang et al. \(1987\)](#) qui montrent, par étude viscosimétrique, que la longueur de persistance q du xanthane diminue à pH acide, et suggèrent que les doubles hélices du xanthane sont moins rigides (i.e. plus désordonnées) à pH acide qu'à pH basique. En suivant cette hypothèse de travail, il apparaît intéressant de construire un modèle thermodynamique du xanthane à deux états (ordonné et désordonné) afin de mieux interpréter nos données expérimentales.

Nous avons calibré ce modèle simple avec nos données acquises en dichroïsme circulaire. La transition ordre/désordre devant se situer entre pH 3 et pH 7, le pH de transition a été arbitrairement fixé à 5. Nous avons donc défini deux états pour le xanthane : un état ordonné, noté X_o , prédominant à $pH > 5$; et un état désordonné, noté X_d , prédominant pour les $pH < 5$. Nos données expérimentales étant trop limitées pour donner une loi comportementale détaillée entre pH 3 et pH 7, nous avons convenu en première approximation de traiter ce changement d'état sur deux unités pH par le formalisme classique des constantes d'acidités :



Remarque importante : Bien que les entités X_o et X_d comportent le même nombre de protons, nous sommes contraint de définir la constante d'acidité de transition $K_{transition}$ en faisant intervenir un échange de protons afin de pouvoir définir une espèce comme prédominante à pH acide < 5 et l'autre à pH > 5 . Puisqu'en réalité X_o et X_d ont le même nombre de proton, on écrit la réaction 9.1 de changement d'état sans ajouter de proton dans le bilan de matière de l'entité produite ; c'est à

$\begin{pmatrix} X_o^- \\ Cu^{2+} \\ H^+ \\ HO^- \\ X_dH \\ X_d^- \\ X_dCu^+ \\ X_oCu^+ \\ Cu(OH)^+ \\ Cu(OH)_2 \end{pmatrix}$	$=$	$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 2 \\ 1 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 \\ 0 & 1 & -2 \end{pmatrix}$	\otimes	$\begin{pmatrix} X_o^- \\ Cu^{2+} \\ H^+ \end{pmatrix}$	\otimes	$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ -pK_w \\ pK_a + pK_{transition} \\ pK_{transition} \\ pK_{transition} + \log K_{X_d(pH3.5)-Cu} \\ \log K_{X_o(pH5.5)-Cu} \\ pK_{CuOH^+} \\ pK_{Cu(OH)_2} \end{pmatrix}$	$=$	$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ -13.7 \\ 2.5 + 5 = 7 \\ 5 \\ 5 + 3 = 8 \\ 2.6 \\ * \\ * \end{pmatrix}$
Vecteur colonne des espèces		Matrice des coefficients stoechiométriques		Vecteur colonne des composantes		Vecteur colonne des constantes de réactions K		Valeurs numériques des pK ou logK

* Pour les constantes apparentes de complexation du cuivre, le calcul est affiné à chaque expérience en fonction des conditions initiales ($[Cu]_{tot}$)

FIGURE 9.1 Matrices de spéciation et vecteur colonne des constantes thermodynamiques utilisées pour la modélisation de l'adsorption du cuivre par le xanthane à deux états (désordonné : X_d et ordonné : X_o).

dire qu'il ne faut pas écrire $X_dH \xrightleftharpoons{K_{transition}} X_o + H^+$ car alors la définition du terme changement d'état retrouve le même sens que le changement d'état acide/base, et ce n'est pas ce qu'on cherche à faire !

D'autre part, nous avons vu dans la première partie de la section résultat, qu'en première approximation, le xanthane peut être modélisé (pour $FI=0.1M$) par un acide simple de $pK_a=2.5$ et de concentration totale $1.5mmol/g.eq.xan.$:

$$X_dH \xrightleftharpoons{K_a} X_d + H^+, \quad K_a = \frac{[X_d^-][H^+]}{[X_dH]} = 10^{-2.5}$$

Au final, le xanthane peut être traité comme un pseudo-diacide puisqu'il possède deux pK_a mais n'échange un proton que pour le premier pK_a tandis que pour le deuxième $pK_{transition}$ il n'échange aucun proton mais change de conformation (i.e. de forme 3D dans l'espace). Les domaines de prédominance sont donc les suivants :

Pour $pH < pK_a = 2.5$ alors X_dH prédomine,
 pour $2.5 = pK_a < pH < pK_{transition} = 5$ alors X_d^- prédomine,
 pour $pH > pK_{transition} = 5$ alors X_o^- prédomine.

Finalement, pour compléter le modèle, nous avons associé à chaque état X_o et X_d du xanthane une constante de complexation du cuivre. La valeur de la constante de complexation du cuivre est celle évaluée lors des isothermes d'adsorption du cuivre, à savoir : $\log K_{X_dpH3.5-Cu} = 3$ et $\log K_{X_opH5.5-Cu} = 2.6$

Le modèle ainsi construit du xanthane à deux états ordonné et désordonné ayant chacun des propriétés de complexation du cuivre différentes peut se résumer par la construction des matrices de spéciation et les valeurs des constantes thermodynamiques associées présentées en figure 9.1

Les résultats de la modélisation sont proposés en figure 9.2.

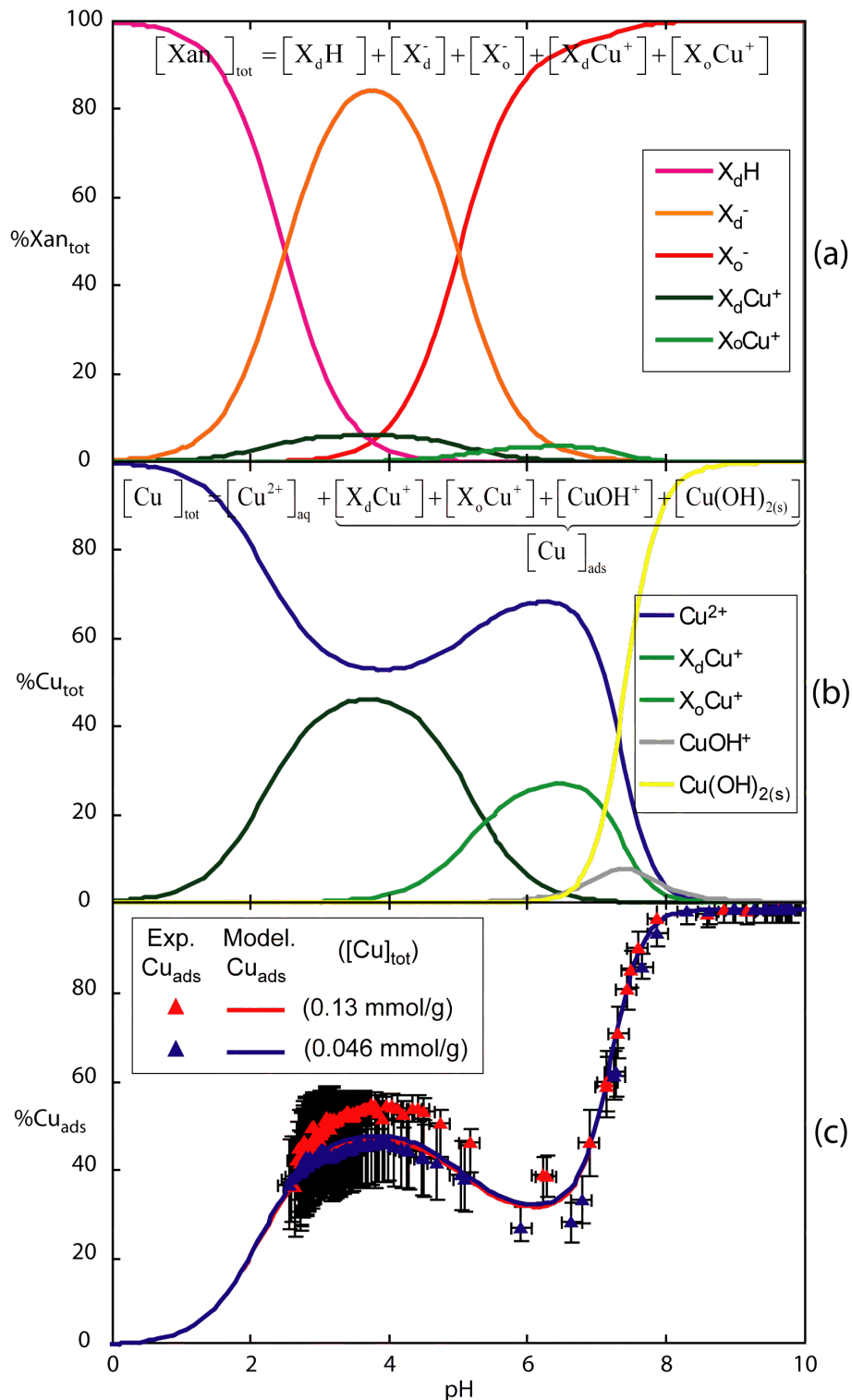


FIGURE 9.2 Modélisation de la chute d'adsorption du cuivre sur le xanthane, via un modèle à deux état pH dépendants : xanthane ordonné (X_o à pH neutre) \rightleftharpoons xanthane désordonné (X_d à pH acide).

La figure 9.2(a), (en haut), présente la spéciation du xanthane au cours de l'expérience de titrage acide/base en présence de cuivre. A pH acide < 2.5 , la forme ordonnée et protonée X_dH prédomine (courbe rose). Pour $2.5 < pH < 5$, le xanthane toujours désordonné mais maintenant déprotoné (X_d^- est alors l'espèce prédominante (courbe orange). Une partie de cette espèce X_d^- peut alors complexer du cuivre (avec la constante $\log K_{X_d, pH 3.5-Cu} = 3$) pour former le complexe X_dCu^+ (trait vert foncé).

Enfin, pour les $\text{pH} > 5$, le xanthane reste déprotoné mais change alors de conformation pour devenir ordonné (X_o^-) (trait rouge) et fixe alors moins de cuivre que précédemment en formant le complexe X_oCu^+ (trait vert clair) car la constante $\log K_{\text{XopH5.5-Cu}} = 2.5$ est plus faible que la constante de complexation sous la forme désordonnée du xanthane. Finalement pour les $\text{pH} > 8$, la seule espèce restante est le xanthane ordonné et déprotoné (X_o^-) qui ne peut plus complexer de cuivre, se dernier ayant précipité sous forme d'hydroxyde de cuivre.

La figure 9.2(b), (au milieu), présente la spéciation du cuivre au cours des expériences de titrages acide/base du xanthane. A pH acide < 2.5 , le cuivre libre (Cu^{2+}) est quasiment la seule espèce existante (trait bleu). Puis une partie de ce cuivre dissout va successivement se complexer sur le xanthane désordonné pour formé l'espèce X_dCu^+ (vert foncé) puis sur le xanthane ordonné en formant l'espèce X_oCu^+ (vert clair). On notera au passage que la fraction complexée diminue entre pH 3.5 et 5.5, car la constante de complexation du cuivre sur le xanthane ordonnée est plus faible que celle sur le xanthane désordonné ($\log K_{\text{XopH5.5-Cu}} = 2.6 < \log K_{\text{XdpH3.5-Cu}} = 3$). Enfin, à partir de pH 6.5/7, le cuivre forme l'hydroxyde simple CuOH^+ (trait gris) qui précipite rapidement sous forme d'hydroxydes $\text{Cu}(\text{OH})_{2(s)}$ (trait jaune).

La figure 9.2(c), (en bas), propose finalement une reconstruction des résultats expérimentaux d'adsorption du cuivre sur le xanthane. Le bilan de masse sur le cuivre nous permet d'écrire :

$$[\text{Cu}]_{\text{tot}} = [\text{Cu}^{2+}]_{\text{aq}} + [\text{Cu}]_{\text{ads}}$$

$$\text{Avec : } [\text{Cu}]_{\text{ads}} = [\text{X}_d\text{Cu}^+] + [\text{X}_o\text{Cu}^+] + [\text{CuOH}^+] + [\text{Cu}(\text{OH})_{2(s)}]$$

La sommes des espèces $[\text{X}_d\text{Cu}^+] + [\text{X}_o\text{Cu}^+] + [\text{CuOH}^+] + [\text{Cu}(\text{OH})_{2(s)}]$ nous donne le cuivre adsorbé modélisé, qui reproduit très fidèlement les données expérimentales.

9.2 Nature des 2 états de référence ? - possible amélioration du modèle

Toutes nos expériences ayant été effectuées à température constante ($T = 25^\circ \pm 0.1^\circ \text{C}$) et à FI constante et élevée ($[\text{NaNO}_3] = 0.1\text{M}$), notre xanthane est supposé être majoritairement sous forme ordonnée dans notre solution (cf. étude bibliographique du chapitre introduction de la Partie II). Or, nous avons vu qu'un modèle avec changement d'état ordonné/désordonné semble bien décrire la capacité de sorption du cuivre sur le xanthane en fonction du pH . Pour [Milas and Rinaudo \(1979\)](#) le xanthane ne peut exister que sous ces deux états, et il doit forcément être ordonné à $\text{FI} = 0.1\text{M}$. Comme le montre nos résultats et ceux de [Zhang et al. \(1987\)](#), ce point de vue semble trop catégorique et nous avons clairement mis en évidence un changement conformationnel pH dépendant de notre xanthane (expériences de sorption du cuivre et de dichroïsme circulaire). Mais a-t-on réellement observé une transition ordonné/désordonné au sens où la littérature l'entend ? C'est à dire avons-nous exclusivement un coil à pH acide capable de bien complexer le cuivre et une hélice rigide à pH neutre moins performante pour adsorber le cuivre ? Vu les hautes FI utilisées, nous pouvons d'emblé modérer ce propos. Il faut plutôt voir le xanthane comme une combinaison de fragments ordonnés en hélice et d'autres fragments désordonnés (cf. figure 9.3). La proportion de ces deux types de conformations peut alors varier en fonction des conditions extérieures : on aura plus d'hélice à haute FI et basse température, et vis-versa à bas FI ($< 0.005\text{M}$) et haute température ($> 40^\circ$ environ) ([Muller and Lecourtier, 1988](#); [Norton et al., 1984](#)). Nos expériences suggèrent que le pH joue également un rôle sur ces changements conformationnels et que le xanthane serait plus ordonné à pH neutre qu'à pH acide. La figure 9.3 résume ces hypothèses sur le changement d'état du xanthane.

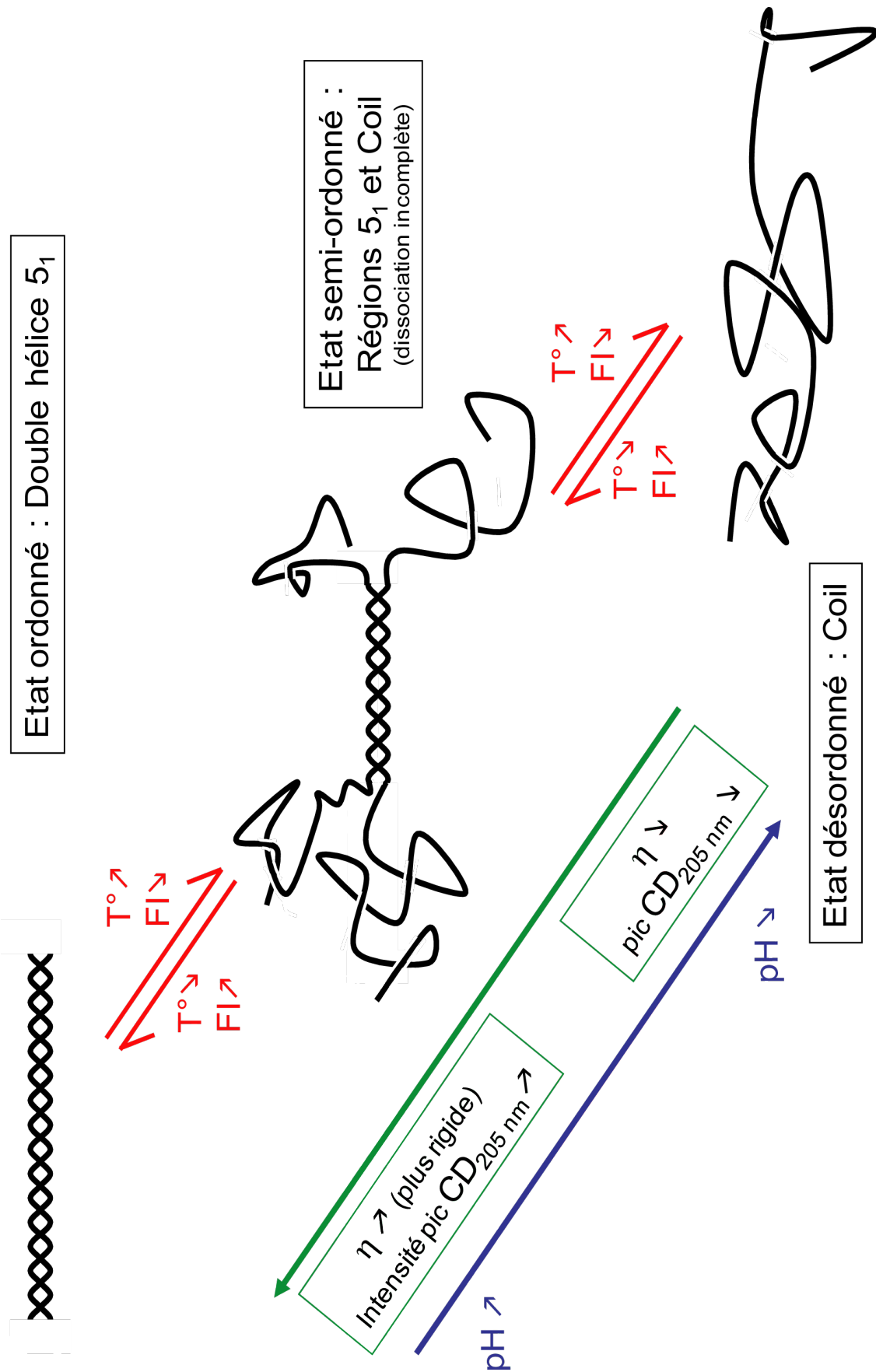


FIGURE 9.3 Transitions conformationnelles du xanthane en fonction de FI, T et du pH

Pour Zhang et al. (1987) le xanthane forme des doubles hélices rigides à pH neutre et des doubles hélice plus souples à pH acide. Nous ne pouvons pas conclure sur la nature des changements conformationnels au vu de nos résultats. On pourrait également penser que le rôle de l'agrégation des polysaccharides, déjà connu sur d'autres polysaccharides à pH acide Righetti et al. (1978) pourrait être le changement de conformation observé (ou plutôt le changement d'organisation moléculaire). Capron et al. (1998); Norton et al. (1984) soutiennent que des agrégats de xanthane se forment à partir d'hélices simples adjacentes s'agrégeant de façon parallèle. Dans notre cas, on aurait alors des hélices regroupées en paquets à pH acide et des hélices bien différenciées à pH neutre. Quelque soit la nature du changement conformationnel observé, les hypothèses émises (plus de portions coils à pH acide, des hélices plus souples à pH acide, des agrégation d'hélices à pH acide) vont dans le même sens : elles expliquent toutes bien la possibilité de complexes chelatants sur le cuivre entre différents groupements chelatants d'une même chaîne (hélice souple ou coil se repliant sur elle même) ou de chaînes voisines (agrégation d'hélice). Alors qu'à pH neutre, les hélices ne peuvent pas former facilement de chelatants (autour du cuivre) entre différents groupements carboxylates de différents monomères, car la rigidité de la chaîne l'interdit. Si un tel scénario était vérifié, on aurait une explication à l'échelle moléculaire justifiant des constantes de complexation du cuivre différentes à l'échelle macroscopiques.

D'une manière plus générale, concernant l'adsorption des métaux par les substrats bactériens, le rôle de la conformation des substances extracellulaires dans la capacité de sorption des métaux pourrait jouer un rôle important. Ainsi, nous avons vu que pour les EPS, comme le xanthane, la capacité de sorption des métaux peut dépendre du pH (le xanthane adsorbe plus de cuivre à pH acide qu'à pH neutre). Or, d'autres constituants de la matrice extracellulaire du biofilm semblent subir d'importants changements conformationnels. Omoike and Chorover (2004) montrent ainsi des changements conformationnels inverses de ceux du xanthane pour une protéine issu d'un biofilm de *Bacillus subtilis*. Cette protéine se trouve à l'état ordonné en hélice à pH acide et à l'état de coil pour des pH plus basiques. Les changements de conformation pH dépendants de la matrice du biofilm (composée majoritairement d'EPS et de protéines) pourraient avoir un rôle important sur les capacités de rétention des métaux. En particulier, ces changements conformationnels pourraient expliquer la non reproductibilité et les divergences de certains résultats d'adsorption des métaux sur les biofilms bactériens Ueshima et al. (2008) v.s. Muris (2004) où les effets électrostatiques observés sur les matrices extracellulaire du biofilm par dosage acide/base non réversible en fonction du pH initial Muris (2004).

Le modèle proposé à deux états du xanthane possédant chacun des propriétés propres d'adsorption du cuivre paraît bien adapté à notre système. Ce modèle semble réaliste, puisqu'il a été calibré avec les données expérimentales des titrages acide/base simple, des isothermes d'adsorption du cuivre, et des données de dichroïsme circulaire caractérisant un changement d'état pH dépendant. Bien que ce modèle soit pertinent et suffisant d'un point de vue thermodynamique, la question de la nature des deux états définis comme "ordonné" et "désordonné" reste en suspens. En particulier, même si l'on peut supposer, d'après les données bibliographiques, que la forme ordonnée doit contenir plus de portion hélicoïdales et la forme désordonnée plus de portion en coil, nous ne pouvons pas conclure sur la nature des complexe xanthane-cuivre formés à l'échelle moléculaire. Pourtant les constantes thermodynamiques macroscopiques déterminées doivent traduire un agencement moléculaire différent à pH3.5 et pH5.5. Pour tenter de définir la nature de ces deux complexes, nous avons poursuivi notre étude par des expériences de spectroscopie EXAFS et des simulations numériques en dynamique moléculaire.

Chapitre 10

Résumé : ce qu'il faut retenir

A une FI=0.1M, la réactivité acide/base du xanthane est très proche de celle du mélange équivalent Pyr+GlcA, et peut être décrite en première approximation comme un monoacide de concentration totale 1.5mmol/g et de $pK_a=2.5$. La modélisation plus précise par un modèle non électrostatique à deux sites discrets de concentrations $T_1=0.5$ mmol/g et $T_2=1$ mmol/g (fixées structuralement par étude RMN et CPG) donne les pK_a suivants pour le xanthane ($pK_1=1.85, pK_2=2.83$) et pour le mélange Pyr+GlcA ($pK_1=1.47, pK_2=3.02$). Pour les autres FI, la variation de pK_a du mélange Pyr+GlcA est bien décrite par la loi de Davies, tandis qu'il faut introduire un modèle électrostatique d'inspiration structurale pour reproduire les variations de pK_a du xanthane en fonction de la FI. Ce modèle électrostatique est fondé sur un modèle à capacitance constante généré par un condensateur cylindrique formé par la double hélice du xanthane chargée négativement et la couche de contre ions Na^+ du FI.

Alors que la réactivité acide base du xanthane et du mélange Pyr+GlcA est similaire à FI=0.1M, la réactivité au cuivre des deux substrats est complètement différente. L'adsorption du cuivre par le mélange Pyr+GlcA est bien décrite par les modèles de thermodynamique classique, tandis que le xanthane a un comportement original. Tout d'abord, le xanthane adsorbe plus de cuivre que le mélange équivalent Pyr+GlcA (pour tout $pH < 6$, i.e. avant la précipitation de l'hydroxyde de cuivre). De plus, le xanthane montre une chute d'adsorption du cuivre entre $pH 3.5$ et $pH 5.5$. Des séries d'isothermes de sorption du cuivre sur le mélange Pyr+GlcA et le xanthane ont permis de prouver l'excellente reproductibilité de ces résultats, et d'évaluer les constantes apparentes d'adsorption du cuivre à $pH 3.5$ et $pH 5.5$ sur le xanthane : $\log K_{X_d, pH 3.5-Cu} = 3$ et $\log K_{X_o, pH 5.5-Cu} = 2.6$. Finalement, une étude du xanthane par dichroïsme circulaire en fonction du pH combinée à une étude bibliographique suggère que le xanthane connaît deux états : un état ordonné (X_o) à pH neutre et un état plus désordonné à pH acide (X_d). Nous proposons un modèle thermodynamique considérant le xanthane comme un pseudo-diacide ayant un premier $pK_a=2.5$ où il échange un proton par réaction acide base, et un deuxième $pK_{transition}=5$ où le xanthane change de conformation, et donc change de pouvoir d'adsorption du cuivre. Ce modèle permet une très bonne description des données expérimentales, par contre, la nature moléculaire des deux états X_d et X_o reste indéterminée, même si l'état X_o doit présenter plus de section en hélice que l'état X_d . La dernière partie du manuscrit cherchera à déterminer la nature des complexes Cuivre-Xanthane à l'échelle moléculaire, par spectroscopie EXAFS et dynamique moléculaire, afin de comprendre le changement de capacité d'adsorption pH dépendant observé expérimentalement lors des titrages acide/base du xanthane en présence de cuivre.

Troisième partie

Etude à l'échelle moléculaire des complexes Xanthane-Cu²⁺

Chapitre 11

Introduction

11.1 Modélisation Moléculaire & systèmes environnementaux

Récemment, les méthodes de modélisation moléculaire se sont beaucoup développées sur les systèmes environnementaux, pour tenter de comprendre le devenir des polluants métalliques dans les sols. Ainsi, [Johnson \(2006\)](#) va chercher à modéliser une surface bactérienne en modélisation moléculaire, et comparer ses interactions avec le cadmium et le plomb dans les systèmes modélisés et expérimentaux. Cette étude montre que le champ de force CVFF permet de représenter un bon comportement du Cd mais que pour le Pb, ce champ de force ne reproduit pas le type de complexe observé expérimentalement. Plus récemment, [Aristilde and Sposito \(2008\)](#) se sont intéressés aux interactions entre des antibiotiques et des cations métalliques d'intérêts environnementaux (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Na^+ et K^+). Ils montrent que la stabilité des complexes est contrôlée par le potentiel ionique des cations métalliques impliqués, et que la coordinance du métal dans l'eau conditionne sa coordinance dans le complexe avec l'antibiotique. De son côté, [Henao Valencia \(2008\)](#) s'intéresse plus particulièrement au rôle des polysaccharides dans l'agrégation des sols. Cette étude propose en particulier des méthodes d'évaluation des énergies d'adsorption du polysaccharide sur des argiles afin de permettre des comparaisons entre résultats modélisés et expérimentaux. Enfin, une étude récente propose de travailler sur des systèmes bien hydratés concernant l'étude de complexes entre polyuronates et Ca^{2+} ([Peric et al., 2008](#)). Cette dernière étude propose des mécanismes de complexation en sphère externe des cations Ca^{2+} par les polyuronates.

La modélisation moléculaire s'affirme donc aujourd'hui comme un outil de choix pour la compréhension des systèmes environnementaux de plus en plus complexes. Les travaux sont menés sur des substrats bactériens et des ETM ([Johnson, 2006](#)), sur des polysaccharides et des métaux lourds ([Peric et al., 2008](#)), sur des polysaccharides et des substrats minéraux ([Henao Valencia, 2008](#)) ou sur des polluants organiques et des ETM ([Aristilde and Sposito, 2008](#)). Cette grande diversité d'application des méthodes de modélisation moléculaire nous a conduit à proposer l'étude théorique des complexes xanthane+ Cu^{2+} , rentrant dans le cadre de ses systèmes expérimentaux (polysaccharide et ETM).

11.2 Modélisation Moléculaire & xanthane

Avant de se lancer dans la modélisation moléculaire de notre système expérimental xanthane+ Cu^{2+} , une étude bibliographique a été menée sur les précédents travaux de modélisation réalisés sur le xanthane. De nombreuses publications ont abordé le sujet de la conformation du xanthane (à pH neutre seulement). Les fondements concernant la modélisation moléculaire des structures hélicoïdales ac-

cessibles du xanthane ont été réalisés par [Perez and Vergelati \(1987\)](#). Par la suite les travaux de [Levy et al. \(1996\)](#) se sont intéressés au devenir de ces hélices en fonction de la structure chimique des chaînes latérales du xanthane. Alors que les hélices proches du modèle 5_1 introduit par [Moorhouse et al. \(1977\)](#) sont considérées comme l'état stable en solution ([Perez and Vergelati, 1987](#); [Levy et al., 1996](#)), deux auteurs vont proposer des nouvelles hélices de type cellulosiques 2_1 comme squelette accessible au xanthane, en particulier lors de la formation d'interactions synergiques avec le glucomanan ([Chandrasekaran and Radha, 1997](#); [Millane, 1993](#)). Malgré le nombre important d'études en modélisation moléculaire sur le xanthane, aucune n'aborde ses changements de conformation en fonction du pH, ni ses propriétés de complexation des cations métalliques. Il convient donc de préciser notre objet d'étude xanthane+Cu²⁺ pour la modélisation moléculaire.

11.3 Objectifs de notre étude en Modélisation Moléculaire

Nos résultats expérimentaux ont mis en évidence que le xanthane adsorbe plus de cuivre à pH3.5 qu'à pH5.5, et que ce changement de comportement inédit est du à un changement de conformation pH dépendant. L'hypothèse avancée est la formation d'hélices rigides à pH5.5 qui ont un moins grand pouvoir à former des sites chelatants du fait de leur rigidité, tandis qu'à pH3/3.5, même si le nombre de sites COO⁻ disponibles est moins important, la structure désordonnée du xanthane à ce pH permettrait la formation de sites complexants chelatants plus forts, entre différentes chaînes latérales, du fait de la plus grande souplesse du xanthane à ce pH.

Le problème posé est donc le suivant : est-ce qu'un changement conformationnel peut compenser un moins grand nombre de sites complexant disponibles ? En définissant l'état ordonné du xanthane comme les hélices et l'état désordonné du xanthane par le terme anglo-saxon " coil ", comme représentatif des pelotes désordonnées ou/et des agrégations d'hélices, la question précédente se reformule comme suit. Est-ce que la construction d'un xanthane à pH3 à l'état de coil, ayant encore des sites potentiels de complexation du cuivre occupés par des protons, peut expliquer une plus grande complexation du cuivre qu'un xanthane à pH5.5 ayant tous ses sites disponibles mais étant plus rigide car sous forme d'hélice ? Ces questions ont cadré le travail de modélisation moléculaire présenté dans la suite du manuscrit.



FIGURE 11.1 *La modélisation moléculaire selon Calvin & Hobbes. D'après (c) Bill Watterson.*

Chapitre 12

Matériel & Méthode

Après le rappel des fondamentaux en modélisation moléculaire (Allen and Tildesley, 1987; Debret, 2007) nous présenterons la stratégie adoptée pour l'étude théorique des complexes xanthane-cuivre.

12.1 Modélisation Moléculaire

12.1.1 Mécanique moléculaire

12.1.1.1 Principe

La mécanique moléculaire a pour objectif d'estimer l'énergie d'une molécule en appliquant les lois de la mécanique classique à l'échelle atomique (on parle de méthode empirique). Elle permet de calculer des propriétés structurales et thermodynamiques associées à une ou plusieurs molécule(s). Les atomes y sont représentés comme des masses ponctuelles chargées. Les liaisons chimiques sont considérées comme des ressorts mécaniques incassables liant deux atomes. L'énergie potentielle est en général exprimée comme une somme de contributions internes, entre atomes liés chimiquement, et externes, entre atomes non liés.

12.1.1.2 Fonction d'énergie potentielle

Le rôle de la fonction d'énergie potentielle est de reproduire les interactions du système aussi fidèlement que possible. Le plus souvent, elle s'exprime comme la somme des différentes contributions énergétiques suivantes (Eq. 12.1 et figure 12.1) :

$$\underbrace{E_{\text{tot}}}_{\text{Énergie potentielle}} = \underbrace{E_{\text{liaison}} + E_{\text{valence}} + E_{\text{dièdre}} + E_{\text{impropre}}}_{E_{\text{liée}}} + \underbrace{E_{\text{VdW}} + E_{\text{élec}}}_{E_{\text{non-liée}}} \quad (12.1)$$

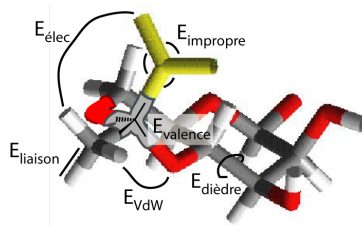


FIGURE 12.1 Représentation schématique des paramètres pris en compte dans le calcul d'énergie potentielle, sur l'exemple de l'acide pyruvique branché en O4 et O6 sur l'alpha-mannose. Par soucis de clarté, un unique exemple par type d'énergie a été placé sur la molécule. Les atomes en jaunes correspondent au site carboxylate COO⁻, les autres suivent le code couleur normalisé : gris=C, blanc=H, rouge=O.

Les interactions entre atomes liés représentent l'énergie covalente du système. Elle s'applique aux atomes distants d'au plus trois liaisons. Les interactions entre atomes non-liés comprennent les interactions électrostatiques et de Van der Waals. Elles s'appliquent aux atomes distants de plus de trois liaisons, ou aux atomes non reliés par une liaison chimique (e.g. entre un cation métallique et son ligand). Le terme dit "impropre" permet de garder la planéité des liaisons π (dans les cétones ou les acides carboxyliques notamment).

12.1.1.3 Champ de force

Le champ de force désigne un ensemble de paramètres décrivant chaque atome et permettant de résoudre l'expression analytique de l'énergie potentielle du système (E_{tot}). Il existe de nombreux champs de force et de nombreuses manières de définir l'énergie potentielle. Le champ de force que nous avons utilisé lors de nos simulations numériques est l'Universal Force Field (UFF) (Rappe et al., 1992), c'est un champ de force empirique capable de gérer tous les éléments du tableau périodique. UFF est un champ de forces diagonal et harmonique où la fonction d'énergie potentielle (cf. équation 12.2) est calculée à partir de la position des atomes, exprimée en fonction des longueurs de liaison (d), des angles de valence (θ), des angles dièdres (ϕ : valeur de l'angle dièdre et δ : valeur de référence ou initiale de l'angle dièdre), des angles impropres (ω) et des distances interatomiques (r_{ij}). Cette expression permet de se placer dans un repère interne au polysaccharide dans lequel son orientation et sa position dans l'espace ne sont pas prises en compte. La position d'un atome est exprimée en fonction de la position des autres atomes. La description est alors dite en coordonnées "relatives". L'énergie potentielle (dans UFF) est définie par l'équation 12.2 (Casewit et al., 1992; Rappe et al., 1992) :

$$\begin{aligned}
 E_{\text{tot}} = & \sum k_d (d - d_0)^2 && [E_{\text{liaison}}] \\
 & + \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 && [E_{\text{valence}}] \\
 & + \sum k_\omega (\omega - \omega_0)^2 && [E_{\text{impropre}}] \\
 & + \sum k_\phi (1 + \cos(n * \phi - \delta))^2 && [E_{\text{dièdre}}] \\
 & + \sum_i \sum_{j>i} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) && [E_{\text{vdw}}] \\
 & + \sum_i \sum_j \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} * \frac{q_i q_j}{r_{ij}} && [E_{\text{élec}}]
 \end{aligned} \tag{12.2}$$

Les termes associés aux liaisons covalentes et aux angles sont décrits par des potentiels harmoniques et rendent compte du coût énergétique de déformation des liaisons ou des angles par rapport à des valeurs idéales de référence (cf. figure 12.2) :

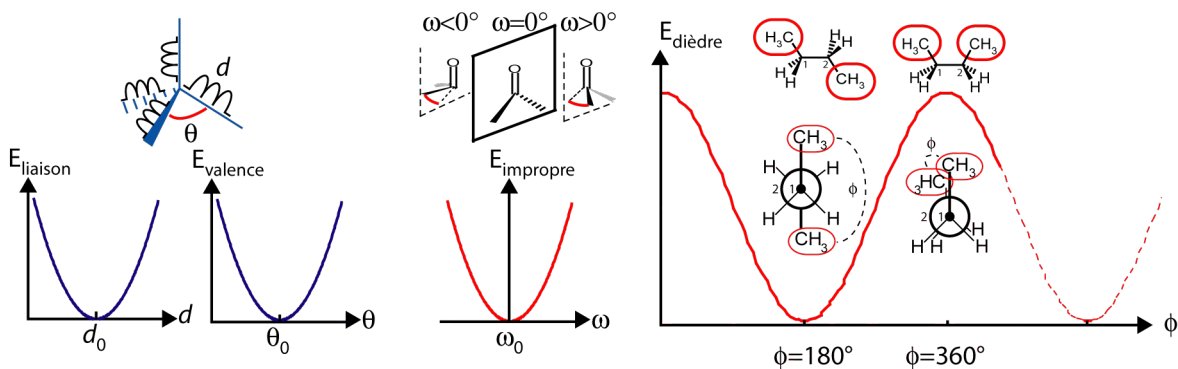


FIGURE 12.2 Représentation des différents termes liés de la fonction d'énergie potentielle.

Les interactions électrostatiques décrivent les interactions entre particules chargées. L'intensité de la force électrique d'interaction est proportionnelle à la valeur de chacune des charges et inversement proportionnelle au carré de la distance qui les sépare (la force dérivant de l'énergie, $E_{\text{élec}}$ est en $\frac{1}{r}$). Le terme associé aux interactions de types électrostatiques est de type coulombien (cf. équation 12.2).

Les interactions de Van der Waals correspondent aux forces dites de dispersion. Même pour une distribution en moyenne neutre des charges, il existe des fluctuations temporaires (sur des temps très courts) de la distribution électronique auxquelles s'associent des moments dipolaires instantanés. Par effet d'induction, ces dipôles génèrent autour d'eux des dipôles induits. Les dipôles instantanés et les dipôles qu'ils induisent s'attirent selon une loi en $\frac{1}{r^6}$. Cependant, cette attraction est compensée par une répulsion très forte à plus courte distance (en $\frac{1}{r^{12}}$), qui s'explique par la difficulté de faire s'interpénétrer les nuages électroniques de chaque atome. Les deux interactions se combinent dans un potentiel dit de Lennard-Jones (cf. figure 12.3).

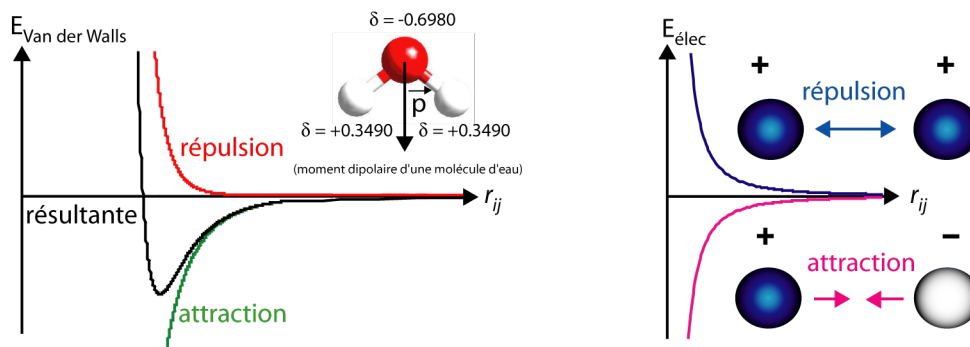


FIGURE 12.3 Représentation des termes non-liés de la fonction d'énergie potentielle.

12.1.1.4 Interactions longue distance

Le nombre d'interactions entre paires d'atomes augmente exponentiellement avec la taille du système. A longue distance, les interactions entre atomes sont négligeables, les énergies d'interaction électrostatique et de Van der Waals étant proches de 0 (cf. figure 12.3). Afin de limiter les temps de calcul, les interactions entre atomes distants de plus d'une certaine valeur peuvent ne pas être prises en compte. La méthode la plus simple, dite de *cut-off*, consiste à utiliser une valeur seuil au delà de laquelle on considère les interactions comme nulles. Pour éviter de créer des brusques variations de forces dues au fait que le potentiel est discontinu, on peut multiplier les termes d'interactions non-liés par une fonction dite de "switch" ou ajouter aux termes une fonction dite de "shift". Dans ces méthodes, les plus connues sont le *reaction-field* ou RF (Tironi et al., 1995) et la sommation d'*Ewald* (Allen and Tildesley, 1987). L'idée physique du RF est que les charges en dehors du *cut-off* forment un continuum avec une constante diélectrique donnée. Les charges à l'intérieur du *cut-off* vont polariser le continuum et créer ainsi un champ de réaction (*reaction-field*). La sommation d'*Ewald* consiste, quant à elle, à traiter le système comme s'il s'agissait d'un cristal et d'effectuer des sommes par maille. L'algorithme le plus connu et utilisé pour la sommation d'*Ewald* est le Particle Mesh Ewald ou PME (Cheatham et al., 1995). Chacune de ces méthodes présente des avantages et inconvénients dont il faut tenir compte lors du choix de la méthode utilisée.

De manière générale, la méthode de *cut-off* est beaucoup plus rapide que les autres. Cependant, elle entraîne certains artéfacts. Par exemple, pour les lipides, elle entraîne une diminution de l'aire par lipide et une augmentation du paramètre d'ordre des chaînes acyles (Patra et al., 2003). Toutefois, les artéfacts, bien que ne disparaissant pas, sont diminués pour des valeurs de *cut-off* suffisamment grandes (de l'ordre de 1,8 nm). La méthode PME, quant à elle, est beaucoup plus lente. Elle traite

globalement mieux les interactions à longue distance mais entraîne aussi quelques artéfacts. Par exemple, la périodicité artificielle créée affecte l'équilibre conformationnel : les peptides et protéines se stabilisent dans la conformation la plus compacte (Hunenberger and McCammon, 1999). Le PME influence aussi l'épaisseur membranaire (Cordomi et al., 2007). Le choix de la méthode électrostatique dépend donc de la taille et de la nature du système ainsi que des propriétés auxquelles on s'intéresse. En ce qui concerne les études environnementales, la méthode PME est généralement choisie pour les études concernant les polysaccharides, les métaux lourds, les constituants membranaires des bactéries et les minéraux argileux (Hena Valencia, 2008; Aristilde and Sposito, 2008; Johnson, 2006). C'est donc la sommation d'Ewald que nous appliquerons pour les interactions à longue distance lors de nos simulations entre notre exopolysaccharide (xanthane) et notre métal lourd (cuivre).

12.1.1.5 Minimisation de l'énergie potentielle

La minimisation d'énergie consiste à optimiser la géométrie d'une conformation, c'est-à-dire les positions atomiques, pour que la fonction d'énergie soit minimale. La recherche conformationnelle est faite de manière à converger vers un gradient d'énergie zéro, et donc, vers un état énergétiquement stable (ou puits de potentiel). Des minima d'énergie locale et globale sont possibles, comme l'illustre la figure 12.4. Il existe plusieurs méthodes de minimisation d'énergie, par exemple, la méthode de plus grande pente *steepest descent* et la méthode de gradient conjugué. Néanmoins, la convergence vers le minimum global n'est pas toujours possible car aucune méthode ne peut garantir, de façon absolue, que le minimum global puisse être atteint. Ceci est dû à une forte dépendance des algorithmes de minimisation aux conformations initiales (cf. figure 12.4). Par conséquent, pour rechercher les conformations les plus stables (minimum global) on peut avoir recours à la Dynamique Moléculaire (MD) (Allen and Tildesley, 1987). Une autre méthode de recherche de minima global est la recherche *monte carlo*, qui consiste à calculer l'énergie potentielle pour toutes les valeurs possibles de chaque paramètre. La méthode *monte carlo* explore donc tout l'espace conformationnel, et détermine le "vrai" minima global d'énergie potentielle. Mais cette méthode se révèle très coûteuse en temps de calcul et de plus elle peut conduire à des minima inaccessibles expérimentalement. L'avantage indéniable de la MD est de proposer des minima d'énergie potentielle mais également des chemins expérimentaux (i.e. des trajectoires) y convergeant.

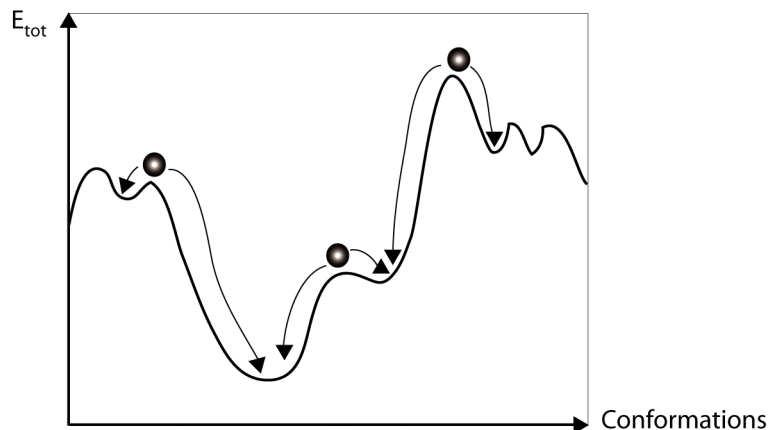


FIGURE 12.4 Représentation de plusieurs minima d'énergie potentielle atteints en fonction de la conformation initiale de la molécule.

12.1.2 Dynamique Moléculaire

12.1.2.1 Principe

La Dynamique Moléculaire (MD) est une méthode qui permet de décrire *in silico* l'évolution d'un système moléculaire au cours du temps en intégrant les équations du mouvement de Newton pour chacun des atomes le constituant. Les déplacements subis par les atomes sont la conséquence de leur propre énergie cinétique (E_{cin}) ainsi que des forces exercées par les atomes environnants, ces forces dérivant de l'énergie potentielle (E_{tot}). On définit l'énergie mécanique (E_{meca}) du système comme la somme de l'énergie cinétique (E_{cin}) et de l'énergie potentielle (E_{tot}) : $(E_{\text{meca}}) = (E_{\text{cin}}) + (E_{\text{tot}})$.

12.1.2.2 Equations du mouvement

La dynamique moléculaire permet de calculer la force exercée sur chaque atome et fournit différentes informations sur la trajectoire (vitesse et position des atomes). La force $F_i(t)$ qui s'exerce sur un atome i de coordonnées $r_i(t)$ au temps t est déterminée par dérivation de la fonction énergie potentielle E_{tot} :

$$F_i(t) = -\frac{\partial E_{\text{tot}}}{\partial r_i(t)} \quad (12.3)$$

D'autre part, les équations de la mécanique classique nous donnent, pour N atomes :

$$\forall i = 1 \dots N, F_i = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} \quad (12.4)$$

La combinaison des équations 12.3 et 12.4 nous donne les équations différentielles suivantes :

$$\forall i = 1 \dots N, m_i \frac{\partial^2 r_i(t)}{\partial t^2} = -\frac{\partial E_{\text{tot}}}{\partial r_i(t)} \quad (12.5)$$

En considérant un pas de temps très court, on peut intégrer les équations du mouvement (12.5) et obtenir une trajectoire de chaque atome en fonction du temps.

12.1.2.3 Intégration des équations

L'algorithme utilisé pour intégrer les équations du mouvement dans UFF est l'algorithme *Leap frog*, aussi appelé *Saute mouton* (Hockney and Goel, 1974). Le principe consiste en la détermination des valeurs de l'énergie potentielle au cours du temps. Connaissant la position et la vitesse de chaque atome au temps t , on détermine ces valeurs au temps $t + \Delta t$. Δt doit permettre de décrire les phénomènes physiques des molécules tels que les vibrations de liaisons. Plus le Δt est petit, moins on introduit d'erreur, mais plus le temps de calcul est long. Il faut donc trouver un compromis entre précision et rapidité (voir section suivante 12.1.2.4 "Contraintes méthodologiques"). L'algorithme de *Leap frog* est basé sur celui de Verlet (Verlet, 1967).

L'algorithme de Verlet est dérivé de deux développements en série de Taylor :

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \underbrace{v_i(t)}_{\frac{\partial r_i(t)}{\partial t}} \Delta t + \frac{1}{2!} \underbrace{\frac{F_i(t)}{m_i}}_{\frac{\partial^2 r_i(t)}{\partial t^2}} (\Delta t)^2 + \frac{1}{3!} \frac{\partial^3 r_i(t)}{\partial t^3} (\Delta t)^3 + O[(\Delta t)^4] \quad (12.6)$$

$$r_i(t - \Delta t) = r_i(t) - v_i(t) \Delta t + \frac{1}{2!} \frac{F_i(t)}{m_i} (\Delta t)^2 - \frac{1}{3!} \frac{\partial^3 r_i(t)}{\partial t^3} (\Delta t)^3 + O[(\Delta t)^4] \quad (12.7)$$

Sommés, les développements (12.6)+(12.7) permettent d'obtenir l'algorithme de propagation des positions suivant :

$$r_i(t + \Delta t) + r_i(t - \Delta t) = 2r_i(t) + \frac{F_i(t)}{m_i}(\Delta t)^2 + O [(\Delta t)^4]$$

Soustraits, les développements (12.7)-(12.6) permettent d'obtenir l'expression des vitesses :

$$v_i(t) = \frac{r_i(t + \Delta t) - r_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} + O [(\Delta t)^3]$$

Dans le cas de l'algorithme de *Leap frog*, les positions sont obtenues pour des intervalles de temps entiers. Les vitesses, quant à elles, sont calculées pour des intervalles de temps demi entiers. Dans ce cas, on peut définir les vitesses comme :

$$v_i(t + \frac{\Delta t}{2}) = \frac{r_i(t + \Delta t) - r_i(t)}{\Delta t}$$

$$v_i(t - \frac{\Delta t}{2}) = \frac{r_i(t) - r_i(t - \Delta t)}{\Delta t}$$

Ce qui permet d'exprimer les positions de la manière suivante :

$$r_i(t \pm \Delta t) = r_i(t) \pm v_i(t + \frac{\Delta t}{2})\Delta t$$

On obtient alors pour les vitesses :

$$v_i(t + \frac{\Delta t}{2}) = v_i(t - \frac{\Delta t}{2}) + \frac{F_i(t)}{m_i}\Delta t$$

En pratique, possédant la vitesse au temps $t - \frac{\Delta t}{2}$, on calcule celle au temps $t + \frac{\Delta t}{2}$. Pour ce pas d'intégration, il est possible de calculer les vitesses courantes au temps t :

$$v_i(t) = \frac{v_i(t - \frac{\Delta t}{2}) + v_i(t + \frac{\Delta t}{2})}{2}$$

On peut alors calculer les positions des atomes au temps t , etc. (cf. figure 12.5).

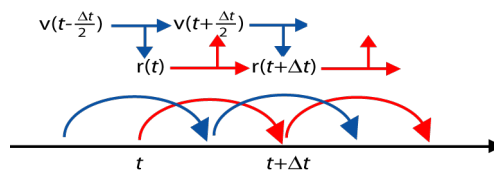


FIGURE 12.5 Représentation schématique de l'algorithme Leap frog

12.1.2.4 Contraintes méthodologiques

Mouvements rapides

Afin de minimiser l'erreur lors de l'intégration des équations du mouvement, il faut que le pas de temps soit au moins 10 à 20 fois inférieur aux fréquences (les plus élevées) de vibrations des liaisons chimiques (cf. tableau 12.1). Le fait de bloquer certaines vibrations de haute fréquence à température ambiante permet d'augmenter le pas d'intégration. Le pas utilisé se situe alors généralement entre 1 et 2 fs (1 femtoseconde = 10^{-15} s).

TABLE 12.1 *Fréquences vibratoires typiques de quelques liaisons.*

Type de liaison	Mode de vibration	fréquence [cm^{-1}]
C-H, O-H, N-H	étirement	3000-3500
C=C, C=O	étirement	1700-2000
H-O-H	flexion	1600
C-C	étirement	1400-1600
C-C-C	flexion	800-1000
O-H \cdots O	libration	400-700
O-H \cdots O	étirement	50-200

Vitesses initiales

L'algorithme *Leap frog* induit la nécessité de connaître les vitesses au temps $t = t_0 - \frac{\Delta t}{2}$. Si ces données ne sont pas disponibles, des vitesses initiales aléatoires vont être générées à partir d'une loi de distribution de Maxwell pour une température T donnée.

Conditions périodiques

En dynamique moléculaire, le système simulé est de dimensions finies. Toutes les molécules de l'environnement sont contenues dans un volume élémentaire appelé "boîte". La taille finie du système pose des problèmes d'effets de bords à l'interface avec le vide environnant. Les molécules en périphérie de la boîte ne subissent pas le même environnement que le reste des molécules. Pour minimiser ces effets de bord, des conditions périodiques aux limites sont utilisées afin de simuler un environnement infini. La boîte contenant le système est entourée de chaque côté par une réplique d'elle-même (cf. figure 12.6). Tout ce qui se passe dans la boîte initiale est recopié simultanément dans les répliqués. Ceci permet, par exemple, qu'une molécule à l'extrême gauche interagisse avec une molécule à l'extrême droite, ou qu'une molécule du haut de la boîte interagisse avec une molécule du bas de la boîte (cf. figure 12.6). Les calculs ne sont effectués que dans la boîte centrale mais les interactions avec les boîtes répliqués sont prises en compte.

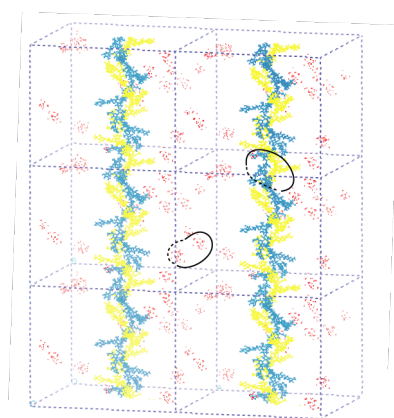


FIGURE 12.6 *Exemple de conditions périodiques répétées à l'infini. Les calculs ne s'effectuent que dans la cellule centrale, mais les interactions avec les cellules voisines sont prises en compte (cercles noirs). L'exemple choisi montre une double hélice de xanthane (jaune et bleu) en présence de cations Cu^{2+} et Na^+ solvatés par des molécules d'eau (rouge et blanc).*

Contrôle de la pression, de la température et du volume

Afin de mimer au mieux nos systèmes expérimentaux, la température et le volume sont gardés constants. Ces contraintes sont imposées par les conditions expérimentales de nos titrages de xanthane menés à T constante et à [xanthane] connue (or une définition de concentration exige la connaissance d'un volume fixe de référence). La pression est alors la grandeur thermodynamique qui varie (ses variations restent faibles). De nombreuses méthodes, dépendantes du programme de dynamique moléculaire utilisé, existent. Nous avons utilisé le logiciel Cerius² d'Accelrys^R où est implémenté la méthode du bain thermique (Berendsen et al., 1984) afin de garder la température et le volume à des valeurs prédéfinies tout en gardant les variations de pression les plus faibles possibles. Les équations du mouvement sont modifiées suite à la relaxation de la pression et/ou de la température instantanées ($P_i(t)$ ou $T_i(t)$) vers une valeur de référence P ou T. La taille de la boîte de simulation reste bloquée pour garantir un volume constant, alors les coordonnées atomiques sont ajustées : la pression et la température se voient modifiées, on les force à tendre vers la valeur de référence :

$$\frac{dP_i(t)}{dt} = \frac{P - P_i(t)}{\tau_P}$$

$$\frac{dT_i(t)}{dt} = \frac{T - T_i(t)}{\tau_T}$$

Lors de nos simulations numériques, nous avons donc utilisé le mode **constant NVT**, afin de garder le nombre de mole, la température et le volume constant tout au long de l'expérience, la méthode du bain thermique garantissant de faibles variations de pression.

Méthode du "recuit simulé"

Lors des simulations numériques en Dynamique Moléculaire (MD), le temps de calcul pour un système de grande taille (plus de 1000 atomes) peut devenir très long avant d'observer un changement conformationnel. Pour accélérer artificiellement la recherche du minimum d'énergie potentielle, une méthode consiste à élever fortement la température du système (parfois jusqu'à 1000K) afin de permettre aux molécules de passer des barrières d'énergies plus rapidement, et d'aller ainsi explorer de nouvelles conformations (Levy et al., 1996). Cette période à haute température est ensuite suivie d'un retour aux températures expérimentales (généralement 300K), afin de permettre aux molécules de se relaxer, et d'être certain que l'état atteint est stable à basse température. D'emblée, il apparaît que cette méthode, dite du "recuit simulé" peut conduire à des états métastables, qui n'auraient pas été observés si la température était restée basse et le temps de simulation augmenté. Pourtant, en pratique, la montée en température jusqu'à plus de 600K garantit une bonne exploration de l'espace conformationnel et, par là même, une solution généralement proche du minima global d' E_{tot} , (Aristilde and Sposito, 2008). Cette méthode du "recuit simulé" a été largement utilisée en MD sur différents substrats dont les polysaccharides (Peric et al., 2008; Aristilde and Sposito, 2008; Levy et al., 1996). En définitive, elle permet de secouer vigoureusement notre boîte de simulation afin d'agiter les molécules qu'elle contient, et ainsi accélérer les rencontres moléculaires conduisant à un état d'équilibre ; après cette agitation forcée, la boîte est à nouveau laissée "au repos" à 300K afin que les conformations finales atteintes s'équilibrent.

Il est important de réaliser qu'un composé organique (riche en C, H et O) porté à très haute température en MD ne pourra jamais être détruit, puisque les liaisons sont explicitement définies comme des ressorts incassables en modélisation moléculaire. On ne peut donc pas observer de pyrolyse, et l'augmentation de la température peut alors être interprétée comme un changement d'échelle temporelle (on explorera plus rapidement les différentes conformations accessibles à la molécule à haute T qu'à basse T).

12.1.3 Construction des "boîtes" modèles

12.1.3.1 Le problème du système équivalent

Lors de nos simulations numériques en modélisation moléculaire, le souci principal a été de construire des systèmes modèles approchant au mieux la réalité i.e. construire des boîtes élémentaires de modélisation de volume $d\tau$ contenant les mêmes quantités de matière en xanthane, cuivre, eau, et FI qu'un volume $d\tau$ du réacteur dans lequel nos expériences de titrages ont été réalisées. Un calcul simple (proposé au tableau 12.2) permet de relier concentration et nombre de molécules par volume élémentaire $d\tau$. Cette recherche du système modèle proche du système réel est appelée "le problème du système équivalent". Le tableau 12.2 montre que pour reproduire à l'identique nos systèmes réels, il conviendrait de placer dans une boîte cubique de 100 Å de côté, 0.6 monomère de xanthane, 33121 molécules d'eau, entre 0.28 et 1.41 molécules de Cu^{2+} , et environ 60 molécules de Na^+ et NO_3^- . Puisqu'à l'échelle moléculaire, les nombres non-entiers n'ont pas de sens (e.g. il est impossible de définir 0.6 monomère de xanthane ou 0.28 atome de cuivre), le volume élémentaire doit être agrandi de sorte que le nombre de chaque particule qu'il contient puisse être arrondi à une valeur entière. Mais en augmentant la taille du volume élémentaire d'un cube de 100 Å de côté à 250 Å de côté (cf. tableau 12.2) afin d'obtenir des valeurs entières du nombre de chaque particule, on complique également les calculs en ajoutant énormément d'atomes (eau et xanthane - garder à l'esprit que chaque monomère de xanthane comporte environ 120 atomes).

TABLE 12.2 *Systèmes équivalents entre expérience (quantités de matière en mol/L) et modélisation (quantité de matière en particule par volume élémentaire).*

Molécule ou atome	C_1 concentration lors des exp. de titrage en [mol/L]	$C_2 = N_A \cdot C_1$ concentration en [particules/L]	$C_3 = C_2 \cdot 1000$ concentration en [particules/m ³]	$N_1 = C_3 \cdot d\tau_1$ nombre de particules par cube élémentaire $d\tau_1$ de 100*100*100 Å ³	$N_2 = C_3 \cdot d\tau_2$ nombre de particules par cube élémentaire $d\tau_2$ de 250*250*250 Å ³
H ₂ O	55	$3.31 \cdot 10^{25}$	$3.31 \cdot 10^{28}$	33121	517515
Monomères du Xanthane (1g/L)	$1.02 \cdot 10^{-3}$	$6.14 \cdot 10^{20}$	$6.14 \cdot 10^{23}$	0.61	9.6
H ⁺ (pH=3)	10^{-3}	$6.022 \cdot 10^{20}$	$6.022 \cdot 10^{23}$	0.60	9.4
H ⁺ (pH=5.5)	$10^{-5.5}$	$1.90 \cdot 10^{18}$	$1.90 \cdot 10^{21}$	0.0019	3
Cu ²⁺ min/max	$3 \cdot 10^{-5} / 1.5 \cdot 10^{-4}$	$1.80 \cdot 10^{19} / 9.03 \cdot 10^{19}$	$1.80 \cdot 10^{22} / 9.03 \cdot 10^{22}$	0.0181	0.28/1.41
NO ₃ ⁻ min/max	$6 \cdot 10^{-5} / 3 \cdot 10^{-4}$	$3.61 \cdot 10^{19} / 1.81 \cdot 10^{20}$	$3.61 \cdot 10^{22} / 1.81 \cdot 10^{23}$	0.036	0.56/2.82
Na ⁺ et NO ₃ ⁻ (FI)	0.1	$6.02 \cdot 10^{22}$	$6.02 \cdot 10^{25}$	60	941
Nombre total approximatif d'atome par boîte élémentaire				33500	523000

N_A : nombre d'Avogadro = $6.022 \cdot 10^{23}$

$d\tau_i$: cube élémentaire de 100 ou 250 Angströms de côté, $d\tau_1 = (100 \cdot 10^{-10})^3 = 10^{-24} \text{ m}^3$, $d\tau_2 = (250 \cdot 10^{-10})^3 = 1.56 \cdot 10^{-23} \text{ m}^3$

1 m³ = 1000 L

Il est évident que les calculs en modélisation moléculaire ne permettent pas actuellement de réaliser des simulations comportant plus de 30000 atomes dans un temps de calcul raisonnable (quelques semaines). En particulier, le nombre très élevé de molécules d'eau d'un système modèle idéal (≈ 33100 pour un volume de 100 Å³) n'est pas gérable (le temps de calcul en MD augmentant exponentiellement en fonction du nombre d'atomes à gérer). Nous avons donc été contraints de simplifier les systèmes modèles en faisant des choix nous permettant d'observer les complexes Cu-xanthane le mieux possible. Nous avons gardé dans le volume élémentaire entre 10 à 20 monomères de xanthane

afin de pouvoir observer la formation d'hélices (ce dernier étant connu pour avoir un tour d'hélice à 5 résidus par tour, le choix du nombre de monomères est arrêté sur un multiple de 5). Le tour d'hélice 5_1 ayant été affiné par modélisation moléculaire à $h = 4.3$ nm (Perez and Vergelati, 1987), notre volume élémentaire a été fixé à un parallélépipède rectangle de 100 \AA^2 de base et $2 \cdot h = 86 \text{ \AA}$ de hauteur (afin de pouvoir générer 2 tours d'hélice dans chaque boîte dans le sens de sa hauteur). Nous avons ensuite ajouté 5 à 10 cations Cu^{2+} par boîte élémentaire, chacun solvaté par 20 molécules d'eau (les résultats préliminaires ayant montré que ces 20 molécules permettent une solvatation par deux couches de molécules d'eau, rendant les échanges de molécules d'eau possible). Enfin la neutralité de la charge a été maintenue en ajoutant une quantité déterminée de contre ions du FI. En pratique, le xanthane étant globalement négativement chargé, et les Cu^{2+} ne suffisant pas forcément pour neutraliser cette charge, les seuls ions du FI ajoutés ont été entre 0 et 10 Na^+ (chacun solvaté par 10 molécules d'eau). Les ions H^+ en quantité négligeable par boîte élémentaire (cf. tableau 12.2) n'ont pas été ajoutés dans les systèmes simulés. En réalité, le pH est déjà modélisé par la proportion des sites carboxylates (déprotonés) et acides (protonés) dans le xanthane (décrit à la section suivante 12.1.3.2 "Synthèse du polysaccharide xanthane"). Enfin, le fond ionique NaNO_3 n'a pas été entièrement pris en compte, mais sachant qu'il affecte la conformation du xanthane (cf. partie II, chapitre 6 du présent manuscrit) une attention particulière a été portée aux conformations du xanthane lors de la construction des systèmes modèles (cf. sections suivantes). Les concentrations équivalentes de nos systèmes modèles variaient donc entre 20 et 40 g/L en xanthane et 10 à 20 mmol/L en Cu^{2+} , ce qui est un ordre de grandeur au dessus du système réel de titrage (cf. tableau 12.3). L'augmentation de la concentration en cuivre a été étudiée expérimentalement lors de nos expériences d'isotherme d'adsorption jusqu'à la limite de 2 mmol/L pour du xanthane à $1 \text{ mmol}_{\text{monomère}}/\text{L}$. Or le comportement du xanthane est considéré comme linéaire entre 0.1-50 $\text{mmol}_{\text{monomère}}/\text{L}$ (Milas and Rinaudo, 1979). Il est donc attendu d'observer le même type de comportement pour les complexes entre du xanthane à $\approx 10\text{-}50 \text{ mmol}_{\text{monomère}}/\text{L}$ avec du Cu^{2+} à $\approx 20\text{-}100 \text{ mmol}/\text{L}$ que ce que l'on observe lors d'expériences sur du xanthane à $1 \text{ mmol}_{\text{monomère}}/\text{L}$ avec du Cu^{2+} à $\approx 2 \text{ mmol}/\text{L}$. Ces arguments justifient la composition de nos systèmes modèles. Nous verrons par la suite que nous avons également mené des simulations avec un très grand nombre de molécules d'eau (environ 2000 par boîte¹), afin de s'assurer que la solvatation simple des cations (100-300 $\text{H}_2\text{O}/\text{boîte}$) donnait le même type de résultat qu'une solvatation plus complète de la boîte (2000 $\text{H}_2\text{O}/\text{boîte}$).

TABLE 12.3 *Systèmes choisis en modélisation moléculaire et équivalence en terme de concentration.*

Molécule ou atome	N Nombre de molécules par cube élémentaire $d\tau=100 \cdot 100 \cdot 86 \text{ \AA}^3 = 8.6 \cdot 10^{25} \text{ m}^3$	$C_3 = N/d\tau$ concentration en [particules/ m^3]	$C_2 = C_3/1000$ concentration en [particules/L]	$C_1 = C_2/N_A$ concentration en [mol/L]
H_2O	150-300	$1.74 \text{ à } 3.48 \cdot 10^{26}$	$1.74 \text{ à } 3.48 \cdot 10^{23}$	0.3 à 0.6
Monomère xanthane	10-20	$1.16 \text{ à } 2.32 \cdot 10^{25}$	$1.16 \text{ à } 2.32 \cdot 10^{22}$	0.02 à 0.04
Cu^{2+}	10-20	$1.16 \text{ à } 2.32 \cdot 10^{25}$	$1.16 \text{ à } 2.32 \cdot 10^{22}$	0.02 à 0.05
Na^+	5-10	$0.553 \text{ à } 1.16 \cdot 10^{25}$	$0.553 \text{ à } 1.16 \cdot 10^{22}$	0.01 à 0.025

1. La solvatation idéale est réalisée pour environ 28500 molécules d'eau par boîte élémentaire de $100 \text{ \AA} \cdot 100 \text{ \AA} \cdot 86 \text{ \AA}$.

12.1.3.2 Synthèse du polysaccharide xanthane

Avant de synthétiser le polysaccharide xanthane, il est nécessaire de générer une banque de petites molécules à partir desquelles, par assemblage, nous synthétiserons le xanthane. Les règles générales utilisées lors de nos synthèses de petites molécules ou fragments de molécules sont les suivantes :

- Les charges partielles portées par les atomes sont calculées par la méthode d'équilibrage des charges Q_{eq} (Ding et al., 1992).
- La minimisation d'énergie potentielle (**ME**) utilise le **Smart minimizer** sous Universal Force Field (UFF), avec un critère de convergence de 10^{-3} kcal.mol⁻¹.Å⁻¹.

Les petites molécules et cations synthétisés présentés en figure 12.7 sont l'eau, les ions Cu²⁺ et Na⁺, le β -glucose, le β -mannose, l' α -mannose acétylé, et les fragments de molécules synthétisés sont le groupement carboxylique (COOH), le groupement carboxylate (COO⁻) (avec deux liaisons conjuguées C-O), le fragment d'acide β -glucuronique sans acide carboxylique, le fragment β -mannose(O4O6)-pyruvique sans groupement carboxylique.

La charge totale du carboxylate (COO⁻) est fixée à -1, puis on effectue l'équilibrage Q_{eq} et la minimisation **ME**. Les charges des cations Cu²⁺ et Na⁺ sont respectivement fixées à +2 et +1. Pour toutes les autres molécules ou fragments de molécules de la figure 12.7, la charge totale est moyennée à 0 avant d'effectuer le calcul d'équilibrage des charges et la minimisation (Q_{eq} et **ME**). Les charges partielles portées par les molécules d'eau, les fragments COO⁻ et COOH, les ions Cu²⁺ et Na⁺ sont données en figure 12.7. Par souci de concision, les charges partielles portées par les autres molécules ou fragments de molécules ne sont pas présentées.

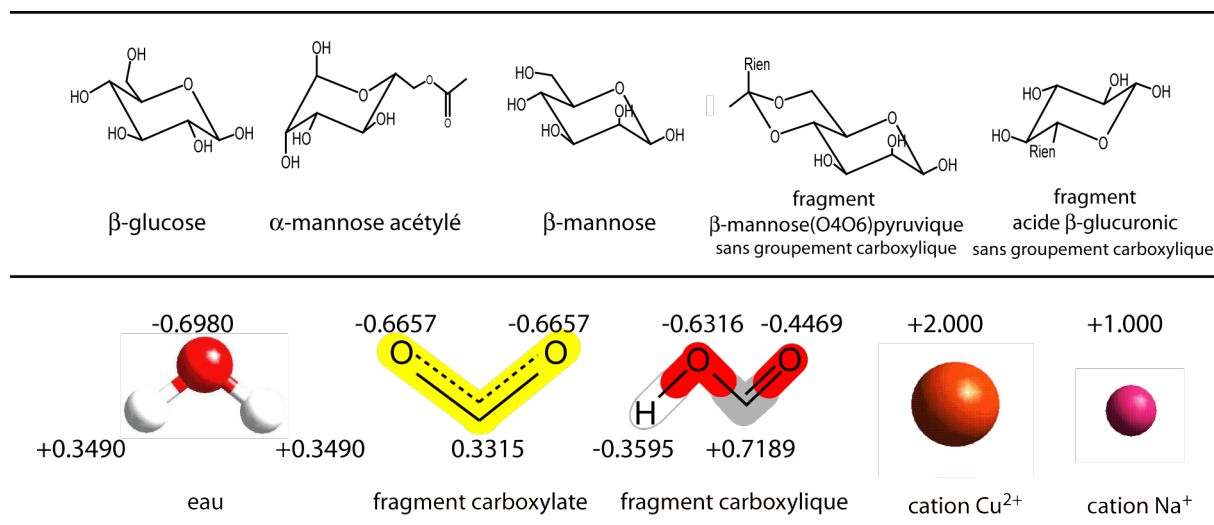


FIGURE 12.7 Petites molécules et fragments de molécules utilisés lors de nos simulations numériques et lors de la synthèse du xanthane. Rem : par la suite, les sites carboxylates COO⁻ seront systématiquement représentés en jaune.

Pour construire notre polysaccharide de xanthane, nous nous sommes appuyés sur nos résultats expérimentaux, indiquant la présence d'acide glucuronique et d'acétate sur chaque monomère, et la présence d'acide pyruvique en bout de chaîne latérale seulement un monomère sur deux. Nous avons également fait l'hypothèse d'une alternance régulière des monomères pyruvatés et non-pyruvatés, ce qui est généralement vérifié pour les polysaccharides bactériens.

Le xanthane est synthétisé à partir de la banque de fragments de molécules présentés en figure 12.7 selon le schéma de synthèse détaillée ci-après en figure 12.8. Une grande attention a été portée au calcul de la charge lors de la construction du polysaccharide. Succinctement, le principe est

de générer un polymère neutre (sans les groupements carboxylates et carboxyliques) et de faire converger sa charge à 0 en utilisant le Q_{eq} (cf. figure 12.8). Puis on ajoute les sites carboxylates et carboxyliques désirés en complétant la coordinance des carbones trivalent (dans les résidus GlcA et Pyr) en carbones tétravalents.

La proportion entre sites carboxyliques et carboxylates ajoutés est déterminée par le pH auquel on souhaite concevoir notre polysaccharide. Nos expériences ayant montré des comportements différents à pH3 et pH5.5, nous avons modélisé deux états de protonation du xanthane. Le tableau 12.4 indique le pourcentage de sites Glucuroniques et Pyruviques déprotonés aux pH3 et pH5.5. A pH 5.5, tous les acides sont déprotonés en groupements carboxylates, tandis qu'à pH3, tous les pyruviques sont déprotonés en pyruvates, mais seulement un glucuronique sur deux est déprotoné en glucuronate (cf. tableau 12.4). Nous avons choisi de laisser les groupements glucuroniques protonés sur les chaînes latérales présentant déjà un pyruvique déprotoné, et de laisser les glucuronates déprotonés sur les chaînes ne présentant pas de groupement pyruvique (i.e. un motif sur deux). Ce choix permet une meilleure homogénéisation de la charge le long du xanthane.

TABLE 12.4 Taux de déprotonation des groupements pyruviques et glucuroniques à pH 3.5 et pH 5.

pH	$\frac{\text{PyrCOO}^-}{\text{PyrCOOH}}$ % (pKa=2.26)		$\frac{\text{GlcCOO}^-}{\text{GlcCOOH}}$ % (pKa=3.02)	
	valeur exacte	approximation*	valeur exacte	approximation*
3	84.56	100	48.85	50
5.5	99.94	100	99.94	100

* prise en compte pour construire le xanthane au pH donné.

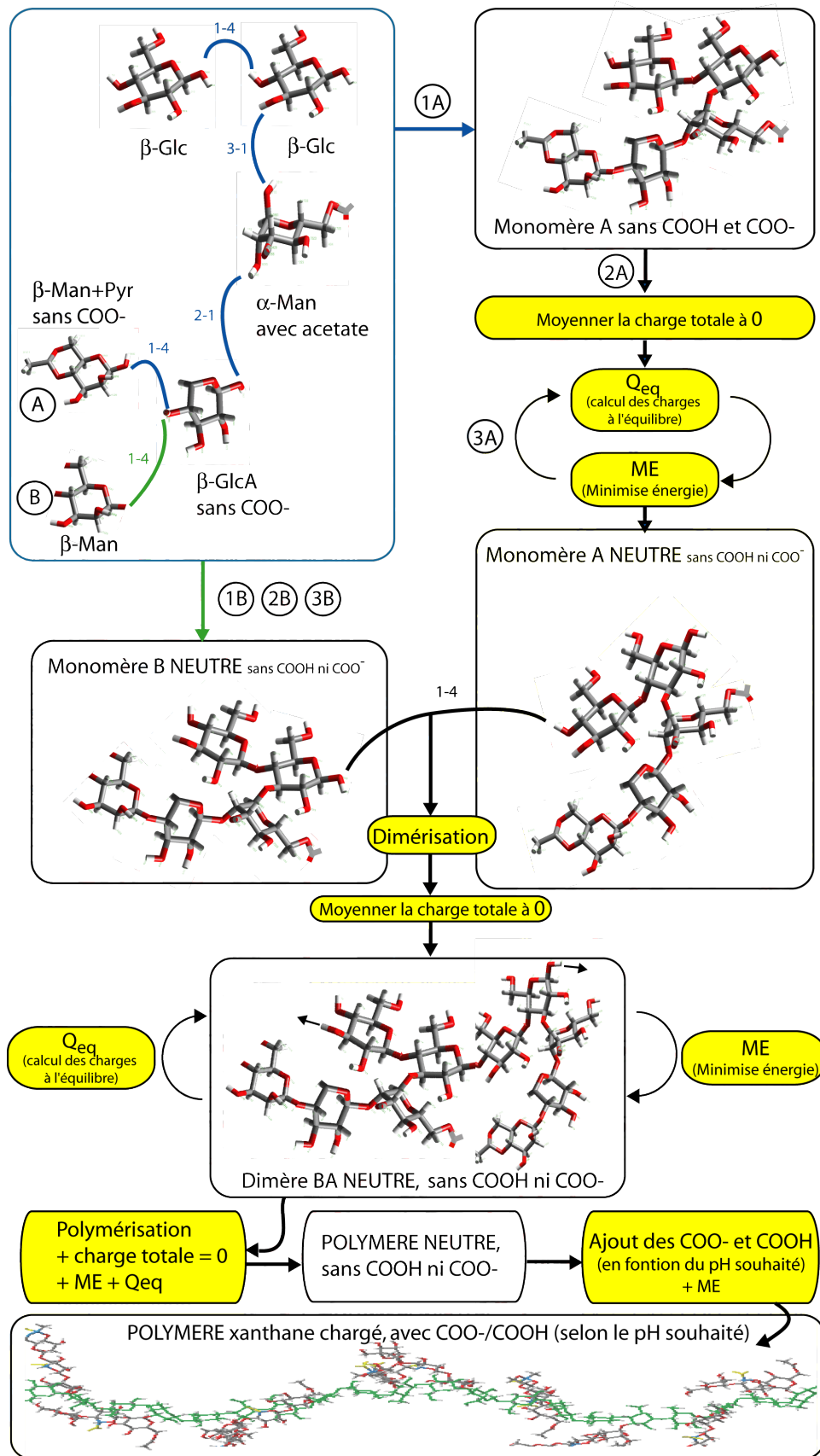


FIGURE 12.8 Principe de la synthèse de notre polysaccharide de xanthane. Les couleurs des atomes suivent le code usuel (gris=C, rouge=O, blanc=H) sauf pour la représentation du dernier polysaccharide ou les groupements carboxylates sont en jaune, et la chaîne principale du xanthane en vert.

12.1.3.3 Construction des conformations ordonnées et désordonnées du xanthane

Comme nous l'avons évoqué au cours de la Partie II du présent manuscrit, le xanthane est connu pour être présent sous différents états en solution : l'état ordonné et l'état désordonné. L'état désordonné est un coil. L'état ordonné est une hélice 5_1 . Il nous a donc fallu générer ces deux structures à partir de notre xanthane précédemment synthétisé.

Différents travaux ont été réalisés en modélisation moléculaire sur les hélices du xanthane (Chandrasekaran, 1999; Chandrasekaran and Radha, 1997; Millane, 1993) et elles font toutes référence aux travaux de Perez and Vergelati (1987) qui ont réalisé un travail important sur les différentes conformations d'hélice accessibles par le xanthane en solution. Perez and Vergelati (1987) proposent 5 structures différentes d'hélices. L'une paraît peu réaliste car elle n'implique aucune liaison hydrogène entre la chaîne principale et les chaînes latérales. Parmi les quatre autres structures, les hélices ont respectivement un pas de 3.16, 4.35, 4.88 et 4.93 résidus par tour d'hélice. C'est donc cette dernière conformation (4.93 résidus par tour d'hélice²) qui s'approche au mieux de la structure cristalline du xanthane proposée par Okuyama et al. (1980), et qui a été retenue lors de nos simulations pour représenter l'état ordonné du xanthane (cf. figure 12.9).

Afin de maintenir la périodicité des hélices construites, nous avons imposé comme condition aux limites une liaison $\beta(1-4)$ entre le premier glucose de la chaîne principale en bas de la boîte et le dernier glucose de la chaîne principale en haut de la boîte. Les hélices construites sont donc infinies.

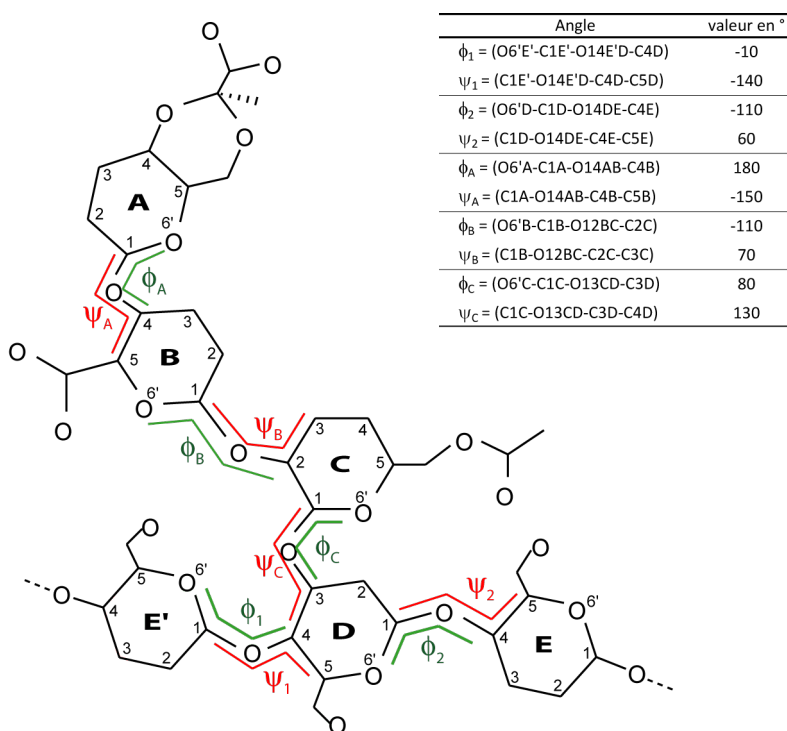


FIGURE 12.9 Squelette du xanthane et définition des angles dièdres de torsion caractéristiques (ϕ_i , ψ_i) dans la conformation hélicoïdale 5_1 (à exactement 4.93 résidus par tour d'hélice), d'après Perez and Vergelati (1987). Par souci de clarté, les hydroxydes simples liés aux hexoses n'ont pas été représentés. les cycles A, B, C, D et E correspondent respectivement aux hexoses α mannose (Man'), acide β glucuronique (GlcA), α mannose (Man), β glucose (Glc') et β glucose (Glc) déjà représentés en figure 6.1.

2. Il s'agit de la structure dénommée "X₃" par Perez and Vergelati (1987)

Hélices simples

La génération des hélices du xanthane avec les paramètres proposés à la figure 12.9 donne des hélices simples à 5 résidus par tour (représentée en figure 12.10), et d'une hauteur $h = 43 \text{ \AA}$ par tour d'hélice. Nous notons que le diamètre du cylindre contenant le xanthane sera au minimum de 4 nm. Le modèle de [Perez and Vergelati \(1987\)](#) est donc moins compact que celui de [Okuyama et al. \(1980\)](#), donnant la structure du solide, et pour qui le diamètre était estimé à 2 nm. Cela s'explique par des chaînes latérales plus ouvertes vers l'extérieur chez Perez que chez Okuyama, en raison d'un moins grand nombre de liaisons hydrogène. Toutefois, les paramètres de Perez ont été préférés à ceux d'Okuyama d'une part parce qu'ils concernent la modélisation du xanthane en solution alors qu'Okuyama s'intéressait à la DRX sur un solide cristallisé, et d'autre part car l'hélice de [Perez and Vergelati \(1987\)](#) reste vide en son centre, ce qui laisse la possibilité de générer des hélices doubles assez facilement. Les hélices simples ainsi générées seront nommées XSIMPLE dans toute la suite du document.

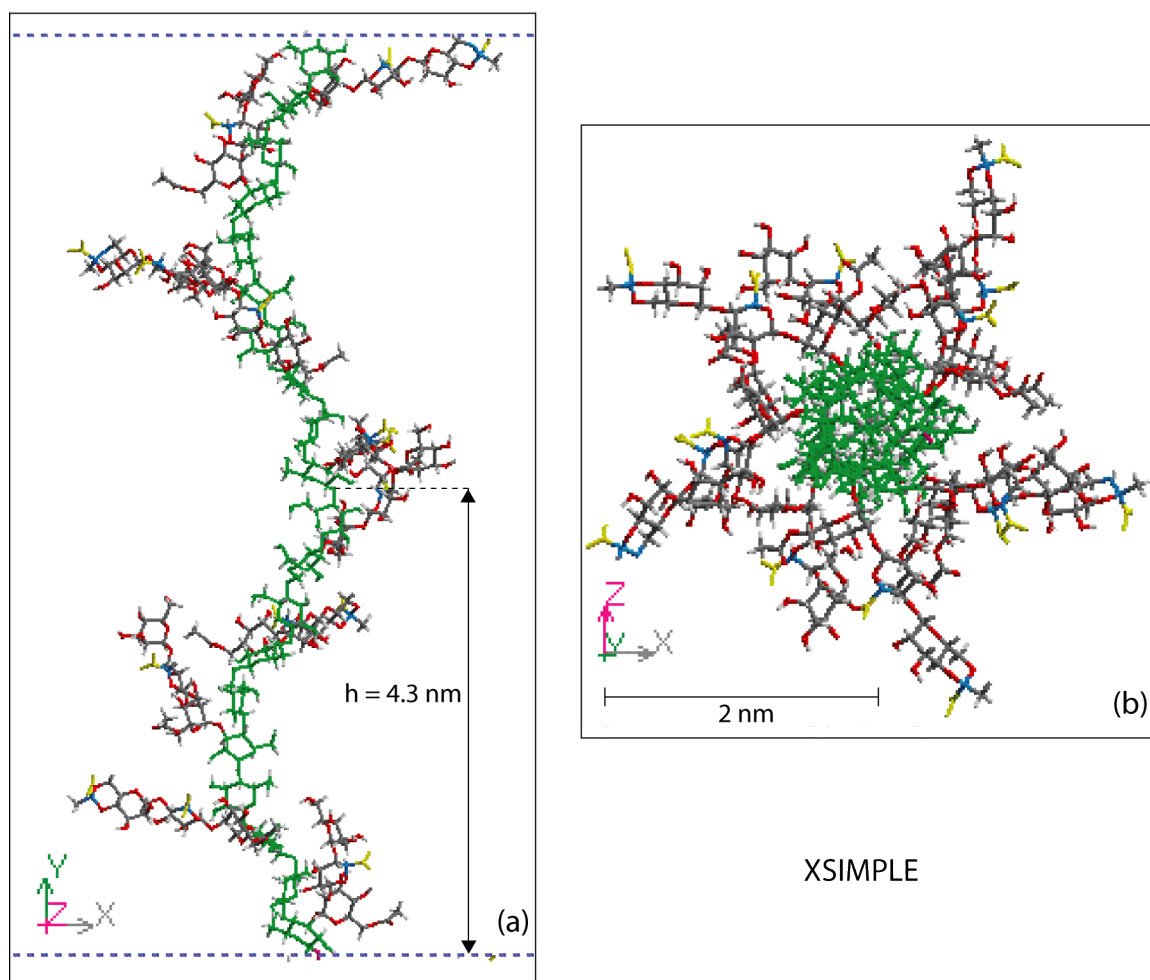


FIGURE 12.10 Vue axiale (a) et longitudinale (b) de deux tours d'hélice simple (XSIMPLE) de notre xanthane, générée à partir des paramètres de [Perez and Vergelati \(1987\)](#) rappelés en figure 12.9 dans une boîte de 86 \AA de hauteur. La chaîne principale de glucose est représentée en vert, tandis que les chaînes latérales respectent le code couleur usuel (gris=C, rouge=O, et blanc=H). Les groupements carboxyliques déprotonés (COO^-) sont représentés en jaune, et les carbones en α des carboxylates en bleu.

Hélices doubles

Nous avons déjà évoqué en Partie II que certains auteurs suggèrent que les hélices 5_1 du xanthane se combinent par deux pour former des doubles hélices parallèles ou antiparallèles (Sato et al., 1984,a,b; Okuyama et al., 1980; Holzwarth and Prestridge, 1977). Afin de réaliser une modélisation la plus complète possible, nous avons généré des structures en doubles hélices parallèles et antiparallèles à partir des hélices simples déjà réalisées. Pour ce faire, nous avons combiné dans une même boîte deux hélices en quinconce et en tête à queue (pour générer les systèmes antiparallèles) ou deux hélices parallèles. Afin d'optimiser la géométrie de ces doubles hélices, chaque fragment a été bloqué grâce à la commande "rigid bodie" sous Cerius² puis nous avons appliqué une ME, avant de relâcher les structures et de lancer une nouvelle ME. La figure 12.11 présente les hélices parallèles et antiparallèles ainsi générées. De même que pour les hélices simples, les conditions de périodicité rendent les hélices doubles infinies selon l'axe Oy (cf. figure 12.11). Les hélices ainsi générées seront nommées XANTI et XPARA dans toute la suite du document.

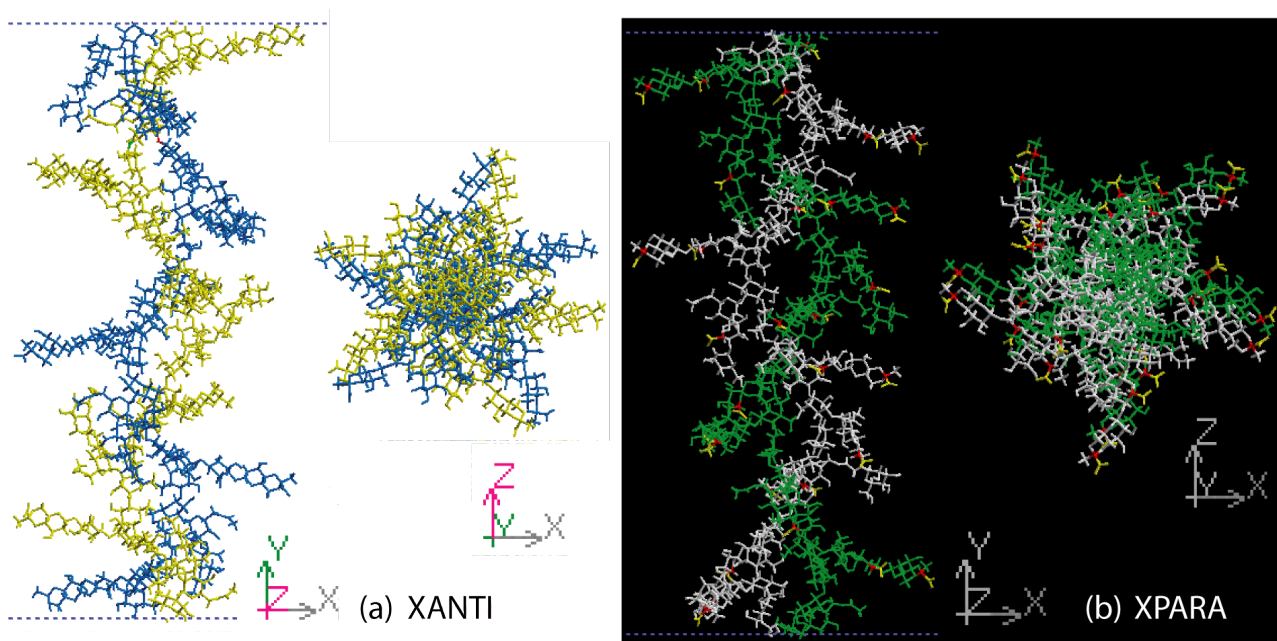


FIGURE 12.11 *Vue axiale et longitudinale de deux tours d'hélice double antiparallèle (XANTI) (a) et parallèle (XPARA) (b) de notre xanthane dans une boîte de 86 Å de hauteur. Chaque hélice simple a une couleur unique, afin de mieux observer la géométrie engendrée par la double hélice.*

Coils

Enfin, la dernière structure générée est le coil, qui représente un état désordonné du xanthane. Le coil doit présenter une chaîne principale beaucoup plus souple que les hélices, c'est à dire une chaîne principale décrivant une courbe aléatoire (et non ordonnée comme c'est le cas pour les hélices). Contrairement aux hélices, où les chaînes latérales s'arrangent le long de la chaîne principale, les coils doivent présenter des chaînes latérales beaucoup plus tournées et étendues vers l'extérieur. Nous avons généré ces coils de deux manières différentes qui se sont révélées équivalentes en termes de résultats. La première méthode consiste à prendre une hélice simple de 10 monomères (soit 2 tours d'hélice) mais sans conditions de périodicité (le bas de la cellule n'est plus attaché avec le haut, mais chaque bout de chaîne comporte un hydroxyde terminal) et de laisser l'hélice "collapser" (s'écrouler sur elle même) pendant la MD à haute température. Les coils ainsi générés sont appelés XCOIL. La seconde méthode est de partir d'une structure du xanthane de 10 monomères où les angles (ϕ_i, ψ_i) sont générés aléatoirement lors de sa polymérisation, et de lancer une dynamique préalable à haute puis basse température pour générer puis stabiliser le coil. Les coils générés par cette méthode sont appelés XKOIL. La figure 12.12 présente un coil obtenu par la première méthode lors de la MD.

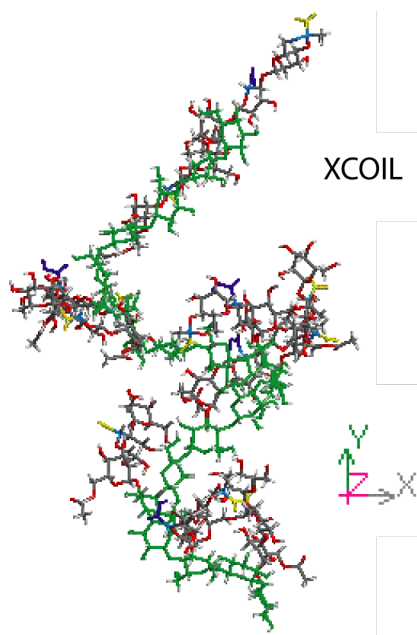


FIGURE 12.12 Allure caractéristique d'un coil du xanthane (XCOIL). La chaîne principale (en vert) décrit une courbe très variable d'une simulation à l'autre, les chaînes latérales sont plus ouvertes vers l'extérieur que dans les conformations hélicoïdales.

12.1.3.4 Conditions initiales

Rappelons que nos résultats expérimentaux, présentés en Partie II au chapitre 8, ont montré que le xanthane adsorbe plus de cuivre à pH3 qu'à pH5.5 et que ce comportement est corrélé à un changement conformationnel. Or le xanthane est connu pour être plus ordonné à pH neutre qu'à pH acide. Afin d'étudier si la modélisation confirme ou infirme ces résultats de laboratoire, nous avons construit deux types de systèmes de xanthane en présence de cuivre :

- **Xanthane désordonné à pH3.** Les boîtes contiennent alors un polymère de xanthane de type XCOIL ou XKOIL de 10 unités répétitives, ayant tous les groupements pyruviques déprotonés et un groupement glucuronique sur deux protoné.
- **Xanthane ordonné à pH5.5.** Les boîtes contiennent alors un (ou deux) polymère(s) de xanthane de type XSIMPLE, XANTI ou XPARA de 10 unités répétitives, ayant tous les groupements pyruviques et glucuroniques déprotonés.

Dans ces boîtes contenant le xanthane, il convient d'ajouter le cuivre (que l'on souhaite voir s'adsorber sur le polysaccharide) à raison d'un Cu^{2+} pour deux monomères de xanthane (les quantités de matière à ajouter au système ont déjà été évoquées à la section "Le problème du système équivalent"). Enfin, on ajoute le complément nécessaire en Na^+ au système afin de garantir la neutralité de la charge dans notre solution simulée, et également les molécules d'eau nécessaires à la solvataion initiale des cations métalliques (20 molécules d' H_2O par Cu^{2+} et 10 molécules d' H_2O par Na^{2+}) (cf. tableau 12.5). Les Cu^{2+} et les Na^+ entourés de leur gangue de solvataion sont placés aléatoirement dans l'espace de la boîte (en évitant les superpositions avec d'autres molécules). Les boîtes de modélisation ainsi construites sont appelées XCOILa, XKOILa, XSIMPLEa, XANTIa et XPARAa.

TABLE 12.5 Contenu des boîtes de modélisation moléculaires en fonction des différentes conformations : XCOIL, XKOIL, XSIMPLE, XANTI et XPARA et vérification de la neutralité globale de la charge dans chaque cellule.

Conformation	Xanthane à pH3		Xanthane à pH 5.5		
	XCOIL	XKOIL	XSIMPLE	XANTI	XPARA
Nombre de monomères par boîte	10	10	10	20	20
P^- = Nombre de pyruvates (déprotonés) par boîte	5	5	5	10	10
G^- = Nombre de glucuronates (déprotonés) par boîte	5	5	10	20	20
$\sigma^- = (P^- + G^-) * (-1)$ = Charge négative totale due au xanthane	-10	-10	-15	-30	-30
Nombre de Cu^{2+} par boîte	5	5	5	10	10
Nombre de Na^+ par boîte	0	0	5	10	10
σ^+ = Charge positive totale due aux Cu^{2+} et Na^+	10	10	15	30	30
Nombre total de molécules d'eau dans la boîte (20* $\text{H}_2\text{O}/\text{Cu}^{2+}$ et 10* $\text{H}_2\text{O}/\text{Na}^+$)	100	100	150	300	300
$\sigma^+ + \sigma^-$ = Charge Totale dans la boîte	0	0	0	0	0

Afin de s'assurer que nos résultats de MD sur les boîtes XCOILa, XKOILa, XSIMPLEa, XANTIa et XPARAa ne dépendent pas des conditions initiales sur les positions des Cu^{2+} et des Na^+ , nous avons reproduit des boîtes avec des conditions initiales différentes, en variant les positions spatiales des Cu^{2+} et Na^+ . Ces nouvelles conditions initiales (CI) sont appelées **b**, **c**, et **d**. La figure 12.13 présente un exemple de différentes CI dans les boîtes, avant l'ajout des polysaccharides (par souci de concision, l'intégralité des CI ne sont pas présentées graphiquement).

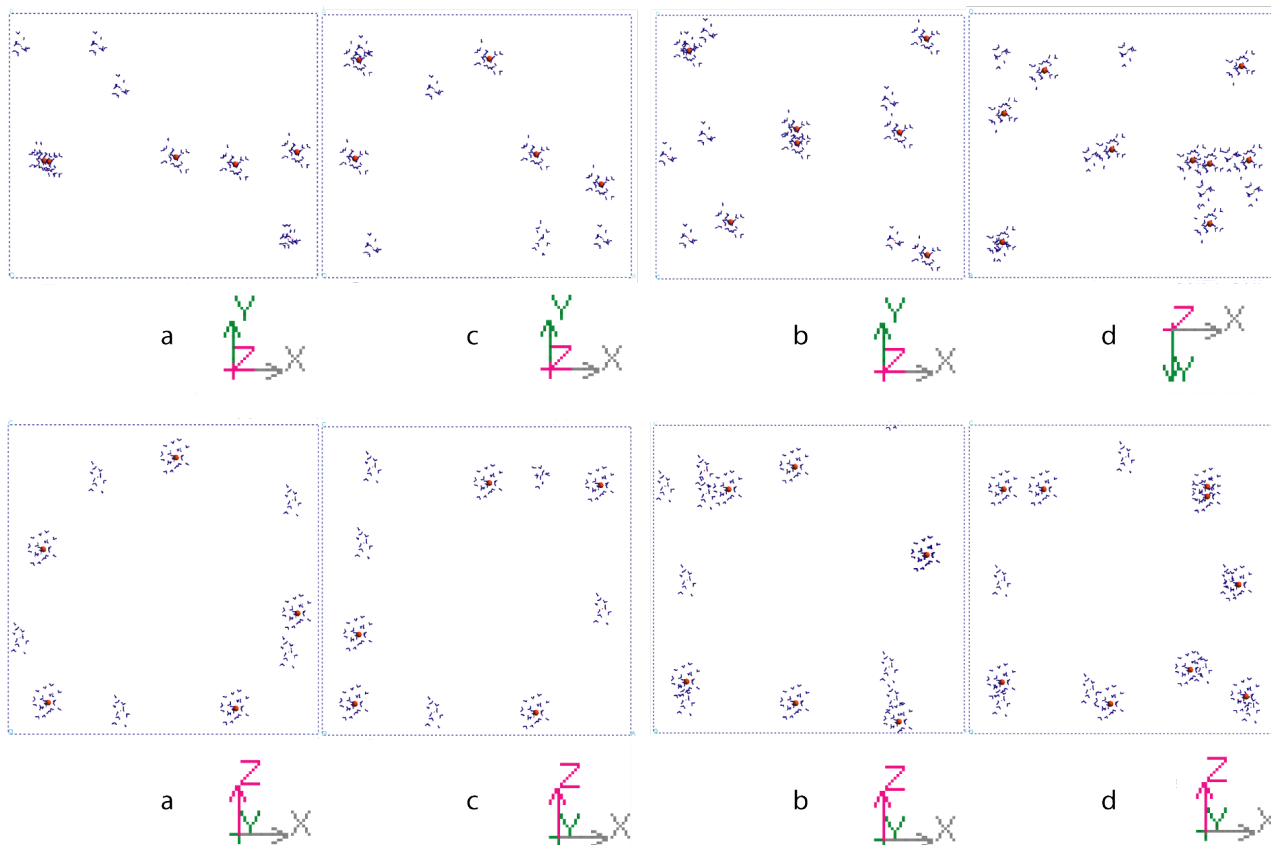


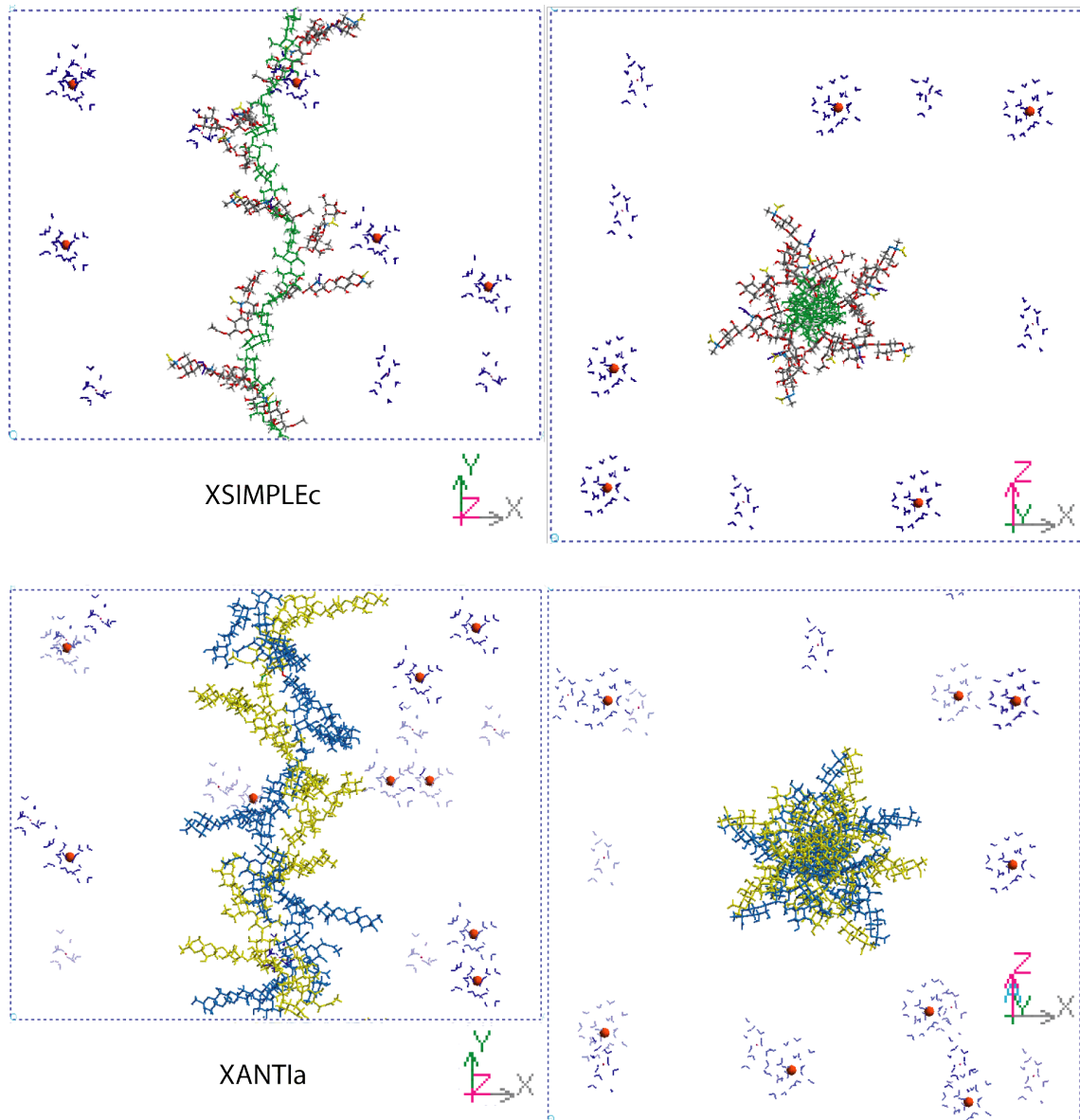
FIGURE 12.13 Exemples de CI dans la boîte, vue de profil (en haut) et vue de dessus (en bas). Les molécules d'eau sont représentées en bleu. Les nuages de 20 molécules d'eau solvatent les cation Cu^{2+} (boules oranges), tandis que les petits nuages de 10 molécules d'eau solvatent les cations Na^+ (petites boules roses difficilement discernables). Les CI de gauche (a) et (c) ont été appliquées à la conformation XSIMPLE pour former les boîtes XSIMPLEa et XSIMPLEc. Les CI de droite (b) et (d) ont été appliquées aux conformations XPARA et XANTI pour former les boîtes XPARAb, XPARAd, XANTIb et XANTIc

Avec le jeu de 5 conformations de xanthane différentes et 4 CI différentes, nous avons généré 18 boîtes prêtes à subir une dynamique moléculaire (MD). Le tableau 12.6 comptabilise toutes ces simulations, tandis que la figure 12.14 montre des exemples de boîtes prêtes pour la MD (par souci de concision, toutes les représentations graphiques des 18 boîtes de départ ne sont pas représentées).

TABLE 12.6 Récapitulatif de toutes les boîtes de modélisation prêtes pour la MD avec les CI a, b, c et d.

Conformations Conditions Initiales	XCOIL (pH3)	XKOIL (pH3)	XSIMPLE (pH5.5)	XANTI (pH5.5)	XPARA (pH5.5)
a	XCOILa	NR	XSIMPLEa	XANTIa	XPARAa
b	XCOILb	XKOILb	XSIMPLEb	XANTIb	XPARAb
c	XCOILc	NR	XSIMPLEc	XANTIC	XPARAc
d	XCOILD	XKOILD	XSIMPLEd	XANTId	XPARAd

NR: simulation non réalisée


FIGURE 12.14 Exemples de boîtes prêtes pour la MD : XSIMPLEc (en haut) et XANTIa (en bas) en vues longitudinale (à gauche) et axiale (à droite). Les molécules d'eau sont en bleu, les cations Cu^{2+} et Na^+ respectivement en boule orange et petite boule rose. Pour XSIMPLE, la chaîne principale du xanthane est en vert, les carboxylates en jaune portés par des carbones bleu, et le reste des chaînes latérales suit le code couleur conventionnel (gris=C, rouge=O, blanc=H). Pour XANTI, chaque hélice simple constituant la double hélice est représentée par une couleur unique (jaune ou bleu).

Enfin, nous avons effectué quatre simulations supplémentaires sur des systèmes mieux hydratés, en ajoutant 2000 molécules d'eau par boîte. Les conditions initiales avec 2000 molécules d'eau par boîtes sont dénommées CI **e**. Nous avons appliqué les CI **e** aux conformations XCOIL, XSIMPLE, XANTI et XPARA. Les systèmes ainsi réalisés (XCOILe, XSIMPLEe, XANTIe et XPARAe) sont plus réalistes que les systèmes **a**, **b**, **c**, **d**, mais leur temps de calcul est décuplé. La comparaison des résultats des simulations **e** avec les simulations **a**, **b**, **c**, **d**, nous permettra de dire si la prise en compte de 10 à 20 molécules d'eau par cation soit 100 à 300 molécules d'eau par boîte décrit un comportement similaire à la prise en compte de 2000 molécules d'eau par boîte. Nous pourrions donc conclure sur le réalisme des résultats obtenus avec les CI **a**, **b**, **c**, **d**. Le tableau 12.7 donne la composition des boîtes XCOILe, XSIMPLEe, XANTIe et XPARAe ; et la figure 12.15 présente deux exemples de CI **e**.

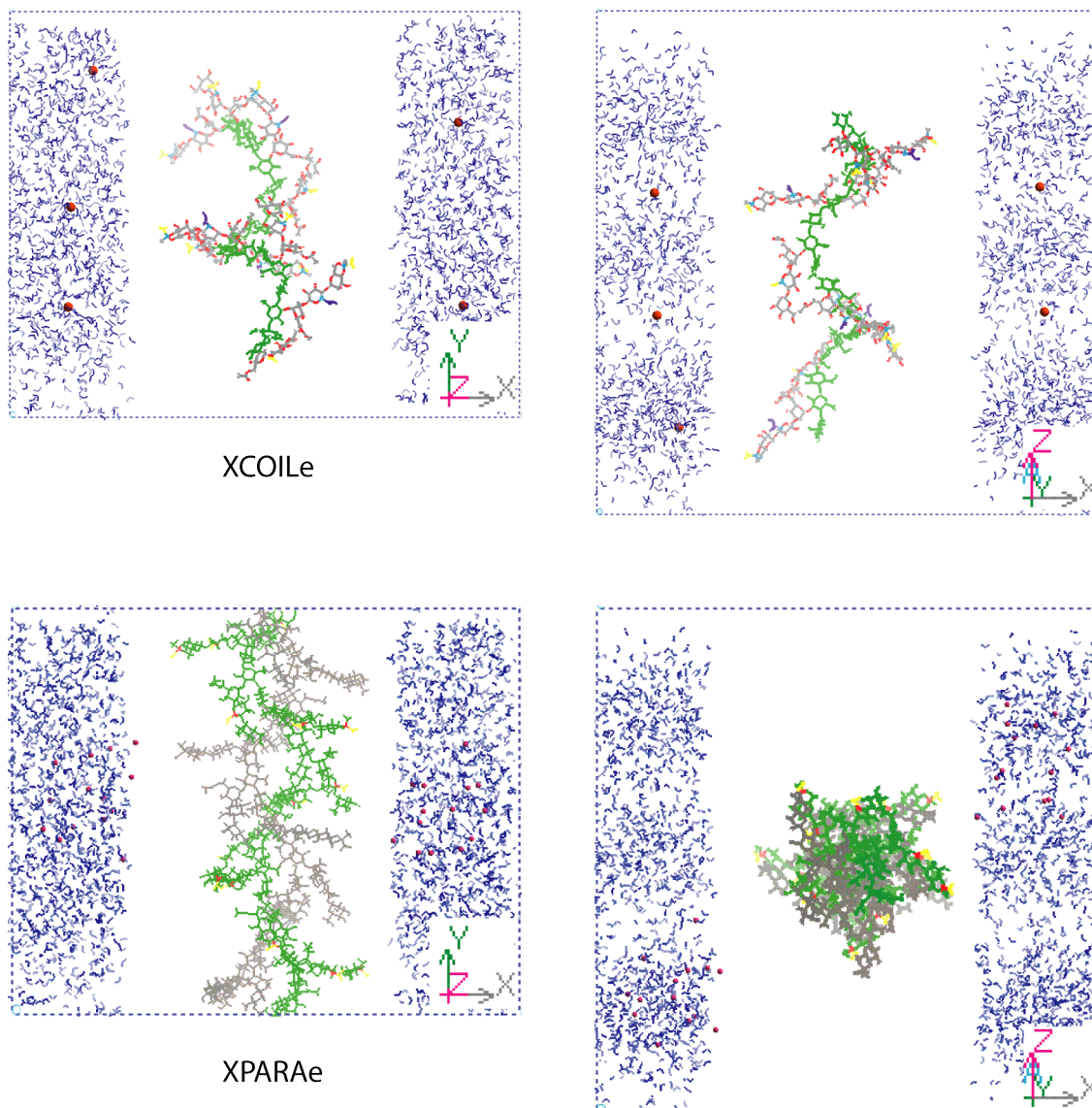


FIGURE 12.15 Représentation de deux conditions initiales de type **e** (hydratées). XCOILe (en haut) et XPARAe (en bas) en vue selon les axes Oz (à gauche) et Oy (à droite). Les molécules d'eau sont en bleu, les cuivres en orange, et les sodiums en rose.

TABLE 12.7 Composition des boîtes de simulation avec les CI e.

	Conformation du xanthane	Charge du (des) polymère(s)	Nombre de Cu^{2+} /boîte	Nombre de Na^+ /boîte	Nombre de molécules d'eau
XCOILe	XCOIL	-10	5	0	2000
XSIMPLEe	XSIMPLE	-15	0	15	2000
XANTle	XANTI	-30	0	30	2000
XPARAe	XPARA	-30	0	30	2000

Remarque : Le tableau 12.7 montre que nous avons effectué 3 essais d'humidification sans présence de cuivre, et un essai d'humidification avec présence de cuivre.

12.1.4 Scénarios en dynamique moléculaire

Après avoir construit l'ensemble des 22 boîtes de simulation, nous avons déterminé un scénario de dynamique moléculaire (MD) permettant de mener ces boîtes vers un état d'équilibre. Nous avons utilisé la méthode du recuit simulé (présentée à la section 12.1.2.4 "Contraintes méthodologiques") en poussant les systèmes à explorer différentes configurations à haute température (900K), puis en laissant se stabiliser chaque système à température ambiante pendant un temps long (300K). La phase de MD à 900K permet une meilleure exploration de l'espace conformationnel de la molécule que les phases à 300K (Levy et al., 1996). Le scénario appliqué à chaque système a été le suivant (cf. figure 12.16) :

- MD à 300K pendant 20ps.
- MD à 600K pendant 30ps.
- MD à 900K pendant 250ps.
- MD à 590K pendant 200ps.
- MD à 300K pendant 750ps à 1ns.

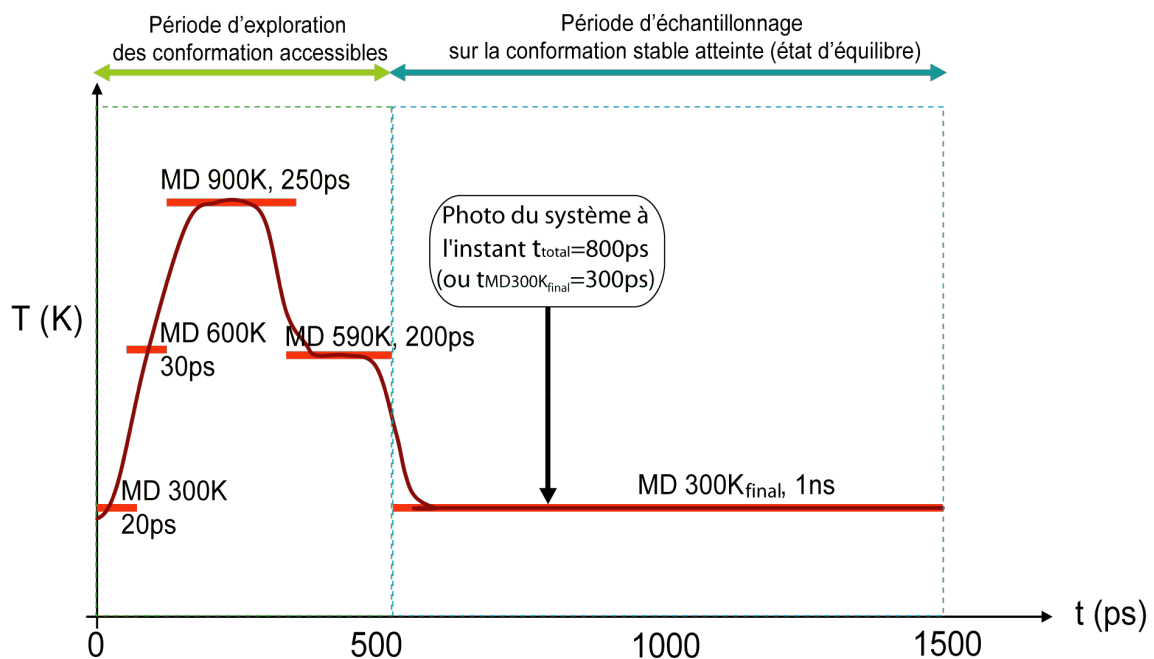


FIGURE 12.16 Scénario de dynamique moléculaire appliqué à tous nos systèmes.

La durée caractéristique nécessaire à l'adsorption de la majorité des cuivres dans la boîte à 900K a été préliminairement estimée à 200ps. Une minimisation d'énergie (ME, *Smart minimizer*, avec un critère de convergence de $10^{-3}\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-3}$) est systématiquement réalisée avant chaque dynamique moléculaire (MD). Techniquement, les MD ont été réalisées avec les paramètres suivants : interactions électrostatiques à longue portée calculées en utilisant la méthode d'Ewald (Ding et al., 1992), constante diélectrique $\epsilon = 1$, méthode *constant NVT* (nombre de moles, volume et température constants), contrôle de la température et de la pression à l'aide du thermostat et du baromètre de Hoover (Hoover, 1985; Evans and Holian, 1985) avec une constante de relaxation de 0.1 ps.

Les trajectoires des dynamiques moléculaires réalisées ont toutes été enregistrées. Chaque trajectoire est constituée d'une "photo"³ du système à un intervalle de temps régulier de 0.25 ps. L'enregistrement des trajectoires permet d'une part d'estimer à quel temps chaque cation Cu^{2+} est adsorbé sur le xanthane et d'autre part de réaliser des analyses fines sur la MD finale à 300K (e.g. RDF). La dernière MD à 300K doit avoir le temps d'échantillonnage le plus long possible, afin de pouvoir travailler correctement sur les statistiques (principalement distances interatomiques en fonction du temps).

Toutes les simulations numériques ont été effectuées au CERMAV, sur le serveur Gigondas du CERMAV ou sur le serveur du Centre d'Expérimentation et de Calcul Intensif en Chimie de l'Université Joseph Fourier (cecicsgi2). Le temps de calcul complet pour chaque simulation est d'environ trois semaines.

12.1.5 Outils d'analyse en modélisation moléculaire

Les propriétés de complexation du cuivre par le xanthane ont été évaluées sur les résultats en fin de scénario de dynamique, sur les MD à 300K d'une durée de 1ns (ou 750ps) sur les systèmes stabilisés.

12.1.5.1 Analyses préliminaires

Le premier travail d'analyse a été de passer en revue toutes les simulations effectuées, et de compter le nombre de Cu^{2+} adsorbés sur le xanthane (Cu_{ads}) ainsi que le nombre de Cu^{2+} non adsorbés, encore solvatés en solution (Cu_{libre}). Ce premier travail s'est effectué en **numérotant les cuivres** pour chaque simulation, afin de s'assurer que chaque cation métallique était bien pris en compte. Pour chaque cuivre, nous avons ensuite répertorié et compté les plus proches voisins (exclusivement des atomes d'oxygène) avec une distance limite de $d_{\text{lim}} = 2.6\text{Å}$ (valeur discutée ci-après) afin d'estimer la **coordinance totale** de chaque ion Cu^{2+} ⁴. La numérotation des sites et le calcul de leur coordinance totale se sont effectués sur une structure considérée comme stable atteinte pendant la dernière MD à 300K pour $t_{\text{MD300Kfinal}}=300\text{ps}$. Puisqu'on opère ainsi un "arrêt sur image", certains atomes d'oxygène seront à leur distance d'équilibre, d'autres (en cours de vibration) seront à une distance plus courte ou plus longue centrée sur cette valeur d'équilibre. Une simple ME sur des systèmes modèles $\text{Cu}^{2+}+\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Cu}^{2+}+\text{carboxylate}$ donne une idée de ces distances d'équilibre : $d_{\text{eq}}(\text{Cu}-\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}) = 2.12\text{Å}$ et pour $d_{\text{eq}}(\text{Cu}-\text{O}_{\text{carboxylate}}) = 2.09\text{Å}$. C'est pour prendre en compte les molécules participant à la coordination du cuivre mais situées au delà de leur distance d'équilibre à l'instant $t_{\text{MD300Kfinal}}=300\text{ps}$ que nous avons choisi une distance limite de $d_{\text{lim}} = 2.6\text{Å} > d_{\text{eq}}(\text{Cu}-\text{O}_{\text{H}_2\text{O}})$ et $d_{\text{eq}}(\text{Cu}-\text{O}_{\text{carboxylate}})$.

3. En réalité, chaque étape contient beaucoup plus d'information qu'une simple image du système à un temps donné puisque les coordonnées (x,y,z) de tous les atomes sont enregistrées à chaque instant t.

4. Rappelons qu'un débat existe dans la communauté scientifique quant aux nombres de voisins impliqués dans la sphère de coordination du cuivre libre (cf. Partie I, chapitre 4, section 3), trouve-t-on 5 ou 6 voisins oxygène ?

Ensuite, pour les cuivres adsorbés Cu_{ads} , nous avons analysé le type de site de fixation et vérifié que les Cu_{ads} se fixent exclusivement sur les carboxylates, et jamais sur des fonctions hydroxyles des oses ou sur des carboxyliques non déprotonés (afin de valider la robustesse de nos MD et en particulier du champ de force utilisé). Les différents sites d'adsorption ont été classés en différentes catégories :

- Les **sites simples**, ne faisant intervenir qu'un seul carboxylate lors de la complexation. Les sites simples peuvent logiquement être de deux types :
 - Les sites **P**, pour les Cu^{2+} liés à un seul pyruvate.
 - Les sites **G**, pour les Cu^{2+} liés à un seul glucuronate.
- Les **sites chelatants**, faisant intervenir deux sites carboxylates lors de la complexation. Pour les sites chelatants, il peut exister différentes combinaisons :
 - Les sites **PG**, pour les Cu^{2+} liés simultanément à un pyruvate et un glucuronate de deux chaînes latérales différentes.
 - Les sites **PP**, pour les Cu^{2+} liés simultanément à deux pyruvates de deux chaînes latérales différentes.
 - Les sites **GG**, pour les Cu^{2+} liés simultanément à deux glucuronates de deux chaînes latérales différentes.
 - Les sites **PGintra**, pour les Cu^{2+} liés simultanément à un pyruvate et un glucuronate de la même chaîne latérale.

Notons que les sites PGintra ne peuvent a priori pas survenir à pH3, car il n'existe pas de chaîne latérale présentant les deux acides (pyruvique et glucuronique) déprotonés à ce pH dans notre modèle (d'après nos hypothèses détaillées à la section 12.1.3.2 "Synthèse du polysaccharide xanthane"). L'existence des sites PGintra dans les systèmes à pH3 reste peu probable statistiquement, et irait à l'encontre de l'homogénéisation de la charge le long du polysaccharide.

12.1.5.2 Détermination des mécanismes d'adsorption du cuivre

Après avoir catalogué les sites d'adsorption du cuivre, nous nous sommes intéressés plus en détail aux mécanismes régissant l'adsorption des Cu^{2+} . Nous avons donc déterminé durant quelles phases de MD les cuivres se fixent sur les sites adsorbants (pendant la 1^{ère}MD à 300K ? la 2^{nde}MD à 600K ? la 3^{ème}MD à 900K ? ...). Une fois ce temps d'adsorption évalué, nous nous sommes intéressés au comportement dynamique du Cu_{libre} , c'est à dire à l'étude de la sphère d'hydratation du cuivre, et aux échanges des molécules d'eau qui la composent. Puis nous nous sommes intéressés au mécanisme de fixation du cuivre sur le xanthane, c'est à dire à son passage de l'état Cu_{libre} à Cu_{ads} . En particulier, il s'agit de déterminer si les complexes Cu-Xanthane formés sont des complexes de sphères externes, comme ceux observés en modélisation par [Peric et al. \(2008\)](#) sur des systèmes polyuronates- Ca^{2+} , ou des complexes de sphères internes impliquant une éjection des molécules d'eau de la sphère d'hydratation du cation métallique afin de libérer une place de coordination pour le ligand organique. Enfin, nous avons complété cette étude mécanistique par le suivi de la formation des complexes chelatants entre deux chaînes latérales différentes et intra-chaînes latérales : s'agit-il alors du même type de complexes (sphère interne ou externe ?) et le mécanisme est-il concerté ou non entre les deux sites de fixations ?

12.1.5.3 Calcul des énergies de stabilisation des complexes Xanthane-Cu

Les propriétés de complexation des cations métalliques sur des surfaces négativement chargées sont généralement dues à une baisse de l'Énergie du système lorsqu'il passe d'un état_{infini} (où le cation métallique et le ligand se trouvent à une distance infinie l'un de l'autre) à un état_{complexe} (où

le cation métallique se trouve fixé sur le ligand). L'énergie d'adsorption du cation métallique Me^{z+} sur le ligand L (ou énergie de complexation) associée à cette réaction est alors exprimée par :

$$E_{\text{adsMe}} = E(\text{état}_{\text{complexé}} : LMe) - E(\text{état}_{\text{infini}} : L\infty + Me\infty) \quad (12.8)$$

Dans cette définition (Eq. 12.8), une valeur négative de E_{adsMe} traduit une stabilisation du complexe par rapport à l'état_{infini}, alors qu'une valeur positive (improbable!) de E_{adsMe} traduirait une déstabilisation du complexe par rapport à l'état_{infini}.

Méthode directe pour l'évaluation de l'énergie de complexation globale de Cu^{2+} sur le xanthane.

En appliquant la définition de l'équation 12.8 aux systèmes Cu-Xanthane générés, nous pouvons calculer les énergies d'adsorption de chaque site complexé à l'intérieur de chacune des boîtes simulées. Pour toutes les simulations, nous avons extrait de la dernière dynamique de stabilisation à 300K la configuration moléculaire du système pour $t_{\text{MD300Kfinale}}=300\text{ps}$ ⁵. Sur cette configuration, considérée comme représentative de l'état stable du complexe Xanthane-Cu, nous avons calculé l'énergie totale du système complexé, que nous notons E_{tot} . Cette énergie E_{tot} est notre énergie de référence. Pour calculer l'énergie d'adsorption du cuivre sur le site j , notée $E_{\text{Cu-site}j}$, nous avons prélevé le cation Cu^{2+} de sa position complexée pour le mener à l'infini⁶ puis à nouveau calculé l'énergie du système, notée $E_{\text{tot sans Cu du site}j}$. Finalement l'énergie $E_{\text{Cu-site}j}$ d'adsorption de Cu^{2+} sur le site j du xanthane se calcule par la différence suivante présentée à l'équation 12.9. L'équation 12.9 nous a permis d'évaluer l'énergie d'adsorption de chaque site occupé ($E_{\text{Cu-site}j}$).

$$E_{\text{Cu-site}j} = E_{\text{tot}} - E_{\text{tot sans Cu du site}j} \quad (12.9)$$

Nous avons également évalué l'énergie de stabilisation des atomes de cuivre qui n'étaient pas adsorbés sur le xanthane mais encore solvatés par l'eau. Cette énergie de stabilisation d'un cation métallique libre $Cu^{2+}j$ par sa gangue de solvation, notée $E_{\text{Cu-libre}j}$, est calculée par différence entre l'énergie totale du système E_{tot} , et l'énergie du système auquel on a retiré le cuivre solvaté en laissant les molécules d'eau ($E_{\text{tot sans Cu-libre}j}$) (cf. Eq. 12.10) :

$$E_{\text{Cu-libre}j} = E_{\text{tot}} - E_{\text{tot sans Cu-libre}j} \quad (12.10)$$

Pour chaque grande boîte de simulation, l'énergie globale de complexation, notée $E_{\text{Cu-Xanthane}}$, peut être vue comme la somme des énergies d'adsorption des j sites complexés Cu-Ligand_{dans Xanthane} et des k sites non complexés (Cu^{2+} libres) donnée par l'équation 12.11 :

$$E_{\text{Cu - Xanthane}} = \underbrace{\sum_j E_{\text{Cu-site}j}}_{\text{énergie de stabilisation des cuivres adsorbés}} + \underbrace{\sum_k E_{\text{Cu-libre}k}}_{\text{énergie de stabilisation des cuivres solvatés}} \quad (12.11)$$

5. soit un temps total de simulation de $t_{\text{tot}}=800\text{ps}$, puisqu'avant la dernière MD à 300K, les MD(300K,20ps), MD(600K,30ps), MD(900K,250ps) et MD(590K,200ps) ont déjà été réalisées, cf. figure 12.16.

6. en pratique, déplacer le cuivre complexé à l'infini avec un calcul Ewald à longue distance, revient à le supprimer simplement du système.

Remarque 1 : Puisque que $0 > E_{\text{Cu-libre}j} > E_{\text{Cu-site}j}$ ⁷, plus la proportion de $\frac{C_{\text{Cu ads}}}{C_{\text{Cu libre}}}$ est grande, plus l'énergie globale de complexation $E_{\text{Cu-Xanthane}}$ sera négative, traduisant un meilleur pouvoir complexant du système.

Remarque 2 : Nous rappelons que les valeurs de l'énergie potentielle E1 et E2 de deux systèmes 1 et 2 différents ne peuvent pas être directement comparées en modélisation moléculaire, et que l'écart énergétique entre deux systèmes différents (par exemple XPARAa et XANTIa) n'a aucun sens physique, car cet écart énergétique est "champ de force dépendant"⁸. Par contre, la différence d'énergie potentielle ΔE_{1AB} entre 2 configurations A et B d'un même système 1 a un sens. Par exemple, elle peut exprimer une énergie d'adsorption (comme vu aux Eq. 12.8, 12.10 et 12.9). Il est donc possible de comparer la différence d'énergie dans un système 1 allant de l'état A à B avec la différence d'énergie d'un système 2 allant de l'état A à B si et seulement si ces deux différences d'énergie ont été générées par le même changement d'état A→B (e.g. déplacer un Cu^{2+} complexé à l'infini dans les mêmes conditions sur deux simulations différentes). De manière générale, en modélisation moléculaire, on ne travaillera donc pas en comparant directement des valeurs absolues d'énergie de systèmes différents, mais en comparant des différences d'énergie obtenues dans les mêmes conditions sur chaque système.

Méthode indirecte pour l'évaluation de l'énergie de complexation globale de Cu^{2+} sur le xanthane.

Nous avons développé une deuxième méthode afin d'estimer l'énergie de complexation globale de Cu^{2+} sur le xanthane. Cette méthode "indirecte" a pour but de retrouver les résultats de la méthode directe par un autre raisonnement, afin de valider ou non la robustesse de notre modèle et de nos simulations. La deuxième méthode, dite "méthode indirecte", consiste à travailler avec des petites molécules constitutives et réactives du xanthane (pyruvate, glucuronate, chaîne latérale du xanthane) que l'on va complexer au cation Cu^{2+} en présence d'eau. La méthode consiste à mettre en présence le minimum de molécules pouvant générer les sites hexacoordonnés suivants : Cu-libre, sites P, G, PP, PG, GG, PGintra ; soit au total 12 molécules (cf. tableau 12.8). Les calculs d'énergie sur les petits systèmes construits sont décrits au paragraphe suivant. Un atout majeur de cette "méthode indirecte" est de proposer des temps de calculs très rapides, liés à des systèmes simples.

Dans un premier temps nous avons catalogué les différents types de sites d'adsorption qui existent entre xanthane et Cu^{2+} . Ces différents sites ont été mentionnés à la section précédente : sites simples **P**, et **G**, sites chelatants **PG**, **PP**, **GG** et **PGintra**. Dans un deuxième temps, nous avons compté dans chaque boîte en fin de simulation combien nous avons de sites de chaque famille ainsi que de Cu_{libre} . Dans un troisième temps, nous avons fait **l'hypothèse que la stabilisation due à une famille de sites devait être égale dans toutes les boîtes**. Par exemple s'il existe un site **P** dans les boîtes XCOILa et XPARAd, alors leur énergie d'adsorption doit être la même dans les deux boîtes. Ainsi, pour chaque simulation, l'énergie globale de complexation a été évaluée comme la somme des énergies d'adsorption de chaque type de site, pondérée par leur fréquence d'apparition dans la simulation (cf. Eq. 12.12) :

7. Nous verrons plus en détail au chapitre 13 Résultats le résultat préliminaire suivant : $0 > E_{\text{Cu-libre}j} > E_{\text{Cu-site}j}$, ce qui signifie que les cations Cu^{2+} sont mieux stabilisés par les sites complexant du xanthane que par une sphère d'hydratation.

8. Par contre en Mécanique Quantique, on peut directement comparer les énergies E1 et E2 de deux systèmes différents.

$$\begin{aligned}
 E_{\text{Cu-Xanthane}} &= \sum_{\text{Ligandj}} N_{\text{Ligandj}} * E_{\text{Cu-Ligandj}} \\
 &= \underbrace{N_{\text{Cu libre}} * E_{\text{Cu-6H}_2\text{O}}}_{\text{contribution due aux cuivres libres}} \\
 &\quad + \underbrace{N_{\text{P}} * E_{\text{Cu-P}} + N_{\text{G}} * E_{\text{Cu-G}}}_{\text{contribution énergétique due à l'adsorption sur les sites simples}} \\
 &\quad + \underbrace{N_{\text{PG}} * E_{\text{Cu-PG}} + N_{\text{PP}} * E_{\text{Cu-PP}} + N_{\text{GG}} * E_{\text{Cu-GG}} + N_{\text{PGintra}} * E_{\text{Cu-PGintra}}}_{\text{contribution énergétique due à l'adsorption par les sites chelatants}}
 \end{aligned} \tag{12.12}$$

Avec :

- $N_{\text{Cu libre}}$ et $E_{\text{Cu-6H}_2\text{O}}$ respectivement le nombre de cuivres n'ayant pas été complexés dans la simulation et l'énergie d'adsorption du cuivre par sa sphère d'hydratation.
- N_{X} et $E_{\text{Cu-X}}$ respectivement le nombre de sites de type X dans la simulation et l'énergie d'adsorption du cuivre par le site de type X. $X=\{\text{P,G,PG,PP,GG,PGintra}\}$.

Le problème est alors ramené à la détermination des énergie $E_{\text{Cu-Ligand}}$, c'est à dire à l'évaluation d'énergies d'adsorption du cuivre par des petites molécules. Pour déterminer les différentes énergies $E_{\text{Cu-Ligand}}$ pour $\text{Ligand}=\{6\text{H}_2\text{O,P,G,PP,PG,GG,PGintra}\}$ nous avons travaillé sur des molécules modèles. Nous avons reconstruit une boîte de simulation infiniment grande (décrivant tout l'espace) dans laquelle nous avons placé toutes les molécules nécessaires à la formation de ces différents sites. Nous avons donc mis dans l'espace de simulation 6 molécules d'eau⁹, un ion Cu^{2+} , deux acides pyruviques déprotonés, deux acides glucuroniques déprotonés et un fragment de chaîne latérale du xanthane ayant ses deux sites pyruviques et glucuroniques déprotonés. Chaque molécule a été construite au préalable avec soin en équilibrant les charges sur le fragment moléculaire sans carboxylate, en y ajoutant le fragment carboxylate préalablement équilibré à la charge -1 puis en appliquant une minimisation ME. Nous avons placé tous ces constituants à des distances infinies les uns des autres ($d > 20\text{Å}$) pour calculer l'énergie totale de référence du système notée E_{ref} (cf. figure 12.8).

9. La méthode ici présentée fait l'hypothèse que le cuivre est hexacoordonné dans l'eau et sur les sites d'adsorption du xanthane. Cette hypothèse sera validée lors de la section 13.1 "Résultats préliminaires en modélisation moléculaire".

Pour calculer l'énergie d'adsorption du cuivre par sa sphère d'hydratation de 6 molécules d'eau, nous avons placé le cuivre au centre d'un octaèdre formé des 6 molécules d'eau, et minimisé l'énergie (ME) alors que les autres molécules du système sont à des distances infinies (cf. figure 12.8). Cette opération nous donne l'énergie notée $E_{\text{tot site6H}_2\text{O}}$. Pour avoir l'énergie de stabilisation du cuivre par sa sphère d'hydratation il convient de faire la soustraction suivante :

$$E_{\text{Cu-6H}_2\text{O}} = E_{\text{tot site6H}_2\text{O}} - E_{\text{ref}}$$

Pour calculer l'énergie d'adsorption du cuivre par le site P, nous avons placé le cuivre à proximité d'un groupement pyruvate, au centre d'un octaèdre formé des 2 atomes d'oxygène du site carboxylate et de 4 molécules d'eau, et minimisé l'énergie (ME) alors que les autres molécules du système sont à des distances infinies (cf. figure 12.8). Cette opération nous donne l'énergie noté $E_{\text{tot siteP}}$. Pour avoir l'énergie de stabilisation du cuivre par le site simple P, il convient de faire la soustraction suivante :

$$E_{\text{Cu-P}} = E_{\text{tot siteP}} - E_{\text{ref}}$$

Nous avons procédé de la même manière pour évaluer l'énergie d'adsorption $E_{\text{Cu-G}}$ de l'autre site simple G (cf. figure 12.8).

Pour calculer l'énergie d'adsorption du cuivre par le site PG, nous avons placé le cuivre à proximité d'un groupement pyruvate, et d'un groupement glucuronate, au centre d'un octaèdre formé des 4 atomes d'oxygène des sites carboxylates, et de 2 molécules d'eau, et minimisé l'énergie (ME) alors que les autres molécules du système sont à des distances infinies (cf. figure 12.8). Cette opération nous donne l'énergie noté $E_{\text{tot sitePG}}$. Pour avoir l'énergie de stabilisation du cuivre par le site chelatan **PG** il convient de faire la soustraction suivante :

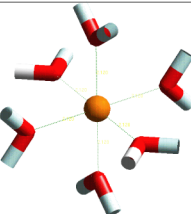
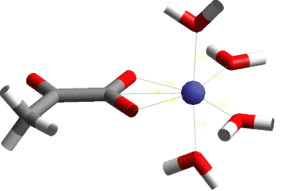
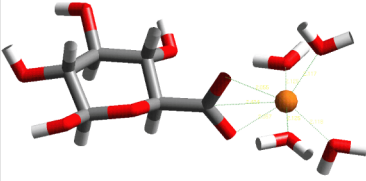
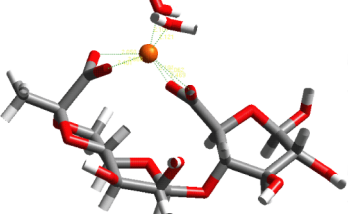
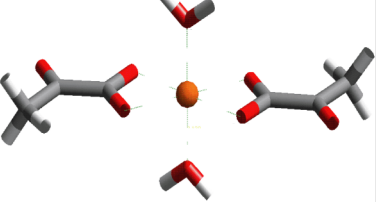
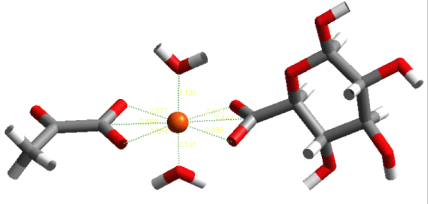
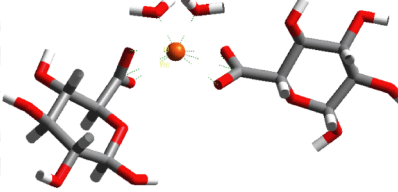
$$E_{\text{Cu-PG}} = E_{\text{tot sitePG}} - E_{\text{ref}}$$

Nous avons procédé de la même manière pour évaluer les énergies d'adsorption $E_{\text{Cu-PP}}$, $E_{\text{Cu-GG}}$ et $E_{\text{Cu-PGintra}}$ des sites chelatants PP, GG et PGintra (cf. figure 12.8).

Le tableau 12.8 présente une compilation des résultats des énergies d'adsorption $E_{\text{Cu-Ligand}}$ avec la représentation géométrique du type de complexe associé.

Finalement, en utilisant les résultats présentés à la colonne de droite du tableau 12.8, nous sommes en mesure de calculer l'énergie globale de complexation selon la formule proposée à l'équation 12.12.

TABLE 12.8 Evaluation des énergies de complexation du cuivre par des systèmes modèles.

Molécules contenues dans l'espace		Géométrie du complexe Cu-Ligand généré	$E_{\text{tot sitej}}$ [kJ.mol ⁻¹]	$E_{\text{Cu-Ligand}}$ = $E_{\text{tot sitej}} - E_{\text{ref}}$ [kJ.mol ⁻¹]
Molécules a des distances infinies	Molécules complexées			
Cu, Lateral _{minimisér} 6H ₂ O, P, P, G, G	Aucune		$E_{\text{ref}} = 674.61$	
Latéral _{minimisér} , P, P, G, G	Cu, 6H ₂ O		368.119	Libre -306.491
Lateral _{minimisér} , 2H ₂ O, P, P, G	P, Cu, 4H ₂ O		176.68	P -497.93
Lateral _{minimisér} , 2H ₂ O, P, G, G	G, Cu, 4H ₂ O		169.105	G -505.505
4H ₂ O, P, P, G, G	Lateral, Cu, 2H ₂ O		88.1986	PGintra -586.4114
Lateral _{minimisér} , 4H ₂ O, P, G	P, Cu, P, 2H ₂ O		63.643	PP -610.967
Lateral _{minimisér} , 4H ₂ O, P, P	P, Cu, G, 2H ₂ O		42.7092	PG -631.9008
Lateral _{minimisér} , 4H ₂ O, G, G	G, Cu, G, 2H ₂ O		37.0523	GG -637.5577

12.2 Ordre local du cuivre : expérience et modélisation

12.2.1 RDF-EXAFS ou fonction de distribution radiale expérimentale

12.2.1.1 Fondements de la spectroscopie EXAFS

La spectroscopie EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) est une technique de spectrométrie des rayons X qui sonde l'environnement structural local d'un atome cible, dans notre cas : le cuivre. Succinctement, cette technique permet d'accéder aux distances qui séparent le cuivre central de ses plus proches voisins (oxygène et carbone) jusqu'à une distance d'environ 4 à 6 Å. Typiquement, on peut évaluer les distances des 3 à 5 premières couches de coordination de l'atome central. Cependant, le signal faiblit très rapidement en s'éloignant de l'atome central et la rétro-diffusion des éléments légers tels le carbone et l'oxygène est faible. Il en résulte pour les substrats organiques (tels que le xanthane) que l'interprétation se limite à 1 ou 2 couches de coordinations (la première étant celle des oxygènes et la seconde celle des premiers voisins carbone éventuels). Outre l'évaluation des distances (avec la précision de ± 0.01 Å), la spectroscopie EXAFS donne une information sur le nombre de voisins par couche de coordination (précision ± 1 voisin) et également la nature des voisins (il reste difficile de discriminer O, N, et C -qui ont un poids moléculaire proche-, mais on pourra discriminer la présence d'un élément lourd ou léger à $z = \pm 10$). L'objet de la présente section est de donner au lecteur les clés nécessaires pour comprendre le principe physique de cette méthode. Pour de plus amples informations, le lecteur pourra se reporter aux nombreux ouvrages très complets sur le sujet (Koningsberger and Prins, 1988; Teo, 1986).

Le principe de la spectroscopie EXAFS repose sur l'interaction entre des rayons X et la matière. Lorsqu'un faisceau (ici de rayons X) traverse un échantillon, il est possible de définir l'intensité reçue en transmission selon la loi de Beer-Lambert, qui est :

$$I = I_0 e^{-\mu^* x} \quad (12.13)$$

Dans cette équation, I est l'intensité reçue en transmission, I_0 représente l'énergie incidente, μ le coefficient d'absorption linéaire et x l'épaisseur d'échantillon traversée par le faisceau.

La fonction représentant l'absorption totale $\mu^* x$ en fonction de l'énergie, devrait donc être monotone décroissante, mais présente des discontinuités liées à la composition chimique de l'échantillon. En effet, certaines valeurs d'énergie vont correspondre à des énergies de liaison d'électrons du cIJur d'atomes composant l'échantillon, notée E_0 . La fonction sera donc en réalité décroissante jusqu'à atteindre une énergie de liaison, moment auquel elle augmentera très rapidement. Si l'on est dans le cas d'un échantillon gazeux, la fonction recommencera ensuite à décroître de façon monotone, jusqu'à atteindre un nouveau seuil. En revanche, dans le cas d'un solide, la décroissance présentera des oscillations qui se propageront sur plusieurs centaines d'eV après le seuil d'absorption. Pour les liquides, les oscillations se propagent, mais moins que pour un solide ordonné. Ces oscillations sont dues à l'interaction entre une onde électromagnétique émise par l'atome absorbant et les ondes rétro-diffusées par les atomes voisins. Grâce à ces modulations, il est possible d'obtenir des informations sur la structure de l'échantillon.

On peut diviser le spectre obtenu en trois régions, qui se définissent par rapport à l'énergie E_0 de liaison des électrons de coeur de l'atome considéré.

1. **Région pré-seuil.** Dans cet intervalle d'énergie, E est inférieure à l'énergie de liaison des électrons de coeur de l'atome, qui n'absorbent donc pas l'énergie incidente. $\mu_0 = f(E)$, qui représente l'absorption par la matrice de l'échantillon, présente donc une décroissance monotone.
2. **XANES.** La région XANES est facilement identifiable : l'absorption augmente très rapidement, ce qui forme un saut dans la fonction. Tant que E est inférieure à E_0 , l'électron de coeur

est excité, mais n'est pas éjecté de l'atome. Cette région énergétique permet d'acquérir des informations sur la structure de l'atome, et notamment sa configuration électronique. Lorsque E dépasse la valeur de E_0 , et jusqu'à environ 50 eV après E_0 , alors l'électron de coeur est éjecté de l'atome, et il se retrouve dans le continuum. La théorie entourant la spectroscopie XANES est complexe, et l'analyse de données se fait le plus souvent par combinaison de spectres de référence. De plus, pour un élément chimique donné, la position du saut d'énergie sera dépendante du degré d'oxydation de cette espèce. Plus le degré d'oxydation sera élevé, plus l'énergie à fournir pour parvenir à éjecter un photoélectron sera élevée.

3. **EXAFS** La zone EXAFS s'étend de $\approx 50\text{eV}$ à $\approx 1000\text{eV}$ après E_0 . Dans cette zone, le photoélectron est éjecté dans le continuum avec une énergie cinétique suffisante pour interagir avec les atomes voisins de l'atome émetteur si ce dernier n'est pas isolé. C'est l'interférence entre photoélectrons incidents et rétrodiffusés qui est à l'origine des oscillations EXAFS qui modulent l'absorption μ_1 de l'atome absorbeur. La fonction d'interférence χ rendant compte des oscillations EXAFS est reliée au coefficient d'absorption μ_1 selon la relation :

$$\mu = \mu_1 * (1 + \chi) \quad (12.14)$$

La représentation de l'amplitude du spectre EXAFS se fait traditionnellement selon le vecteur d'onde k [\AA^{-1}] défini par :

$$k = \sqrt{\frac{2 * m_e}{\hbar^2} (E - E_0)} \quad (12.15)$$

Avec :

- m_e est la masse de l'électron ($9.109 * 10^{-31}$ kg).
- E l'énergie du photon incident.
- E_0 l'énergie de seuil K de l'atome absorbeur.
- \hbar la constante de Dirac ($1.054 * 10^{-34}$ J.s).

Le signal EXAFS, dans le formalisme d'onde sphérique et la diffusion simple, peut s'écrire :

$$\chi(k) = -S_0^2 * \sum_i \left(\frac{N_i}{kR_i} * |\Phi_i(\pi, k)| * e^{(-2\sigma_i^2 k^2)} * e^{\left(\frac{-2R_i}{\lambda(k)}\right)} * \sin[2kR_i + \varphi_i(k) + 2\delta_c(k)] \right) \quad (12.16)$$

Avec :

- S_0^2 : Facteur de réduction d'amplitude du aux effets multiélectroniques.
- N_i : Nombre d'atomes composant une couche atomique autour de l'atome émetteur.
- R_i : Distance effective entre l'atome émetteur et le rétrodiffuseur.
- $|\Phi_i(\pi, k)|$: Amplitude de rétrodiffusion des atomes de la couche i .
- σ_i : Facteur de Debye ou facteur de désordre. Ce terme rend compte du déplacement relatif entre les atomes de la couche i et l'atome émetteur. Il est donc conditionné par le désordre structural (répartition des positions autour d'une valeur moyenne) et le désordre dynamique (agitation thermique).
- λ : Libre parcours moyen du photoélectron.
- $\delta_c(k)$: Déphasage lié à la traversée du potentiel de l'atome émetteur.
- $\phi_i(k)$: Déphasage provoqué par l'atome rétrodiffuseur.

12.2.1.2 Préparation des échantillons

Nous avons acquis les spectres EXAFS (i) d'échantillons où le cuivre est complexé avec les ligands constitutifs du xanthane -acide pyruvique, acide glucuronique et mélange des deux- (notés Cu-Ligands) (ii) d'échantillons où le cuivre est complexé au xanthane (notés Cu-Xanthane). L'idée clé est de pouvoir ensuite comparer les spectres EXAFS Cu-Xanthane avec les spectres Cu-Ligands. Ces spectres ont été enregistrés aux deux pH d'intérêts : pH3.5 et pH5.5 (mis en évidence lors des titrage).

Les échantillons devront être préparés de sorte que (i) le signal EXAFS soit maximum (ii) la précipitation du cuivre soit évitée. Pour cela, les facteurs importants à considérer lors de la préparation des échantillons EXAFS sont les suivants :

1. Avoir une concentration totale en cuivre suffisamment importante pour obtenir un signal : en pratique on doit avoir $[\text{Cu}]_{\text{tot}}=100\text{ppm}$ au minimum, soit $[\text{Cu}]_{\text{tot}}=1.6\text{mM}$.
2. Pour observer le mieux possible le signal du cuivre complexé, et non celui du cuivre dans l'eau, il faut ajuster la concentration du ligand (ligand modèle ou xanthane) pour maximiser la complexation (cette étape peut se faire grâce à un calcul de spéciation) tout en restant sous la limite de précipitation de $\text{Cu}(\text{OH})_2$.

La figure 12.17 présente le résultat du calcul de spéciation de l'acide pyruvique en présence de cuivre à pH5.35. On y observe deux domaines : celui des expériences de titrages (où $[\text{Cu}]_{\text{tot}}\approx 10^{-4}\text{M}$, $[\text{PyrCOOH}]_{\text{tot}}\approx 10^{-3}\text{M}$, et $\frac{[\text{PyrCOOCu}]}{[\text{Cu}_{\text{tot}}]}\approx 15\text{-}20\%$) et celui des expériences EXAFS (où $[\text{Cu}]_{\text{tot}}\approx 10^{-1}\text{M}$, et $\frac{[\text{PyrCOOCu}]}{[\text{Cu}_{\text{tot}}]}$ voulu à plus de 80%, d'où $[\text{PyrCOOH}]_{\text{tot}}\approx 10^{-1}\text{M}$). Ainsi, il est clair que **pour avoir un signal EXAFS analysable**, nous ne pouvons pas prendre directement des échantillons aux mêmes concentrations que les titrages, mais que **les concentrations en cuivre et en ligand doivent être augmentées**. Les résultats EXAFS seront donc analysés dans l'hypothèse où les sites d'adsorption du xanthane sont de même nature à forte ou faible concentration en cuivre. Nous verrons que cette hypothèse se vérifie bien lors de l'analyse des résultats.

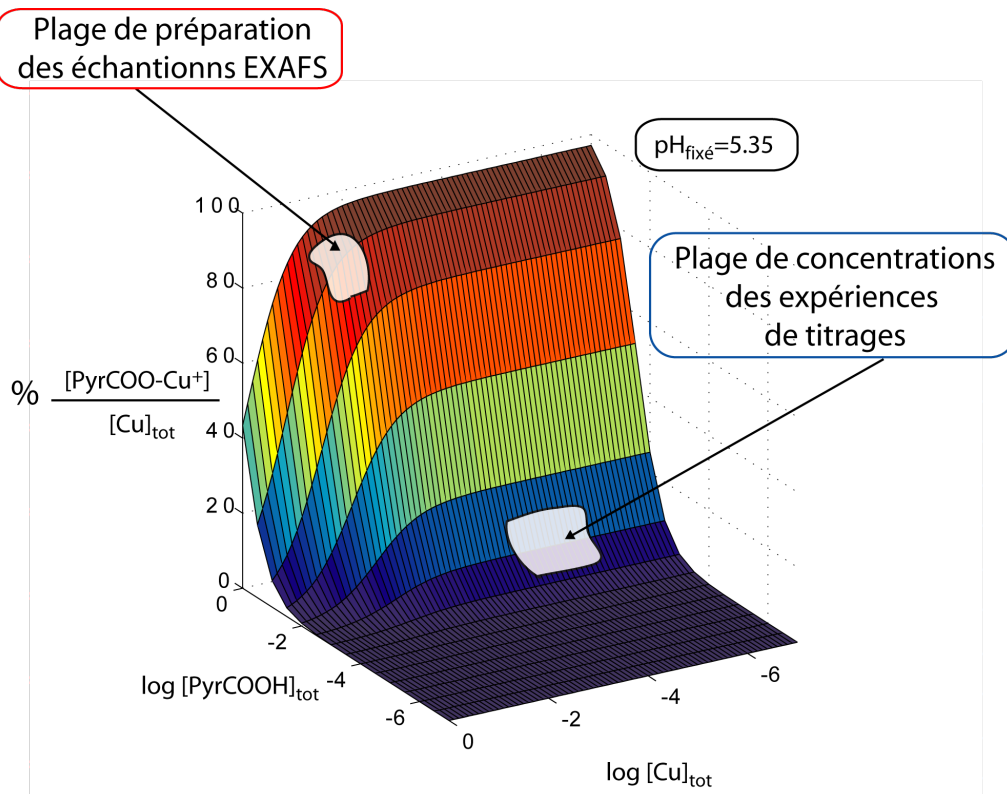


FIGURE 12.17 Diagramme de spéciation de l'acide pyruvique en présence de cuivre à pH fixé = 5.35. Les zones d'expériences de titrages et isothermes balayent des concentrations totales en cuivre variant entre 10^{-3} et 10^{-5} M, et la complexation du cuivre par l'acide pyruvique est alors de l'ordre de 15 à 20% à pH 5.5. Les zones d'expériences EXAFS doivent avoir une concentration totale en cuivre plus élevée de l'ordre de 10^{-1} M; il faut donc avoir des concentrations élevées en acide pyruvique (environ 10^{-1}) pour obtenir une complexation du cuivre supérieure à 80%.

Le tableau 12.9 précise les concentrations en cuivre, ligand ou xanthane et le pH des 9 échantillons Cu-Xanthane et des 10 échantillons Cu-Ligand préparés. Seuls les échantillons grisés ont pu être mesurés dans la limite du temps imparti pendant le run EXAFS. Ce seront les seuls discutés par la suite.

TABLE 12.9 Composition des échantillons préparés pour l'étude en spectroscopie EXAFS. Les échantillons ayant pu être passés sous faisceau synchrotron sont grisés.

Echantillons Cu-Xanthane	[Xan] (g/L)	[Cu ²⁺]		Fond Ionique [NaNO ₃] (M)	pH
		ppm	mM		
XA-3	10	140	2.20	0.1	3.55
XA-5	10	140	2.20	0.1	5.57
XB-3	10	1400	22.05	0.1	3.5
XB-5	10	1400	22.05	0.1	5.3
XC-3	10	1400	22.05	0.1	3.3
XC-4	10	1400	22.05	0.1	4.4
XC-5	10	1400	22.05	0.1	5
XC-5.1	10	1400	22.05	0.1	5.1
XC-5.3	10	1400	22.05	0.1	5.3

Echantillons Cu-Ligands	[Pyr] (mM)	[GlcA] (mM)	[Cu ²⁺]		pH
			ppm	mM	
Pyr 3	100	0	635	10	3.6
Pyr 5	100	0	635	10	5.35
GlcA 3	0	100	635	10	3.46
GlcA 5	0	100	635	10	5.3
Mix 3	50	50	635	10	3.46
Mix 5	50	50	635	10	5.32
Cu 3.6	0	0	635	10	3.6
Cu 4.7	0	0	635	10	4.7
Cu 5.3	0	0	635	10	5.3
Cu 7.4	0	0	635	10	7.4

Tous les spectres EXAFS ont été collectés à l'European Synchrotron Research Facilities (ESRF) durant un run en Juillet 2008 sur la ligne FAME. Les échantillons ont été congelés en plongeant le porte échantillon dans un bain d'azote, transférés dans un cryostat à hélium refroidi à 10 K pour l'enregistrement. La viscosité du xanthane a naturellement empêché l'eau de former de gros cristaux de glace lors de son changement d'état. Les échantillons Pyr, GlcA, Mix et Cu ont quand à eux été congelés en présence de 20% de glycérol pour éviter la formation de cristaux de glace parasitant le signal d'absorption X.

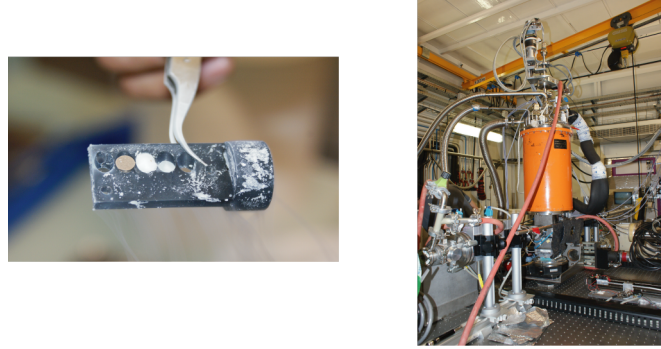


FIGURE 12.18 Photos du porte-échantillon après congélation (à gauche) et de la ligne expérimentale pénétrant dans le cryostat -cylindre orange- (à droite).

12.2.1.3 Traitement des spectres EXAFS expérimentaux : obtention des RDF-EXAFS

Extraction des spectres EXAFS

La première étape d'extraction a consisté à soustraire du signal l'absorption de la matrice (μ_0) la zone préseuil ($E < E_0$) en extrapolant, par une fonction que l'on a choisi linéaire. Dans un deuxième temps, nous avons normalisé le spectre par rapport à E_0 . E_0 a été choisi égal à la mi-hauteur du saut d'absorption. Ceci permet de représenter le spectre dans l'espace du vecteur d'onde et de soustraire la contribution de l'absorption par l'atome absorbeur dans la zone après seuil. Pour ce dernier point, la fonction μ_1 a été approchée par une fonction spline, qui est constituée de polynômes du troisième degré joints entre eux. Nous avons porté une grande attention à toujours déterminer et extraire de la même manière cette fonction, afin de pouvoir comparer les différents spectres entre eux. Ceci nous a permis d'obtenir les spectres $\chi = f(k)$, qui présenteront un amortissement croissant avec l'augmentation de k . Pour remédier à cet effet, nous avons multiplié la fonction $f(k)$ par k^3 . On obtient les spectres en fréquence $k^3\chi = \mathbf{g}(k)$ présentés à la sections résultats (figure 13.13).

Analyses des spectres EXAFS extraits

Les spectres $k^3\chi = \mathbf{g}(k)$ en fréquence représentent les distances interatomiques séparant le cuivre de ses voisins. Ces spectres résultent de la somme de sinusoïdes dont chaque fréquence est associée à une distance d'un voisin. Les faibles distances correspondent aux basses fréquences. Ainsi la fréquence dominante observée sur les spectres présentés en figure 13.13 représente la distance du cuivre aux premiers voisins oxygène. Les fonctions de distributions radiales (**RDF**) sont obtenues en appliquant une transformée de Fourier (**TF**) à ces spectres de fréquence. Les TF des spectres EXAFS représentent ainsi les distances des voisins à l'atome central de cuivre. L'amplitude de chaque pic étant reliée au nombre de voisins. Dans la suite du document, **chaque spectre EXAFS expérimental ayant subi une TF sera nommé RDF-EXAFS**. Il est important de noter qu' **une RDF-EXAFS est une représentation des distances Cu-voisins moyennée sur**

l'ensemble de l'échantillon. C'est à dire sur l'ensemble des configurations structurales de tous les atomes de cuivre présents (prises en compte des différents complexes et du cuivre libre dans l'échantillon). En première approche, le signal obtenu en EXAFS ne contient dans l'essentiel que les contributions entre le cuivre central et ces voisins (e.g. distances Cu-O et Cu-C et nombres de voisins O et C entourant le cuivre). Il n'y a pas de contribution importante sans cuivre (e.g. contributions O-O non prises en compte). Dans certaines cas particuliers les configurations structurales génèrent des signaux expérimentaux de diffusion multiple (e.g. Cu-O-O). Ces contributions, mineures dans nos systèmes, ne seront pas discutées par la suite.

Il faut noter que les distances à l'atome central données par les pics des RDF-EXFAS sont décalées par rapport aux distances réelles à cause des termes de déphasages $\phi_i(k)$ et $\delta_c(k)$ (cf. équation 12.16). Ce décalage est fonction de la distance, et surtout de la nature de chaque voisin. Dans le cas du cuivre ayant comme premier voisin l'oxygène, nous avons déduit de la comparaison des données expérimentales avec des données cristallographiques issues de la Cambridge Structural Database (CSD) la valeur du décalage : $\Delta\mathbf{R} = -0.40 \pm 0.03 \text{ \AA}$. Nous noterons donc les données des RDF-EXAFS non corrigées en distance en $\mathbf{R} + \Delta\mathbf{R}$ et les données corrigées en distance (i.e. en distance réelles) en \mathbf{R} .

Les effets de coupures des fenêtres de TF ont été atténués en appliquant la fenêtre d'apodisation de Kaiser-Bessel (paramètre de fenêtre $\tau=1$ ou 2), qui présente l'avantage de réduire significativement l'intensité des lobes secondaires (Manceau and Combes, 1988). Ces étapes de normalisation et de mise en forme des données ont été effectuées avec le logiciel ATHENA du package ifeffit (Ravel and Newville, 2005).

Enfin, nous avons modélisé les premières couches des TF des spectres EXAFS obtenus avec le logiciel ARTEMIS du package IFFEFIT (<http://cars9.uchicago.edu/~ravel/software/>). Chaque modélisation (ou "fit") a été réalisée couche par couche, à partir des chemins modèles calculés par FEFF6, extraits de structures de complexes Cu-acide organique de la base de données CSD (Cambridge Structural Database). Pour chaque couche, l'ajustement se fait sur l'amplitude \mathbf{N} du pic (ou nombre de voisins), la distance \mathbf{R} en \AA (du centre cuivre au voisin considéré), le facteur de Debye-Waller σ^2 (terme lié au désordre) et sur ΔE_0 (qui doit rester constant pour toutes les couches fitées). Pour que certains fit convergent, nous avons été contraints d'imposer un nombre de voisins à la première couche, où de fixer σ^2 sur les couches plus extérieures.

12.2.2 RDF-MD ou fonction de distribution radiale théorique

12.2.2.1 Principe de calcul des RDF-MD (théoriques) en vue d'une comparaison avec les RDF-EXAFS (expérimentales)

En modélisation moléculaire, la Fonction de Distribution Radiale (**RDF**, pour Radial Distribution Function) est un outil puissant d'analyse des trajectoires de dynamique permettant de calculer la probabilité de trouver un atome à une distance r d'un atome de référence. Puisque toutes les positions atomiques sont connues en modélisation, il est possible de définir n'importe quel élément comme atome de référence.

A contrario, rappelons qu'en EXAFS, la RDF est utilisée pour représenter la distribution des distances moyennes des atomes autour d'un élément cible métallique (e.g. le cuivre). Dans notre cas, rappelons qu'une RDF-EXAFS représente les distances entre les atomes de cuivre et leurs plus proches voisins, moyennées sur l'ensemble de l'échantillon (en négligeant les diffusions multiples).

Au vu de ces deux définitions différentes de la RDF en modélisation moléculaire et en EXAFS, il convient de proposer un protocole de reconstruction des RDF-EXAFS (expérimentales) à partir des données théoriques de la modélisation moléculaire. La méthode décrite au paragraphe suivant

propose un moyen de générer des RDF théoriques notées RDF-MD (pour Molecular Dynamic) comparables aux RDF-EXAFS expérimentales.

Il est important de noter que l'utilisation directe de la fonction de calcul de RDF dans le logiciel Cerius2 donne des résultats qui ne sont pas comparables aux RDF-EXAFS : cela génère les distances Cu-voisins (recherchées) mais également des distances "supplémentaires" voisin i -voisin j (cf. figure 12.19), les RDF ainsi simulées ne sont alors pas directement comparables avec les TF des données EXAFS. Les distances autres que Cu-voisins ne doivent pas être considérées à la source : cela engendre une méthode manuelle de traitement des données fastidieuse et chronophage. Pour simuler les premières couches des TF EXAFS autour de chaque atome de cuivre, la méthode employée a été la suivante :

Pour chaque Cu^{2+} , nous avons calculé indépendamment la RDF entre le cuivre et les 6 à 8 atomes les plus proches du centre métallique (distances Cu-voisin inférieures à une distance de cutoff fixée à $r = 2.6 \text{ \AA}^{10}$). Puis nous avons sommé ces 6 à 8 RDF pour générer une fonction appelée RDF-Cu-Ligand. La RDF-Cu-Ligand correspond à la simulation des premières couches de la TF EXAFS du complexe hypothétique Cu-Ligand à l'état pur.

Ce point méthodologique est illustré en figure 12.19. Dans le cas du Cu-Libre ($\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6$), la contribution autour de 2.1 \AA est dû aux contributions Cu-O : ce sont les seules contributions à prendre en compte en vue d'une comparaison avec les données EXAFS expérimentales.

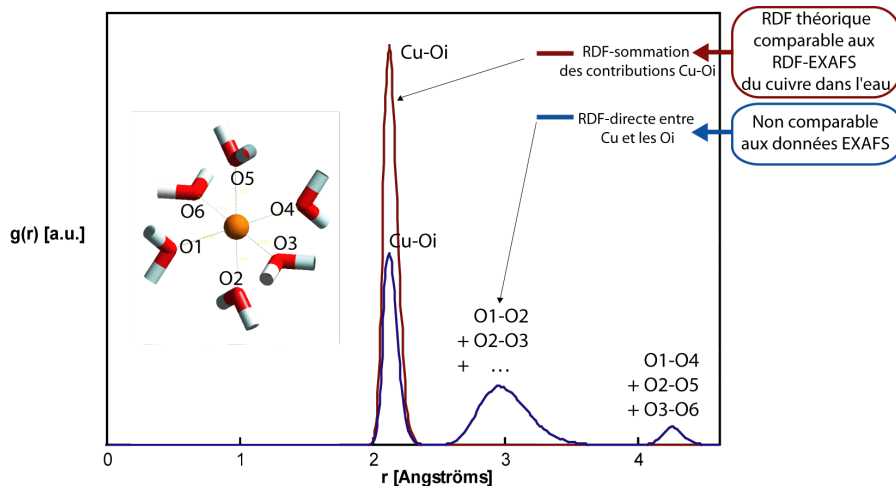


FIGURE 12.19 Comparaison des RDF-Cu-Libre théoriques ($\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6$) par la méthode (i) de sommation des plus proches voisins (un seul pic correspondant à la distance Cu-Oi) et par la méthode directe (ii) entre le cuivre central et les 6 molécules d'eau (ajout de deux distances supplémentaires, correspondant aux distances entre les oxygènes voisins ou situés à deux sommets opposés de l'octaèdre de coordination). La méthode (i) génère des résultats comparables aux données des RDF-EXAFS, alors que la méthode (ii) génère des résultats non comparables aux RDF-EXAFS.

Une fois les RDF-Cu-Ligand construites pour tous les différents type de complexes (Cu-Libre, P, G, PP, PG, GG, PGintra), la RDF-MD (théorique) est évaluée par la somme pondéré des RDF-Cu-Ligand, en fonction de l'occurrence de chaque type de ligand dans la simulation considérée. Ceci nous permet d'obtenir des RDF-MD théoriques comparables aux RDF-EXAFS (TF des données expérimentales EXAFS).

Notation : Dans tout le manuscrit, les distances déduites des calculs de modélisation moléculaires sont données en r (minuscule) et les données expérimentales sont données en \mathbf{R} (majuscule) ou $\mathbf{R} + \Delta\mathbf{R}$.

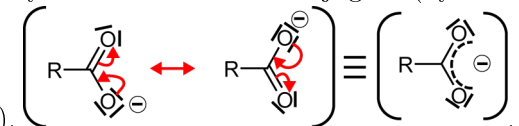
10. Distance donnée sur l'échelle des distances de modélisation moléculaire, valeur discutée à la section

12.2.2.2 Résultats préliminaires : calcul des RDF-Cu-Ligand_{solo}

Définition des RDF-Cu-Ligand_{solo} : Ce sont les RDF théoriques calculées pour les sites individuels du cuivre complexé par les ligands constitutifs du xanthane. Les sept RDF-Cu-Ligand_{solo} calculées (cf. figure 12.20) sont celles du cuivre dans l'eau hexacoordonné (**Cu libre**), et les RDF de tous les différents types de sites hexacoordonnés de fixation du cuivre rencontrés : site **P**, site **G**, site **PG**, site **PP**, site **GG**, et site **PGintra** (sites présentés à la section 12.1.5.1 "Analyses préliminaires"). Toutes les RDF théoriques ont été établies sur une MD à 300K en mode NVT constant ; chaque RDF étant constituée de l'intégration de toutes les positions atomiques (autour du site considéré) atteintes pendant la simulation de durée de 1ns avec le pas de 0.25 ps soit une sommation de 4000 états différents. On dispose donc après cette intégration de la position moyenne des voisins au cuivre central considéré. Les RDF-Cu-Ligand_{solo} sont donc calculées sur des petits systèmes contenant uniquement le cuivre et son ligand. Les RDF-Cu-Ligand_{solo} ne sont pas calculées à partir des MD réalisées sur les grandes boîtes de simulation (ce sont les RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} qui seront calculées à partir des MD réalisées sur les grandes boîtes de simulation, cf. paragraphe suivant).

Résultats préliminaires des RDF-Cu-Ligand_{solo} : La figure 12.20 présente les résultats des RDF-Cu-Ligand_{solo} obtenus par simulations de la première couche des TF EXAFS du Cuivre dans les petits systèmes contenant uniquement le cuivre et son ligand (Cu-Libre, P, G, PG, PP, GG, PGintra). La figure 12.20 permet de bien comprendre le principe de sommation des contributions individuelles de chaque premier voisin (O de H₂O, O ou C des carboxylates COO⁻) pour reconstruire les premières couches des TF EXAFS du cuivre dans les complexes modèles.

Remarque importante : Dans la banque de données CSD (Cambridge Structural Data base), il n'y a aucune structure où Cu est lié aux deux oxygènes d'un même carboxylate, car les carboxylates portent leur charge sur un seul atome d'oxygène (ce qui semble en accord avec une structure solide cristalline). Nous avons pris le parti de considérer tous les carboxylates comme étant conjugués (hy-



brides de résonance, cf. le fragment carboxylate de la figure 12.7).

La forme conjuguée est généralement considérée comme la plus probable en solution (il y a échange entre les deux formes mésomères à une fréquence très rapide), la mécanique quantique traduit d'ailleurs cela par des orbitales moléculaires (OM) des carboxylates présentant la même densité de probabilité de trouver l'électron sur les deux oxygènes de l'HOMO (plus haute OM occupée). Par conséquent, dans les modèles CSD, la couche de carbone est toujours vers 2.8-2.9 Å, alors que dans nos modèles moléculaires elle se situe vers 2.4-2.5 Å. Ce point sera à nouveau discuté à la section 14.2.3 "Comparaison des RDF-EXAFS et des RDF-MD".

Légende de la Figure 12.20 : La figure 12.20 présente les résultats des RDF-Cu-Ligand_{solo} pour les différents ligands : Cu-Libre, P, G, PG, PP, GG et PGintra. Les RDF-Cu-Ligand, notées ΣEXAFS, sont calculées par la somme des contributions individuelles des atomes d'oxygène des molécules d'eau (O de H₂O_i en bleu foncé pointillé), des contributions individuelles des atomes d'oxygène des carboxylates (O de COO_i en vert pointillé) et de la (des) contribution(s) du(des) premier(s) atome(s) de carbone (C_i en bleu clair). La somme des contributions des atomes d'oxygène des molécules d'eau est donnée en bleu (ΣO_i) et la somme des contributions des atomes d'oxygène des carboxylates est donnée en vert (ΣCOO_i).

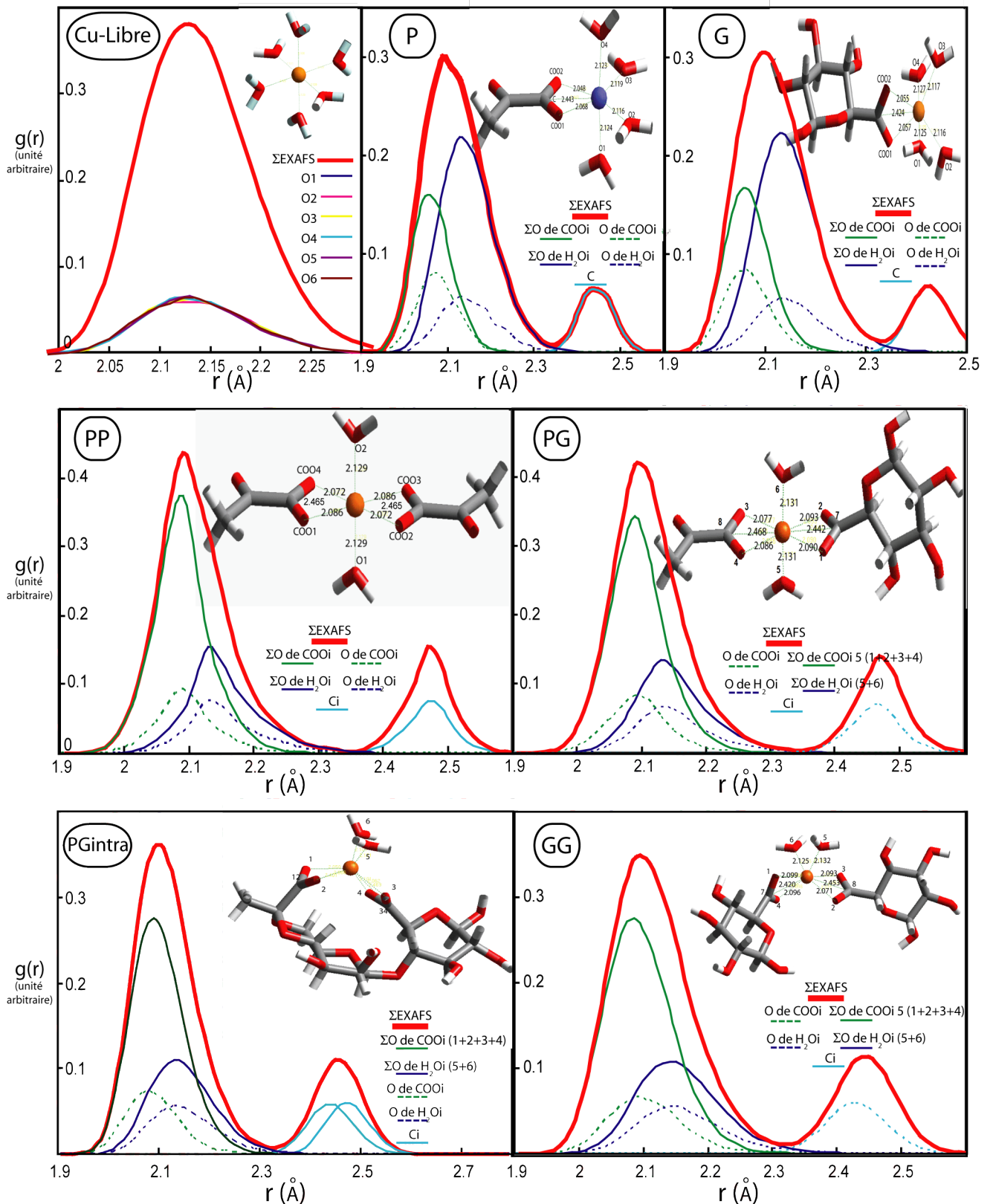


FIGURE 12.20 Résultats des $RDF-Cu-Ligand_{solo}$ pour les différents ligands : Cu-Libre, P, G, PG, PP, GG et PGintra. Les sommes ΣY sont les sommes des distances au cuivre central de plusieurs voisins Y , intégrées sur 1ns avec un pas de temps de 0.25ps. Voir légende page précédente. Les sommes totales sont les $RDF-Cu-Ligand_{solo}$ notées $\Sigma EXAFS$.

La figure 12.21 complétée du tableau 12.10 permet de comparer les RDF de chaque type de complexe modèle. On peut facilement distinguer quatre familles différant par leur RDF théoriques :

1. Le **Cuivre Libre**, qui n'a qu'un seul pic du aux atomes d'oxygène, centré à **2.13 Å** (caractéristique de la contribution en O des H₂O) d'**intensité moyenne**.
2. Les complexes simples, **P** et **G**, ayant un pic d'oxygène d'**intensité faible** décalé vers **2.10 Å** (du à la contribution en O des COO⁻) et un pic de carbone vers **2.43 Å** de **faible intensité**.
3. Les complexes chelatants PP et PG, ayant un pic d'oxygène de **forte intensité** décalé vers **2.09 Å** (du à la contribution en O des COO⁻ plus importante) et un pic de carbone décalé vers **2.47 Å** d'**intensité forte** (du à la contribution plus importante en carbone dans les complexes chelatants par rapport aux complexes simples).
4. Les complexes **PGintra** et **GG**, intermédiaires entre la famille 2 (P,G) et la famille 3 (PP,PG), présentant un pic d'oxygène d'**intensité moyenne** décalé vers **2.10 Å** et un pic de carbone d'**intensité moyenne** vers **2.45 Å** .

Finalement, il apparaît que : plus le site a une contribution riche en H₂O, plus son premier pic d'Oxygène va être décalé à vers les plus grandes distances (à droite vers 2.13 Å -sens des r croissants-), et plus l'intensité du pic du carbone sera faible. A contrario, si le site est un bon chelatant, son pic d'Oxygène va être décalé vers les courtes distances (à gauche vers 2.09 Å -sens des r décroissants-), et son pic de carbone sera plus intense.

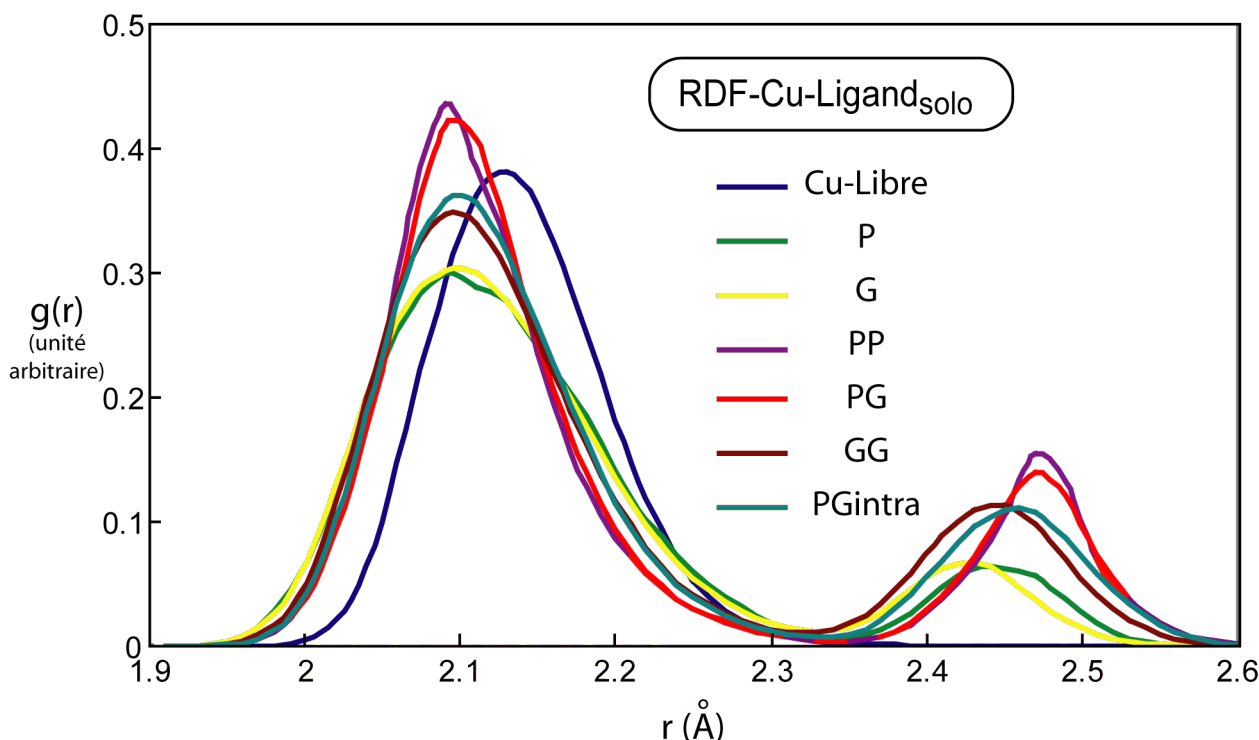


FIGURE 12.21 Comparaison des $RDF-Cu-Ligand_{solo}$ calculées pour les différents types de site complexant *Cu-Libre*, *P*, *G*, *PP*, *PG*, *GG* et *PGintra*.

12.2.2.3 Résultats préliminaires : calcul de quelques RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} pour validation des RDF-Cu-Ligand_{solo}

Définition des RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} :

Dans un deuxième temps, après avoir calculé les RDF-Cu-Ligand_{solo}, nous avons calculé les RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane}, qui sont les RDF non plus calculées sur un petit système contenant uniquement le cuivre et son ligand, mais calculées sur les mêmes types de sites extraits des grandes boîtes de simulation Cu-Xanthane. Le calcul de chaque RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} se fait alors sur un site du type "Ligand"¹¹ à partir de la MD finale (300K, NVT constant, 1ns, $\Delta t=0.25$ ps) réalisée sur les boîtes de simulation (contenant xanthane, Cu²⁺, Na⁺ et H₂O). Chaque RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} est donc constituée de l'intégration de 4000 positions atomiques (autour du site considéré) atteintes pendant la simulation.

Les RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane}, calculées dans les grandes boîtes de simulation, sont réalisées dans l'objectif d'être comparées aux RDF-Cu-Ligand_{solo}, calculées sur des systèmes simples. Nous avons donc calculé deux RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} pour chaque famille de site (Cu-Libre, P, G, PP, GG, PG, PGintra)¹², afin de comparer les RDF-Cu-Ligand_{solo} et les RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} des sites correspondants. Nous verrons que cette étape permet la validation des RDF-Cu-Ligand_{solo} comme bien représentatives des RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane}.

Résultats préliminaires : comparaison des RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} avec les RDF-Cu-Ligand_{solo}.

Le tableau 12.10 et la figure 12.22 présentent les résultats des simulations des TF EXAFS calculées pour les petits systèmes (RDF-Cu-Ligand_{solo}) et dans les boîtes de simulations contenant le xanthane (RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane}). Ces TF EXAFS théoriques ont été calculées pour les sites les plus fréquemment comptabilisés lors de nos simulations : Cu-Libre, P, G, et PG¹³.

TABLE 12.10 Distances moyennes au cuivre central des atomes d'oxygène et de carbone dans les RDF-Cu-Ligand_{solo} et les RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane}.

RDF-Cu-Ligand _{solo}			RDF-Cu-Ligand _{dans Xanthane}		
Type de site	Distances en Angströms		Type de site	Distances en Angströms	
	d _{Cu-O}	d _{Cu-C}		d _{Cu-O}	d _{Cu-C}
Cu-Libre	2.13	sans objet	Cu-Libre	2.25	sans objet
P	2.10	2.43	P	2.19	2.51 à 2.55
G	2.10	2.43	G	2.21	2.41 à 2.59
PP	2.09	2.47	PP	2.17	2.57
PG	2.09	2.45	PG	2.15	2.53
GG	2.09	2.45	GG	non calculé	non calculé
PGintra	2.09	2.45	PGintra	2.17	2.47 et 2.63

11. Ligand \in {Cu-Libre, P, G, PP, PG, GG, PGintra}

12. Le calcul pour les 18 simulations impliquerait la réalisation de RDF autour de 140 atomes de cuivres différents, chacun ayant en moyenne 7 premiers voisins, soit 980 calculs de RDF à la main (!), ce qui justifie que la vérification soit faite sur seulement deux RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} par type de site.

13. Nous verrons effectivement à la section 13.1 "Résultats préliminaires en modélisation moléculaire" que les sites les plus fréquemment rencontrés lors des simulations sur les grande boîtes sont les complexes : Cu-Libre, P, G et PG.

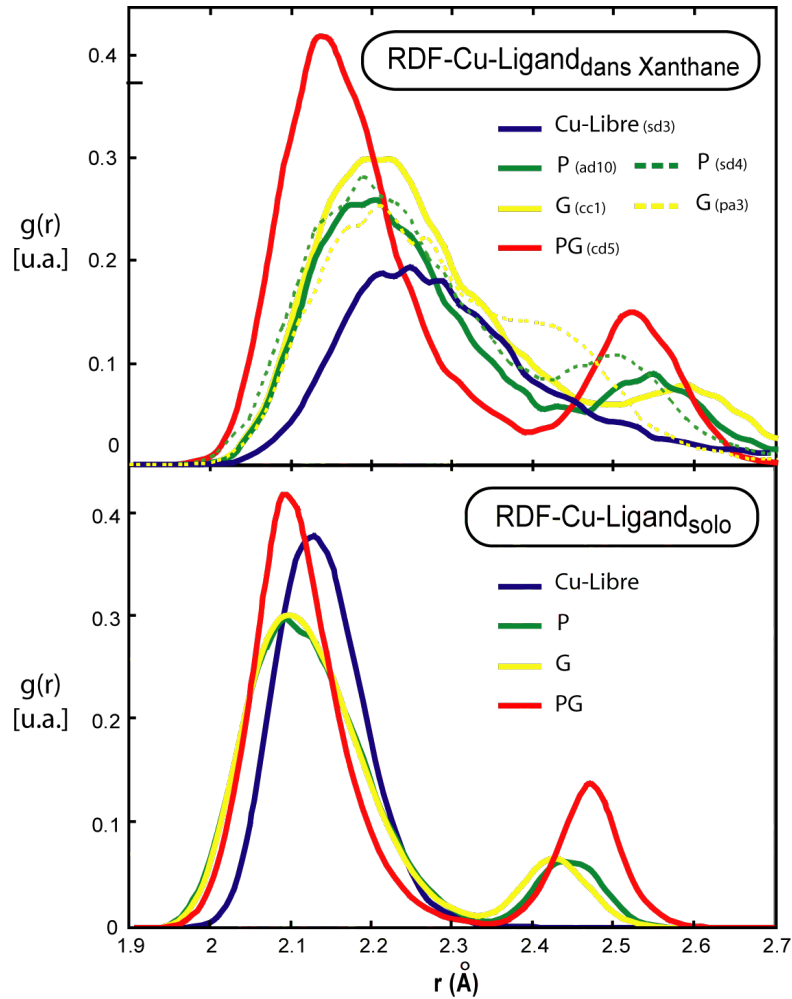


FIGURE 12.22 Comparaison des RDF-Cu-Ligand _{dans Xanthane} avec les RDF-Cu-Ligand _{solo} .

Pour les quatre types de sites suivants : Cu-Libre, P, G, et PG, les grandes tendances observées dans les RDF-Cu-Ligand _{solo} sont respectées dans les RDF-Cu-Ligand _{dans Xanthane} (cf. figure 12.22). Les trois principales similitudes sont :

1. Le pic d'Oxygène est décalé vers la gauche (courtes distances) plus le site est un bon complexant. En notant $r_{\max\text{O}}$ la distance r en Å du maxima du pic d'Oxygène dans la RDF, nous vérifions pour les RDF-Cu-Ligand _{solo} et les RDF-Cu-Ligand _{dans Xanthane} l'inégalité suivante :

$$r_{\max\text{O}}(\text{PG}) < r_{\max\text{O}}(\text{P}) \approx r_{\max\text{O}}(\text{G}) < r_{\max\text{O}}(\text{Cu-Libre}).$$

2. Le pic de Carbone est nul pour le Cuivre-Libre, puis il apparaît pour les sites simples (P et G) et devient plus intense pour les sites chélatants (PG). En notant $A_{\max\text{C}}$ l'amplitude du pic de Carbone, nous vérifions pour les RDF-Cu-Ligand _{solo} et les RDF-Cu-Ligand _{dans Xanthane} l'inégalité suivante :

$$A_{\max\text{C}}(\text{Cu-Libre}) = 0 < A_{\max\text{C}}(\text{P}) \approx A_{\max\text{C}}(\text{G}) < A_{\max\text{C}}(\text{PG}).$$

3. Les pics d'un site chélatant sont plus intenses que les pics d'un site simple. En notant $A_{\max\text{O}}$ l'amplitude du pic d'Oxygène, nous vérifions pour les RDF-Cu-Ligand _{solo} et les RDF-Cu-Ligand _{dans Xanthane} l'inégalité suivante :

$$A_{\max\text{O}}(\text{P}) \approx A_{\max\text{C}}(\text{G}) < A_{\max\text{C}}(\text{PG}).$$

Les deux principales différences observées entre les RDF-Cu-Ligand_{solo} et les RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} sont les suivantes :

1. Tous les pics ont leur maximum légèrement décalé vers la droite (r croissant) de 0.05 à 0.1 Å, mais cela ne change pas l'ordre des pics (PG, P et G, puis Cu-Libre).
2. L'intensité du pic d'oxygène du Cuivre-Libre est plus faible qu'attendue dans les RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} par rapport aux RDF-Cu-Ligand_{solo}.

La première différence s'explique par l'effet des contraintes stériques imposées par la macromolécule de xanthane. Ces contraintes stériques rendent l'approche des cuivres plus difficile que sur un système simple, ce qui se traduit par des distances (Cu-site d'adsorption) légèrement augmentées.

La deuxième différence s'explique par le fait que la RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} est calculée sur 6 molécules d'eau, et qu'au cours de la nanoseconde de MD à 300K, certaines partent à l'infini (par échange d'autre molécule d'eau), enlevant une partie de l'intensité du pic à 2.13 Å¹⁴. Graphiquement, la RDF-Cu-Libre_{dans Xanthane} est "ondulée" alors que la RDF-Cu-Ligand_{solo} est bien "lisse", car la RDF-Cu-Libre_{dans Xanthane} dans xanthane est intégrée sur moins d'état que la -Cu-Libre_{solo}. Ce phénomène d'échange faussant le calcul des RDF_{dans Xanthane} ne peut pas se produire sur les RDF-Cu-Ligand_{solo}, car il n'y a pas d'échange possible avec une molécule, le système n'ayant initialement que 6 molécules d'eau. Au passage, ce phénomène montre que la liaison Cu-O est moins forte pour le cuivre hexacoordonnés dans l'eau (Cu-Libre), que pour les autres complexes du cuivre (Cu-Ligand).

Nous avons donc validé les RDF-Cu-Ligand_{solo} en les considérant comme similaires aux RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} pour les sites Cu-Libre, P, G, et PG. Pour les sites PP et GG, la comparaison des RDF-Cu-Ligand_{solo} et RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} est moins satisfaisante en terme d'intensité. Cependant, nous verrons à la section 13.1 "Résultats préliminaires en modélisation moléculaire" que ces deux de types sites n'apparaissent qu'une seule fois chacun c'est à dire 10 fois moins souvent que pour les sites PG. Cette différence a des conséquences minimales sur le résultat final.

D'autre part, nous avons calculé les RDF des sites "nouveaux"¹⁵. Les RDF des sites "nouveaux" sont considérées équivalentes à une RDF-Cu-Ligand_{solo} précédemment calculée si leur pics atteignent leur maximum pour les mêmes valeurs de r (i.e. même abscisse des maxima, notées r_{\max}), et que l'intensité maximum des pics est la même à 15% près. Si ces deux conditions ne sont pas vérifiées, alors la RDF du site "nouveau" n'est pas considérée équivalente à une RDF-Cu-Ligand_{solo}.

14. Ce phénomène d'échange sera étudié plus en détail dans la section 13.2.2 "Sphères de coordination du cuivre".

15. Nous verrons à la section 13.1 "Résultats préliminaires en modélisation moléculaire" qu'en plus des sites attendus (Cu-Libre, P, G, PP, GG, PG, PGintra) quatre nouveaux sites sont observés lors des simulations numériques : PC=O, GC=O, PAc et PPG.

Nous montrons ainsi que :

- Les RDF des sites simple PC=O sont équivalentes aux RDF des sites P (cf. figure 12.22 : les traces des RDF des sites P (ad10) -vert- et PC=O (sd4) -vert pointillé- sont très proches -mêmes r_{\max} et mêmes intensités-).
- De même nous montrons que les RDF des sites simples GC=O sont équivalentes aux RDF des sites G.
- La RDF du site trichelatant PPG est équivalente à la RDF des sites chelatants PG, comme le montre la figure 12.23(a) (mêmes r_{\max} , et intensité similaire à 15% près).
- De même nous montrons que la RDF du site chelatant PAc est équivalente à la RDF du site chelatant PG.

Contrairement aux sites Cu-Libre, P, G et PG, la RDF du site PG_{intra} est vraiment différente dans le xanthane par rapport à la RDF dans le système simple (noté solo), i.e. RDF-Cu-PG_{intra}_{dans Xanthane} \neq RDF-Cu-PG_{intra}_{solo}, comme le montre la figure 12.23(b). En particulier, les deux atomes de carbone ont des distances distinctes dans la RDF-Cu-PG_{intra}_{dans Xanthane} et donnent donc lieu à deux pics moins intenses de C vers $r_{\max C1}=2.41$ et $r_{\max C2}=2.53$ Å au lieu d'un seul pic de C pour la RDF-Cu-Ligand_{solo} vers $r_{\max C}=2.48$ (cf. figure 12.23(b)).

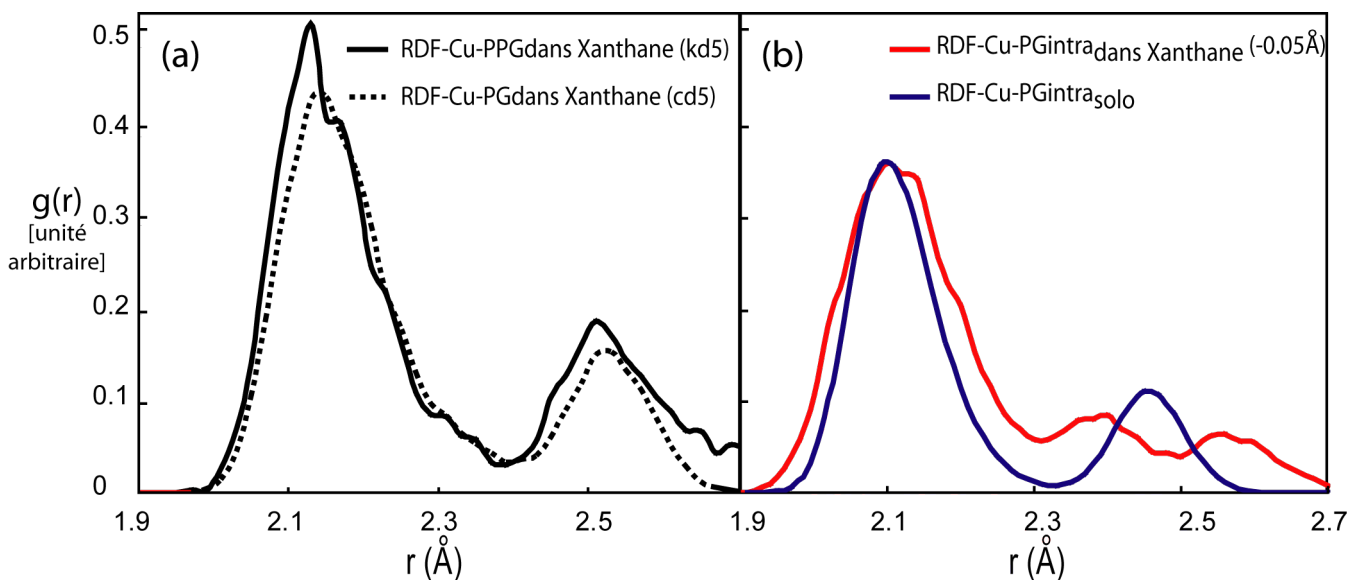


FIGURE 12.23 (a) A gauche, comparaison des RDF des sites PPG et PG, considérées par la suite comme similaires. (b) A droite, comparaison des RDF-Cu-PG_{intra}_{dans Xanthane} et RDF-Cu-PG_{intra}_{solo}, considérées par la suite comme différentes.

Finalement, nous avons conclu que les RDF-Cu-Ligand_{solo} des complexes Cu-Libre, P, G, PG, reproduisent bien les RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} des complexes Cu-Libre, P, G, PG, PP et GG. Les RDF-Cu-Ligand_{solo} de Cu-Libre, P, G et PG seront donc prises en compte dans la construction de la RDF-MD (RDF théorique globale). Par contre, nous avons mis en évidence que la RDF-Cu-Ligand_{solo} du site PG_{intra} ne retranscrit pas bien les RDF-Cu-Ligand_{solo} des sites PG_{intra}. Nous utiliserons donc les contributions de la RDF-Cu-PG_{intra}_{dans Xanthane} pour construire la RDF-MD.

12.2.2.4 Calcul des RDF-MD par combinaisons linéaires des RDF-Cu-Ligand_{solo}

Nous avons procédé au calcul des RDF-MD dans l'objectif de reconstruire les RDF-EXAFS. Puisque les RDF-EXAFS moyennent le signal du cuivre en fonction de ces différents types de complexation dans l'échantillon, nous avons appliqué le même principe pour construire les RDF-MD théoriques. Pour une grande boîte de simulation donnée (qui contient le xanthane dans une configuration donnée complexant plus ou moins les ions Cu²⁺), nous avons considéré que la RDF-MD théorique était donnée par la somme de chaque RDF-Cu-Ligand_{solo}¹⁶ pondérée par l'occurrence de chaque type de site dans la conformation considérée. Pour toutes les boîtes de simulation, la sommation des contributions de chaque type de site est calculée selon l'équation 12.17 :

$$\begin{aligned}
 \text{RDF-MD}_{\text{Cu-Xanthane}} &= \sum_{\text{Ligand}j} N_{\text{Ligand}j} * \text{RDF}_{\text{Cu-Ligand}j} \\
 &= \underbrace{N_{\text{Cu}_{\text{libre}}} * \text{RDF}_{\text{Cu-6H}_2\text{O}}}_{\text{contribution due aux cuivres libres}} \\
 &\quad + \underbrace{N_{\text{P}} * \text{RDF}_{\text{Cu-P}} + N_{\text{G}} * \text{RDF}_{\text{Cu-G}}}_{\text{contribution RDF due à l'adsorption sur les sites simples}} \\
 &\quad + \underbrace{N_{\text{PG}} * \text{RDF}_{\text{Cu-PG}} + N_{\text{PP}} * \text{RDF}_{\text{Cu-PP}} + N_{\text{GG}} * \text{RDF}_{\text{Cu-GG}} + N_{\text{PGintra}} * \text{RDF}_{\text{Cu-PGintra}}}_{\text{contribution RDF due à l'adsorption par les sites chélatants}}
 \end{aligned}
 \tag{12.17}$$

Avec :

- N_{Ligand} , le nombre de cuivre complexés par le site de type Ligand dans la boîte de simulation considérée.
- $\text{RDF}_{\text{Cu-Ligand}} = \text{RDF-Cu-Ligand}_{\text{solo}}$ précédemment calculées.

La figure 12.24 illustre le principe de calcul des RDF-MD, par combinaison linéaires des RDF-Cu-Ligand_{solo}. Les RDF-MD théoriques ainsi construites seront ensuite comparées aux RDF-EXAFS expérimentales.

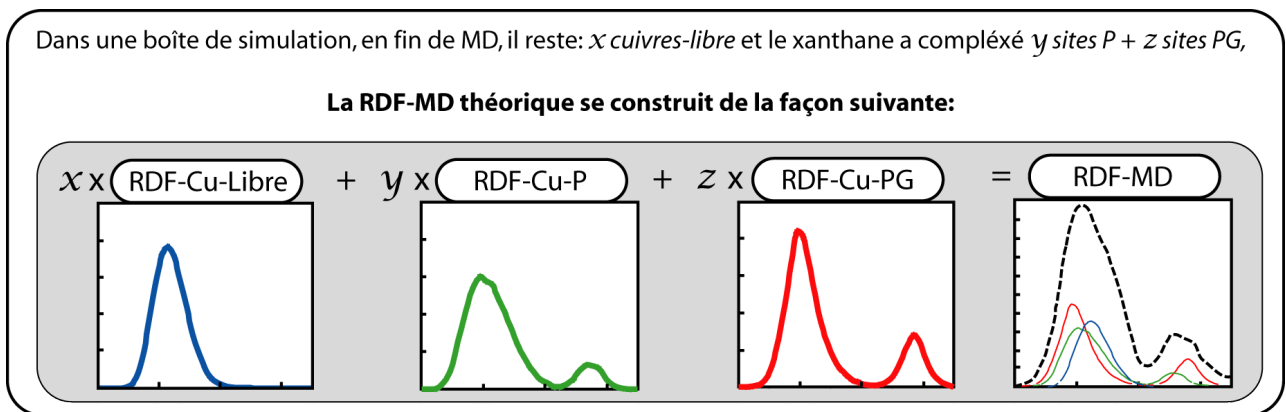


FIGURE 12.24 Exemple de calcul d'une RDF-MD théorique.

16. Excepté pour les sites PGintra où pour les raisons précédemment évoquées, la contribution prise en compte est donnée par la RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane}

12.2.3 Comparaison des distances en Modélisation Moléculaire et spectroscopie EXAFS

Un des objectif de l'étude de modélisation moléculaire étant de reconstruire les TF des spectres EXAFS réels obtenus sur le xanthane, nous avons effectué des calculs préliminaires afin de caler notre champ de force sur des distances réelles. Pour cela, nous avons étudié un complexe du cuivre modèle : le malate de cuivre. La base de données CSD nous donne pour ce complexe, présenté en figure 12.25, les distances entre les atomes du malate et le cuivre central (cf. tableau 12.11). Nous avons comparé ces distances expérimentales réelles avec les distances modélisées d'équilibre de ce complexe après une minimisation d'énergie sous UFF en modélisation moléculaire, avec un facteur de charge normal de 1 (cf. tableau 12.11). Les distances modélisées par UFF s'avèrent légèrement supérieures (de 0.2 Å) aux distances réelles, mais respectent bien l'ordre hiérarchique des distances. Afin de retrouver les distances expérimentales par modélisation moléculaire, le facteur de charge à appliquer est de 1.6 (cf. tableau 12.11).

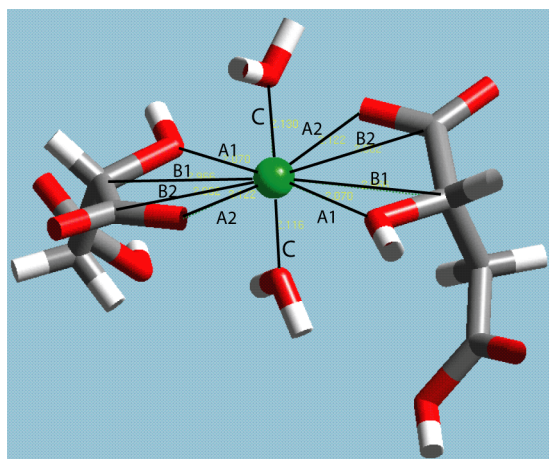


FIGURE 12.25 Structure du complexe bi-Malate+Cu.

TABLE 12.11 Distances Cu-Malate réelles et modélisées pour différents facteurs de charge.

Nom de la distance	Distance [Å]		
	Expérimentale (réf. CSD)	Modélisée avec Facteur de charge = 1	Modélisée avec Facteur de charge = 1.6
A1	1.95	2.13	1.97
A2	1.91	2.11	1.91
B1	2.86	3.00	2.8
B2	2.72	2.93	2.72
C	2.52	2.12	1.95*

*Seule la distance C n'est pas bien reproduite entre la référence CSD et le calcul en modélisation moléculaire. Cela s'explique car la référence CSD donne des distances extraites d'une structure cristalline, générant des distances axiales C plus longues du fait des effets de packing et effet Jahn-Teller non pris en compte dans les calculs de modélisation moléculaire réalisés. L'effet Jahn-Teller sera discuté en fin d'ouvrage (section 14.2.1).

Lors de nos expériences de modélisation, le facteur de charge a été gardé à la valeur de 1, et donc, les distances obtenues lors de notre étude de RDF modélisées ne sont pas directement comparables avec les distances obtenues en EXAFS. Le tableau 12.11 nous a permis de calculer une corrélation linéaire permettant de ramener les distances calculées par UFF avec un facteur de charge de 1 en

distances calculées avec UFF ayant un facteur de charge de 1.6 (c'est à dire des distances modèles aux distances réelles). En notant R_{EXAFS} la valeur des distances réelles (en Å) et r_{MM} la valeur des distances modélisées sous UFF avec un facteur de charge de 1, la régression linéaire déduite du tableau 12.11 vaut :

$$\boxed{R_{\text{EXAFS}} = 0.9731 * r_{\text{MM}} - 0.0916 \quad \text{coefficient de corrélation linéaire} = 0.9989} \quad (12.18)$$

Dans toute la suite du document, les distances données dans les résultats de Modélisation Moléculaire seront donnés sur l'échelle r_{MM} notée simplement \mathbf{r} et les résultats d'EXAFS seront donnés sur l'échelle R_{EXAFS} notée simplement \mathbf{R} . Dans la partie discussion, les résultats de modélisation seront traduits en distances réelles, afin de comparer les deux résultats (modélisés et expérimentaux) sur la même échelle (\mathbf{R}).

Remarque : On rappelle que les distances que l'on obtient lors des TF EXAFS (en $R + \Delta R$) sont décalées par rapport aux distances réelles (en R) à cause des termes de déphasages $\delta_c(k)$ et $\phi_i(k)$ (cf. équation 12.16). Ce décalage ΔR est fonction de la distance, et surtout de la nature de chaque voisin, puisqu'il dépend de la nature de la couche atomique. Dans le cas du cuivre ayant comme premier voisin l'oxygène, nous avons déduit des données expérimentales $\Delta R = - 0.4 \text{ \AA}$. Les distances discutées à la section 14.3.2 "Comparaison des RDF-EXAFS et des RDF-MD" intégreront le terme de déphasage, i.e. nous discuterons des distances réelles.

Chapitre 13

Résultats

13.1 Résultats préliminaires en modélisation moléculaire.

Allures générales des résultats des simulations

Les figures 13.1 et 13.2 présentent le catalogue de tous les résultats obtenus en modélisation moléculaire sur les systèmes de conditions initiales (CI) **a**, **b**, **c** et **d** (cf. figure 12.13). Pour chaque boîte-résultat d'une simulation nous avons adopté une **numérotation des cations Cu²⁺** (cf. figures 13.1 et 13.2). Qualitativement, les scénarios des MD permettent la conservation des conformations souhaitées, i.e. génération de beaux coils à pH3, et maintien des hélices à pH5.5 -également du aux conditions de périodicité - (cf. figures 13.1 et 13.2). D'autre part il est notable que sur les 130 atomes de Cu²⁺ mis dans les boîtes, aucun ne s'est lié de manière stable avec des hydroxydes d'hexoses, ni lié avec un groupement carboxylique encore protoné, mais tous les cuivres sont soit adsorbés à proximité d'un carboxylate, soit restent libres en solution (coordonnés par une sphère d'hydratation). Cette première analyse tend à conforter la robustesse de notre champ de force UFF et du scénario employé pour générer les résultats.

Nombre de coordinance totale

Pour chaque cation Cu²⁺ répertorié, nous avons compté les plus proches voisins avec une distance limite de $d_{\text{lim}} = 2.6 \text{ \AA}$ sur les structures issues de la dernière MD à 300K au temps $t_{\text{MD300Kfinal}}=300\text{ps}$, afin de déterminer la **coordinance totale** de chaque atome. Les tableaux 13.1, 13.2 et 13.3 présentent le comptage de la coordinance de chaque atome. Les valeurs limites sont comprises entre 4 (i) et 7 (ii), puisqu'il peut arriver (i) que le cuivre ne soit pas hexacoordonné car un (ou plusieurs) atome(s) d'oxygène participant en moyenne à la coordination du cuivre peut(peuvent) être situé(s) à une distance supérieure à d_{lim} à l'instant $t_{\text{MD300Kfinal}}=300\text{ps}$; (ii) que l'échange entre deux molécules d'eau participant à la coordinance du cuivre se fasse exactement à l'instant $t_{\text{MD300Kfinal}}=300\text{ps}$. La moyenne globale de la coordinance totale du cuivre est comprise entre 5.75 ± 0.44 et 5.90 ± 0.50 (cf. tableau 13.4). Puisqu'à l'échelle discrète la coordinance doit être un nombre fini (comment définir une fraction d'atome d'oxygène lié au cuivre ?), nous avons arrondi la valeur de la coordinance à l'entier le plus proche : **N=6. La coordinance totale des cations Cu²⁺ est de 6 voisins oxygène**; ceci est un résultat préliminaire fondamental¹.

1. Ce résultat (cuivre hexacoordonné par des atomes d'oxygène) a d'ailleurs déjà été évoqué et utilisé à la section 12.1.5.3 "Calcul des énergies de stabilisation des complexes Xanthane-Cu" car il était nécessaire de connaître la coordinance totale de Cu²⁺ lors de l'évaluation des énergies d'adsorption de Cu²⁺ sur les sites modèles.

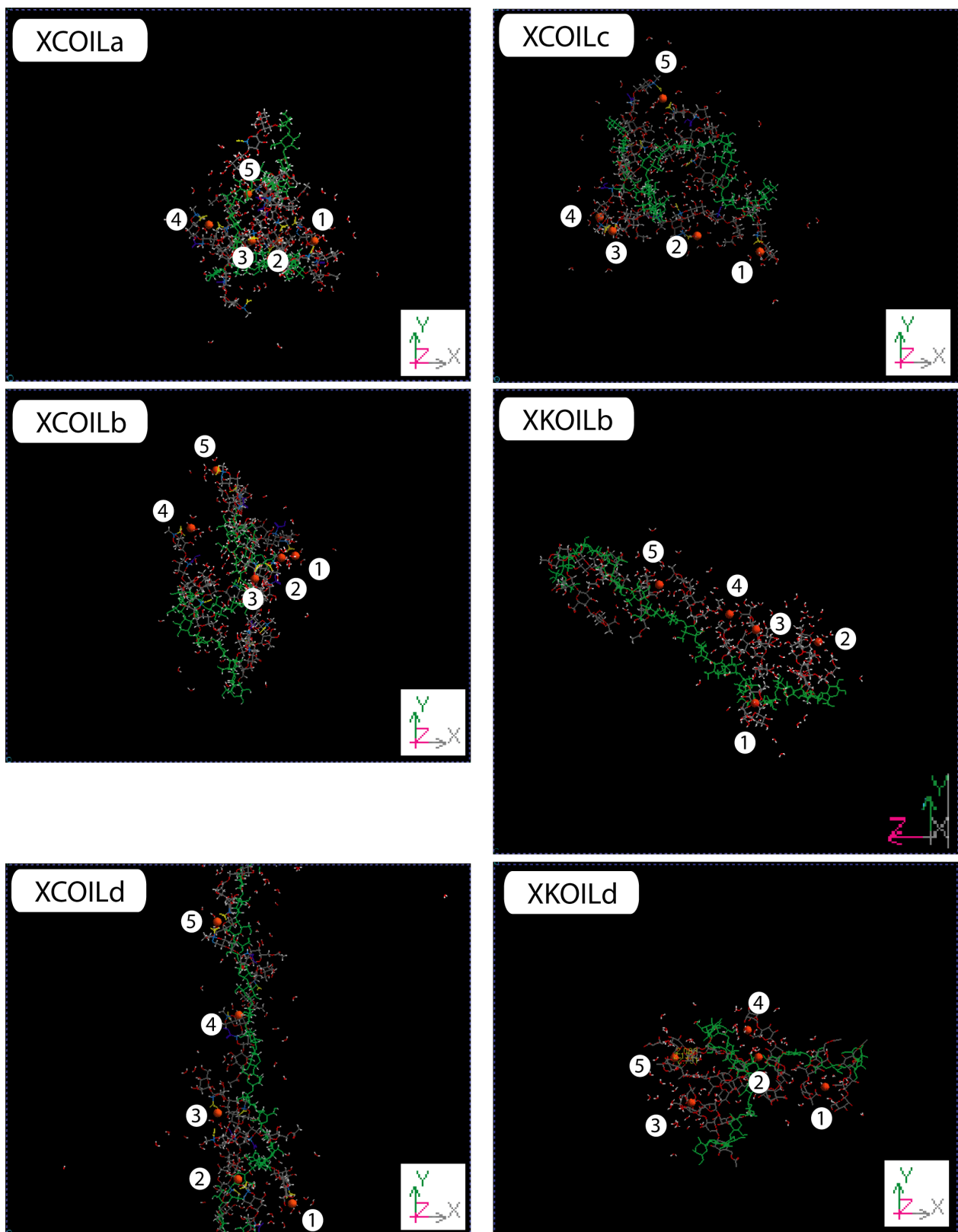


FIGURE 13.1 Photos des systèmes modèles du xanthane à pH3 en conformation XCOIL et XKOIL pendant la dernière MD à 300K à $t_{MD300K\text{finale}} = 300\text{ps}$ pour différentes conditions initiales et numérotation des ions Cu^{2+} . Les cations Cu^{2+} sont représentés par des boules oranges, les chaînes principales du xanthane sont en vert, les groupements carboxylates en jaune (pour les XCOIL seulement) et les autres atomes suivent le code couleur usuel (gris=C, rouge=O, blanc=H).

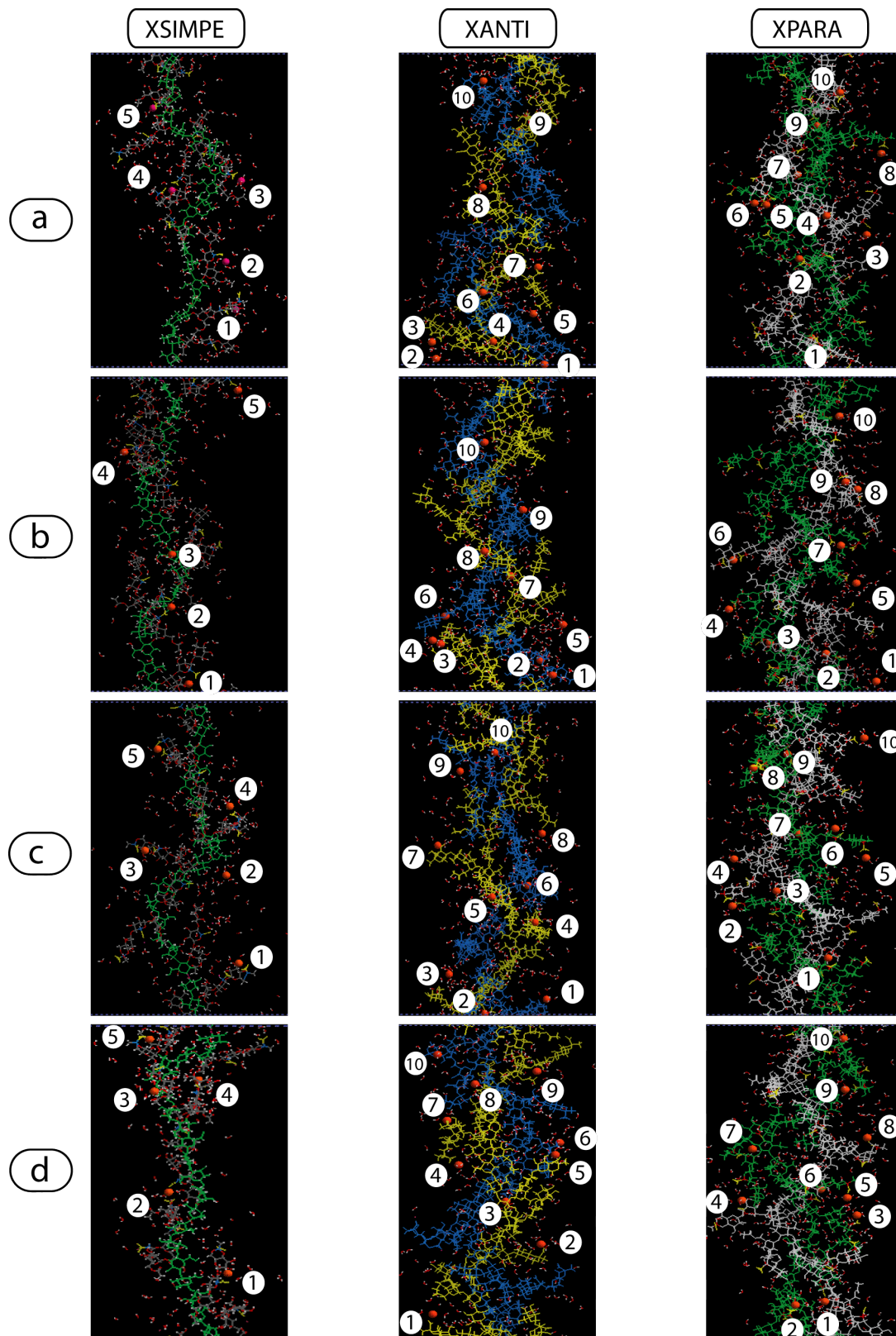


FIGURE 13.2 Photos des systèmes modèles du xanthane à pH5.5 en conformation XSIMPLE, XANTI et XPARA pendant la dernière MD à 300K à $t_{MD300Kfinale} = 300ps$ pour les CI a, b, c et d et numérotation des ions Cu^{2+} . Les cations Cu^{2+} sont représentés par des boules oranges. Pour XSIMPLE : les chaînes principales du xanthane sont en vert, les groupements carboxylates en jaune (sauf pour XANTI) et les autres atomes suivent le code couleur usuel (gris=C, rouge=O, blanc=H). Pour XPARA et XANTI, chaque fragment d'hélice simple constituant la double hélice a une couleur unie. Les bordures des cellules, vides, n'ont pas été représentées.

TABLE 13.1 Synthèse des résultats des simulations numériques à pH3 (XCOIL et XKOIL) et des hélices simples à pH5.5 (XSIMPLE).

Conformation et énergie totale		XCOILa	E _{tot} 438 [kcal.mol ⁻¹]			XCOILb	E _{tot} 781 [kcal.mol ⁻¹]									
Nom du site		ca1	ca2	ca3	ca4	ca5	cb1	cb2	cb3	cb4	cb5					
Type de site		G	G	P	PG	P	P	Libre	G	P	P					
Atome d'Oxygène participant à la coordination de Cu ²⁺	O de H ₂ O	4	4	4	1	4	3	6	3	4	4					
	O éther ou hydroxyle ou cétone	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0					
	O carboxylate	2	1	2	4	2	2	0	1	2	2					
Coordinance Totale		6	6	6	5	6	5	6	5	6	6					
E _{tot} sans Cu2+sitej		1190	1212	1249	1209	1266	1355	1285	1581	1532	1409					
E _{adsCu2+sitej}		-752	-773	-811	-771	-828	-573	-504	-799	-750	-627					
XCOILc		E _{tot} 624 [kcal.mol ⁻¹]					XCOILd					E _{tot} 661 [kcal.mol ⁻¹]				
cc1		cc2	cc3	cc4	cc5	cd1	cd2	cd3	cd4	cd5						
G		P	PG	Libre	PP	G	P	G	P	PG						
4		4	0	6	1	3	4	2	3	2						
1		0	0.5	0	0	1	0	2	1	0						
2		2	4	0	4	2	2	2	2	4						
7		6	4.5	6	5	6	6	6	6	6						
1305		1305	1386	1232	1513	1425	1512	1499	1354	1442						
-681		-681	-762	-608	-889	-764	-852	-838	-694	-782						
XKOILb		E _{tot} 731 [kcal.mol ⁻¹]					XKOILd					E _{tot} 65 [kcal.mol ⁻¹]				
kb1		kb2	kb3	kb4	kb5	kd1	kd2	kd3	kd4	kd5						
GC=O		PC=O	G	PC=O	PG	PG	G	PAC	G	PPG						
1		3	2	3	2	2	3	1	3	0						
4		1	2	1	0	0	1	2	1	0						
1		2	2	2	4	4	2	2	2	6						
6		6	6	6	6	6	6	5	6	6						
1523		1515	1543	1497	1637	891	937	901	896	951						
-792		-784	-811	-766	-905	-826	-872	-836	-831	-886						
XSIMPLEa		E _{tot} -706 [kcal.mol ⁻¹]					XSIMPLEb					E _{tot} -778 [kcal.mol ⁻¹]				
sa1		sa2	sa3	sa4	sa5	sb1	sb2	sb3	sb4	sb5						
G		G	P	G	P	GG	PGintra	Libre	G	P						
3		3	4	1	3	0	2	6	3	4						
1		0	0	3	1	3	0	0	1	0						
2		2	2	2	2	3	4	0	2	2						
6		5	6	6	6	6	6	6	6	6						
43		102	22	104	70	87	53	-48	34	-88						
-749		-808	-729	-811	-776	-864	-830	-730	-812	-689						
XSIMPLEc		E _{tot} -700 [kcal.mol ⁻¹]					XSIMPLEd					E _{tot} -705 [kcal.mol ⁻¹]				
sc1		sc2	sc3	sc4	sc5	sd1	sd2	sd3	sd4	sd5						
P		Libre	PGintra	P	PGintra	G	PG	Libre	G	P						
3		6	2	5	2	3	1	6	2	2						
1		0	0	0	0	1	0	0	2	1						
2		0	4	2	4	2	4	0	2	2						
6		6	6	7	6	6	5	6	6	5						
43		18	148	79	149	114	186	-48	82	-3						
-743		-719	-848	-779	-850	-819	-891	-658	-787	-702						

conformations à pH3

conformations à pH5.5

TABLE 13.2 Synthèse des résultats des simulations numériques des hélices doubles antiparallèles à pH5.5 (XANTI).

Conformation et énergie totale		XANTIa E_{tot} -3338 [kcal.mol ⁻¹]									
Nom du site		aa1	aa2	aa3	aa4	aa5	aa6	aa7	aa8	aa9	aa10
Type de site		G	Libre	G	PG	P	G	P	P	PGintra	P
Atome d'Oxygène participant à la coordination de Cu ²⁺	O de H ₂ O	2	6	3	2	2	3	3	4	2	3
	O éther ou hydroxyle ou cétone	2	0	1	0	1	0	1	0	0	0
	O carboxylate	2	0	2	3	2	2	2	2	4	2
Coordinance Totale		6	6	6	5	5	5	6	6	6	5
E_{tot} sans Cu2+sitej		-2441	-2715	-2640	-2419	-2448	-2514	-2462	-2608	-2500	-2529
$E_{\text{adsCu2+-sitej}}$		-897	-624	-698	-919	-891	-824	-876	-730	-838	-809
Conformation et énergie totale		XANTIb E_{tot} -3069 [kcal.mol ⁻¹]									
		ab1	ab2	ab3	ab4	ab5	ab6	ab7	ab8	ab9	ab10
Type de site		Libre	Libre	P	PG	Libre	G	G	PGintr a	G	P
		6	6	4	2	6	3	3	2	3	4
		0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
		0	0	1	4	0	2	2	4	2	2
		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
E_{tot} sans Cu2+sitej		-2353	-2431	-2263	-2240	-2422	-2310	-2281	-2235	-2242	-2142
$E_{\text{adsCu2+-sitej}}$		-716	-638	-806	-829	-648	-759	-788	-834	-827	-927
Conformation et énergie totale		XANTId E_{tot} -1647 [kcal.mol ⁻¹]									
		ac1	ac2	ac3	ac4	ac5	ac6	ac7	ac8	ac9	ac10
Type de site		G	Libre	Libre	P	Libre	PGintra	P	P	G	G
		4	5	6	3	6	1	3	4	3	4
		0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	2	0	4	2	2	2	2
		6	6	6	6	6	5	5	6	5	6
E_{tot} sans Cu2+sitej		-859	-880	-903	-832	-966	-837	-972	-844	-854	-976
$E_{\text{adsCu2+-sitej}}$		-788	-767	-744	-815	-681	-810	-675	-802	-793	-671
Conformation et énergie totale		XANTIc E_{tot} -3044 [kcal.mol ⁻¹]									
		ad1	ad2	ad3	ad4	ad5	ad6	ad7	ad8	ad9	ad10
Type de site		P	P	P	P	P	G	G	G	G	PC=O
		4	4	3	3	4	3	3	2	4	3
		0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		6	6	5	5	6	6	6	5	6	6
E_{tot} sans Cu2+sitej		-2234	-2156	-2227	-2258	-2318	-2236	-2284	-2275	-2261	-2231
$E_{\text{adsCu2+-sitej}}$		-810	-889	-817	-786	-727	-808	-760	-769	-784	-814

TABLE 13.3 Synthèse des résultats des simulations numériques des hélices doubles parallèles à pH5.5 (XPARA).

Conformation et énergie totale		XPARAa E_{tot} -3378 [kcal.mol ⁻¹]									
Nom du site		pa1	pa2	pa3	pa4	pa5	pa6	pa7	pa8	pa9	pa10
Type de site		P	G	G	G	P	G	G	P	P	G
Atome d'Oxygène participant à la coordination de Cu ²⁺	O de H ₂ O O éther ou hydroxyle ou cétone O carboxylate	4	3	4	5	4	4	2	4	4	4
Coordinance Totale		6	6	6	7	6	6	6	6	6	6
E_{tot} sans Cu2+sitej		-2525	-2543	-2558	-2619	-2569	-2659	-2579	-2657	-2635	-2593
$E_{adsCu2+sitej}$		-853	-835	-820	-759	-809	-719	-799	-721	-743	-785
Conformation et énergie totale		XPARAb E_{tot} -3114 [kcal.mol ⁻¹]									
Nom du site		pb1	pb2	pb3	pb4	pb5	pb6	pb7	pb8	pb9	pb10
Type de site		Libre	G	P	P	Libre	PGintra	PGintra	GC=O	G	P
Atome d'Oxygène participant à la coordination de Cu ²⁺	O de H ₂ O O éther ou hydroxyle ou cétone O carboxylate	6	4	4	4	6	1	1	3	4	4
Coordinance Totale		6	4	4	4	6	1	1	3	4	4
E_{tot} sans Cu2+sitej		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
$E_{adsCu2+sitej}$		0	2	2	2	0	4	4	2	2	2
Coordinance Totale		6	6	6	6	6	5	5	6	6	6
E_{tot} sans Cu2+sitej		-2453	-2281	-2294	-2352	-2412	-2306	-2338	-2313	-2373	-2378
$E_{adsCu2+sitej}$		-661	-833	-820	-761	-702	-808	-776	-800	-741	-736
Conformation et énergie totale		XPARAc E_{tot} -2986 [kcal.mol ⁻¹]									
Nom du site		pc1	pc2	pc3	pc4	pc5	pc6	pc7	pc8	pc9	pc10
Type de site		G	P	Libre	Libre	P	G	Libre	PGintra	P	P
Atome d'Oxygène participant à la coordination de Cu ²⁺	O de H ₂ O O éther ou hydroxyle ou cétone O carboxylate	4	3	6	4	4	4	6	2	4	4
Coordinance Totale		4	3	6	4	4	4	6	2	4	4
E_{tot} sans Cu2+sitej		0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
$E_{adsCu2+sitej}$		2	2	0	0	2	2	0	4	2	2
Coordinance Totale		6	5	6	6	6	6	6	6	6	6
E_{tot} sans Cu2+sitej		-2171	-2238	-2279	-2281	-2218	-2178	-2271	-2161	-2185	-2315
$E_{adsCu2+sitej}$		-815	-748	-707	-705	-768	-808	-715	-825	-801	-671
Conformation et énergie totale		XPARAd E_{tot} -3323 [kcal.mol ⁻¹]									
Nom du site		pd1	pd2	pd3	pd4	pd5	pd6	pd7	pd8	pd9	pd10
Type de site		P	G	P	P	P	G	P	P	P	PGintra
Atome d'Oxygène participant à la coordination de Cu ²⁺	O de H ₂ O O éther ou hydroxyle ou cétone O carboxylate	4	3	4	4	4	3	3	4	2	2
Coordinance Totale		4	3	4	4	4	3	3	4	2	2
E_{tot} sans Cu2+sitej		0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
$E_{adsCu2+sitej}$		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Coordinance Totale		6	6	6	6	6	6	6	6	5	4
E_{tot} sans Cu2+sitej		-2444	-2541	-2556	-2474	-2534	-2577	-2492	-2579	-2505	-2424
$E_{adsCu2+sitej}$		-879	-782	-767	-848	-789	-745	-830	-744	-818	-899

TABLE 13.4 Coordinance moyenne du cation Cu²⁺ dans les différentes simulations numériques réalisées.

		Conformations			
		COIL+KOIL	SIMPLE	ANTI	PARA
Coordinance Totale	Moyenne	5.82	5.90	5.88	5.75
	Ecart type	0.50	0.45	0.46	0.44

Types et nombres de sites d'adsorption

Chaque cation Cu^{2+} répertorié a été classé dans une catégorie de site, comme défini à la section matériel & méthode : site **Libre**, site **P**, site **G**, site **PG**, site **PP**, site **GG** ou site **PGintra**. En plus de ces sites attendus (très majoritaires) il y a formation de 4 nouveaux types de sites :

- Les sites **PC=O** et **GC=O**, qui sont en réalité des sites simples P et G faisant intervenir à la place d'une molécule d'eau l'oxygène au bout de la cétone de l'acétate le plus proche. Cela n'a pas d'influence sur leur énergie d'adsorption du cuivre qui reste du même ordre que celle des sites simples P et G (cf. tableau 13.1). PC=O et GC=O sont donc finalement comptabilisés comme des sites simples.
- Les sites **PAC** et **PPG** qui eux sont des nouveaux sites chelatants (cf. figure 13.4 pour la représentation spatiale de ces structures). Pour le site PAC, la chelation s'effectue entre un carboxylate du pyruvate et les deux oxygènes de l'acétate le plus proche. L'Énergie de stabilisation de PAC est de l'ordre de celle d'un site chelatant (cf. tableau 13.1). Pour le site PGG, il s'agit d'un site trichelatant, ayant une très grande énergie d'adsorption du cuivre (cf. tableau 13.1). PAC et PGG n'ont été observés qu'une seule fois sur l'ensemble des simulations.

Les tableaux 13.1, 13.2, 13.3 présentent l'intégralité des types de sites obtenus sur chaque simulation. Le comptage total des sites par conformation, est proposé au tableau 13.5.

TABLE 13.5 Nombre moyen de types de sites par conformation explorée pour 10 cuivre mis en solution initialement.

		Conformation			
		pH3	pH5.5	pH5.5	pH5.5
Nombre moyen de Cu_{ads} pour 10 cuivres en solution	Type de site	COIL+KOIL	SIMPLE	ANTI	PARA
	Libre	0.67	1.50	1.25	1.75
	Simple (P et G)	6.67	6.00	7.75	7.00
	Intra (PGintra)	0.00	1.50	1.00	0.75
	Chelatant extra (PG, PP, GG, PGG, PAC)	2.67	1.00	0.00	0.50

Il apparaît clairement que les conformations désordonnées à pH3 présentent moins de cuivres libres et plus de sites chelatants que les conformations en hélices à pH5.5. Pour les deux pH étudiés, les sites simples (P et G) sont toujours les sites majoritaires (entre 6 et 7.75 sites simples pour 10 cuivre initialement en solution quel que soit le pH) . La différence de comportement entre les systèmes à pH3 et pH5.5 semble se faire surtout entre les proportions de sites libres et de sites chelatants (cf. tableau 13.5).

Pour les conformations à un seul brin (coil ou hélices simples) la proportion de chaque site simple est de 50% P et 50% G. Tandis que pour les hélices doubles, on observe toujours légèrement plus de sites pyruviques que glucuroniques, la proportion moyenne des sites simples étant alors de 56% P et 44% G. Cela peut s'interpréter dans les hélices doubles par une meilleure disponibilité des sites simples P par rapport aux sites G. En effet, en hélice double, les sites P sont situés en bout de chaîne latérale et pointent donc vers l'extérieur, alors que les sites G sont moins disponibles pour la complexation du cuivre, car plus internes à la double hélice et donc probablement déjà impliqués dans la stabilisation de la macromolécule. Cette différence de disponibilité entre P et G n'est pas

observée sur les hélices simples et les coils.

Les sites chélatants internes aux chaînes latérales (PG_{intra}) n'apparaissent qu'à pH5.5 et jamais à pH3 (ce qui était attendu car il n'y a pas de pyruvate et glucuronate déprotonés sur une même chaîne latérale à pH3). Pour les sites chélatants entre chaînes latérales différentes, le site PG est ultra majoritaire (apparaît 10 fois/12), GG n'apparaît que 1 fois et PP n'apparaît que 1 fois sur les 12 sites chélatants extra-chaîne-latérale observés. Le site PP (n'apparaissant qu'une seule fois) apparaît à pH3. Or PP nécessite une grande souplesse de la structure du xanthane pour pouvoir exister car la formation de PP implique le rapprochement de deux chaînes latérales non consécutives (car le groupement pyruvique n'est présent qu'un motif sur deux). Il semble donc logique que le site PP n'apparaisse qu'à pH3 car les coils sont plus souples que les hélices à pH5.5, et permettent donc plus facilement le rapprochement de deux chaînes latérales initialement éloignées. Un raisonnement similaire justifie l'apparition du site trichélatant PPG uniquement à pH3 et jamais à pH5.5.

Les figures 13.3 et 13.4 présentent les géométries structurales des différents types de sites obtenus lors de nos simulations numériques. Nos hypothèses présentées à la section matériel & méthode concernant les différents types de sites théoriquement attendus sont bien vérifiées, puisque seulement deux sites nouveaux sont observés : PAC et PPG (et également PC=O et GC=O qui sont considérés comme des sites simples). Enfin, il est important de noter que la quasi-totalité des sites ne font jamais intervenir un hydroxyle de la chaîne principale du xanthane dans la complexation du cuivre ; en effet, sur les 130 cuivres (toutes expériences confondues) un seul partage un O d'un hydroxyle de la chaîne centrale (le site pa7).

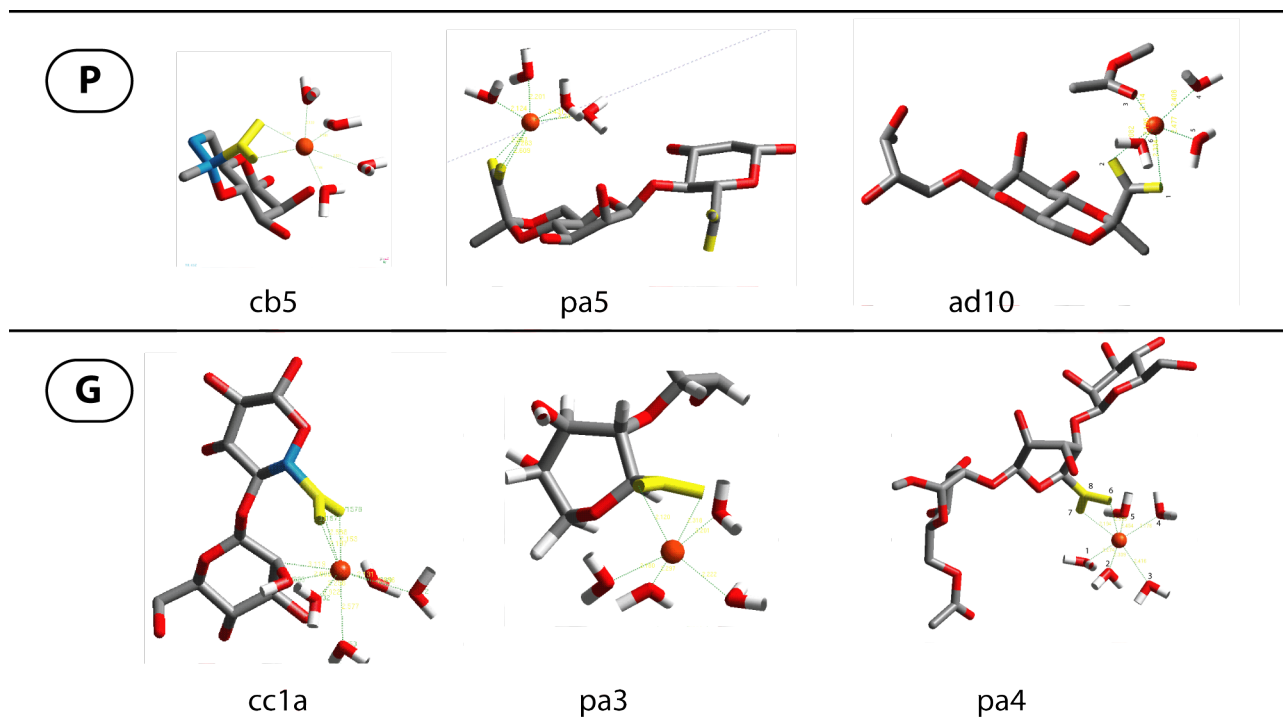


FIGURE 13.3 Représentation des structures spatiales des différents types de sites simples obtenus lors de nos simulations (la numérotation des sites est donnée sous chaque image). On observe les sites attendus : P et G.

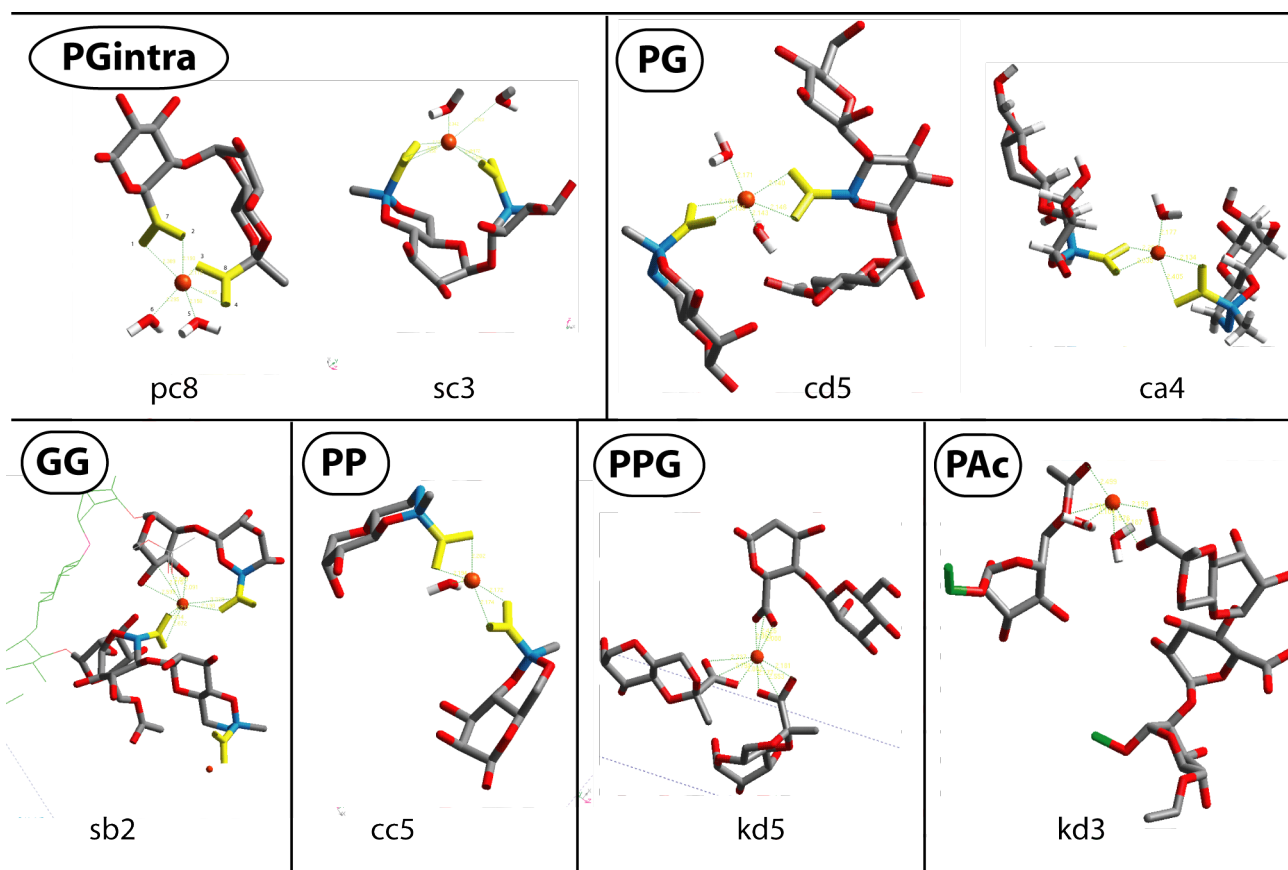


FIGURE 13.4 Représentation des structures spatiales des différents types de sites chélatants obtenus lors de nos simulations (la numérotation des sites est donnée sous chaque image). On observe les sites attendus : PG, PP, GG et PGintra ; mais également deux nouveaux sites chélatants : PAc et PPG.

Finalement, la figure 13.5 présente le nombre de types de sites de complexation du cuivre obtenus pour les conformations à pH3 (XCOIL et XKOIL) et les conformations à pH5.5 (XSIMPLE, XANTI et XPARA). **Les conformations à pH3 adsorbent plus de cuivre que les conformations à pH5.5** puisqu'il reste moins de cuivre libre à pH3 qu'à pH5.5 (cf. figure 13.5). De surcroît, les conformations à pH3 comportent plus de sites chélatants que les conformations à pH5.5. Cette première analyse qualitative, nous permet de penser que **notre modèle valide bien nos données expérimentales** (pour lesquelles on observe que le xanthane adsorbe plus de cuivre à pH3 qu'à pH5.5). Il nous reste maintenant à quantifier ces observations par un calcul d'énergie de stabilisation. Puisque les sites chélatants sont généralement plus stabilisants que les sites simples, les résultats énergétiques devraient confirmer la tendance observée par simple comptage des différents sites d'adsorption du cuivre sur nos simulations.

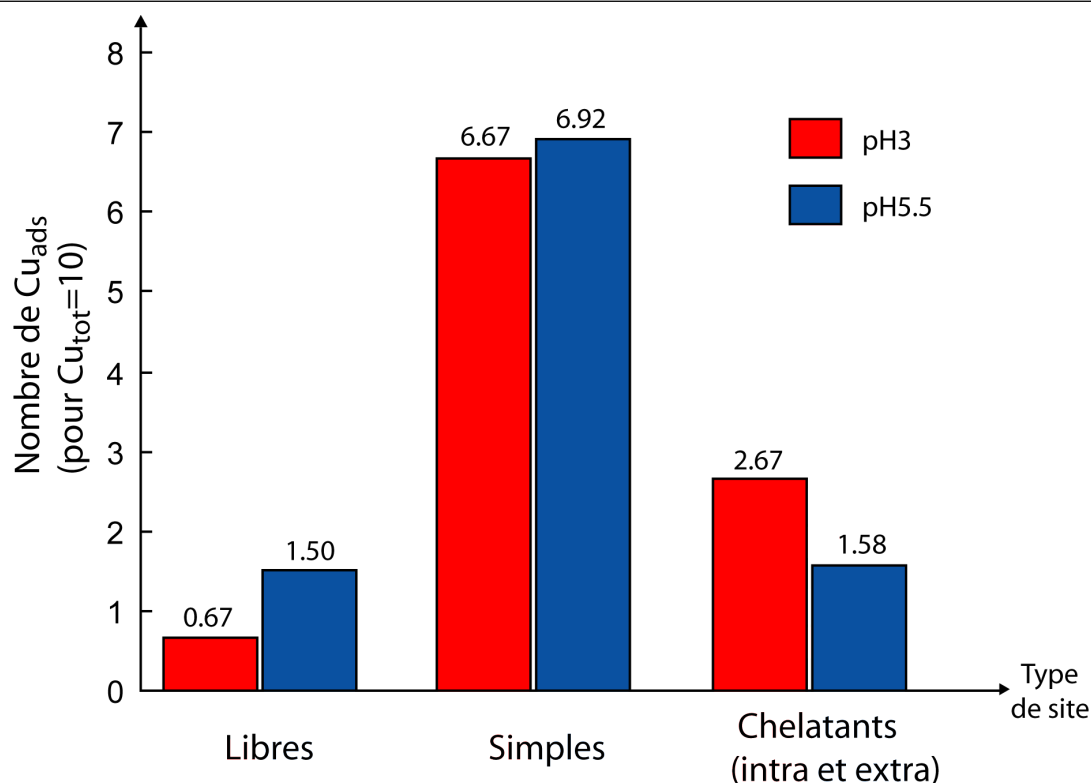


FIGURE 13.5 Comparaison à pH3 et pH5.5 du nombre de Cu^{2+} adsorbés par type de site, pour 10 Cu^{2+} initialement.

Simulations en présence de 2000 molécules d'eau.

Les simulations en présence de 2000 molécules d'eau et de sodium, montrent les mêmes tendances pour XANTIE, XPARAe et XSIMPLEe : 50% des Na^+ sont adsorbés sur les sites carboxylates (simples), 40% des Na^+ sont adsorbés² par des hydroxyles des chaînes latérales à proximité d'un groupement carboxylate, et 10% des Na^+ ne sont pas fixés. Nous avons observé que la coordinance moyenne des sodium était 6, c'est la même que lors de nos simulations avec peu d'eau. L'eau crée une enveloppe autour des hélices neutralisées par le nuage de contre-ions Na^+ (cf. figure 13.6). **La structure tubulaire xanthane/contre-ions rappelle le modèle du condensateur cylindrique utilisé lors de notre étude de modélisation des titrages expérimentaux** (cf. vues longitudinale et axiale de XPARAe à la figure 13.6). Pour la simulation en présence de 2000 molécules d'eau et de cuivre, il s'est avéré qu'à la fin de la nanoseconde de MD finale à 300K, aucun cuivre n'était encore fixé, ce qui traduit un mécanisme plus lent d'adsorption du cuivre en présence de beaucoup d'eau. La coordinance du cuivre dans l'eau reste égale à 6 en géométrie octaédrique. Malheureusement, la lenteur des calculs impliquée par la présence des 2000 molécules d'eau, ne nous a pas permis d'effectuer une simulation en présence de $\text{Cu}^{2+} + 2000 \cdot \text{H}_2\text{O}$ jusqu'à son terme, et nous ne pouvons donc pas pleinement comparer les résultats de la simulation XCOILe avec les résultats XCOILa,b,c,d. Nous aurions apprécié vérifier si un Cu^{2+} peut se fixer sur un carboxylate en éjectant un Na^+ déjà adsorbé, ce qui traduirait une adsorption plus lente des Cu^{2+} mais une énergie de stabilisation supérieure à celle de la fixation des Na^+ .

2. L'adsorption des Na^+ en sphère interne paraît peu réaliste car expérimentalement on observe pas de signal du sodium en EXAFS, et globalement le sodium est considéré comme s'adsorbant principalement en sphère externe.

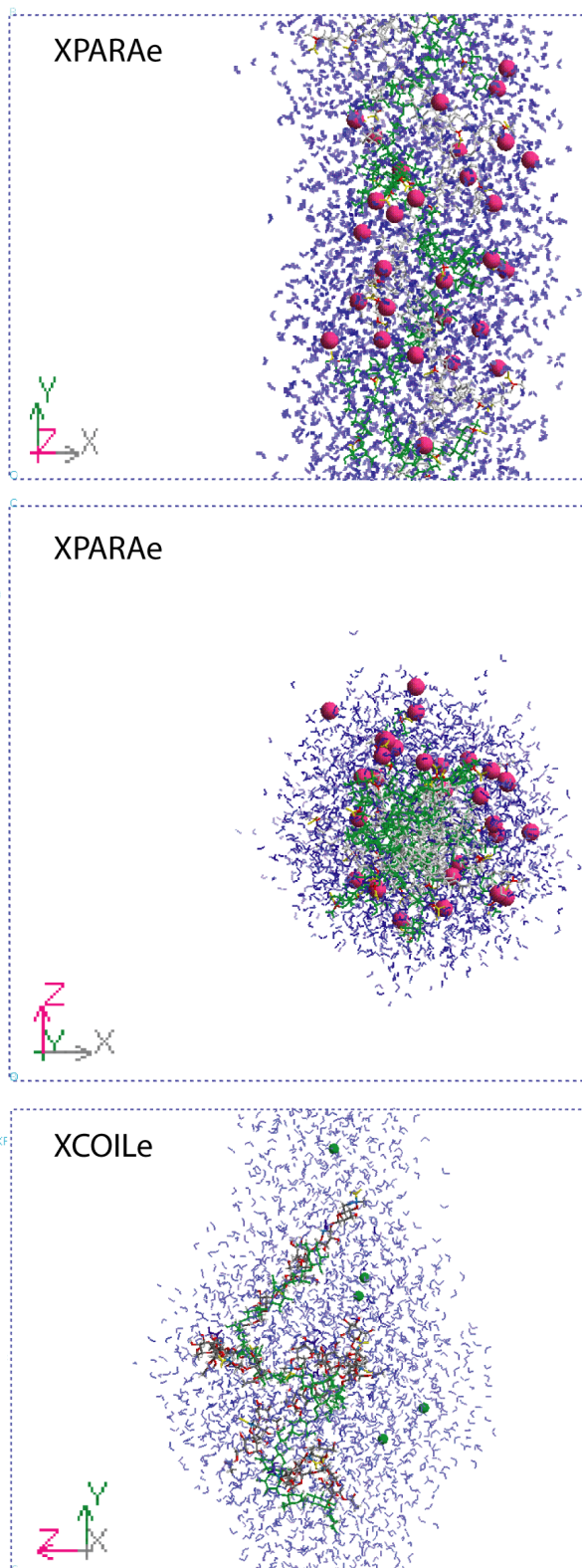


FIGURE 13.6 Résultats des simulations en présence de 2000 molécules d'eau (en bleu). A gauche et au centre, vues longitudinale et axiale du résultat de XPARAe. Les Na^+ sont en rose, ils se fixent autour du xanthane à 90% après 750ps de MD final à 300K. A droite, résultat de XCOILe, les Cu^{2+} sont en vert, ils ne se sont pas encore fixés après 1000ps de MD finale à 300K.

13.2 Mécanisme d'adsorption du cuivre en modélisation moléculaire

13.2.1 Temps nécessaire à l'adsorption des Cu^{2+}

L'étude du temps d'adsorption des cuivres sur toutes les simulations montre que les premiers cuivres adsorbés sont retenus à la fin des 30 ps de MD à 600K. Puis les cuivres restant à adsorber le sont pendant les 100 premières picosecondes de la MD à 900K. Les sites chelatants se forment eux avant 200ps de la MD à 900K. Ainsi, pour toutes les simulations, toute la phase d'adsorption du cuivre se fait avant $t=200\text{ps}$ dans la MD à 900K. Les simulations suivantes à 590K puis 300K représentent donc bien la stabilisation de l'état d'équilibre atteint à 900K. La figure 13.7 résume le propos précédent.

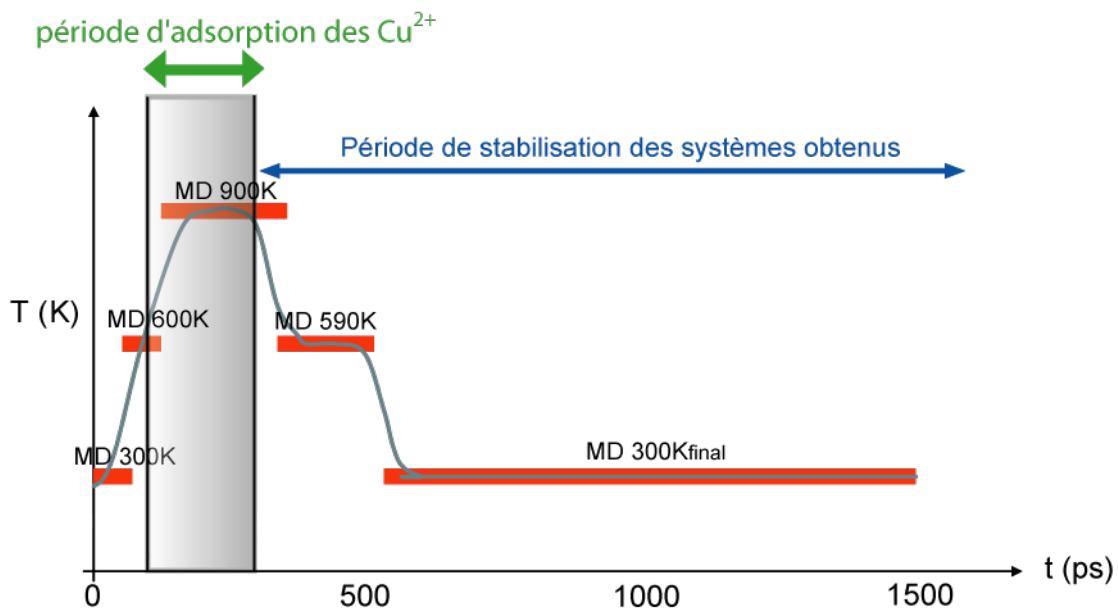


FIGURE 13.7 Période d'adsorption des Cu^{2+} pendant nos scénarios de MD.

13.2.2 Sphères de coordination du cuivre

Nos résultats de MD montrent qu'avec notre modèle, les cuivres libres sont toujours hexacoordonnés (i.e. au centre d'un octaèdre) par les oxygènes des molécules d'eau. Ces molécules d'eau vibrent autour de leur position d'équilibre à 2.12 Å du centre métallique. Nous montrons que les molécules d'eau les plus proches de Cu^{2+} ne sont pas bloquées dans la sphère d'hydratation du cuivre, mais qu'elles connaissent un échange dynamique avec les molécules d'eau plus lointaines. La figure 13.8 montre même que ces échanges dynamiques de molécules d'eau sont concertés, c'est à dire qu'à tout départ d'une molécule d'eau impliquée dans la sphère d'hydratation du cuivre est associée l'arrivée d'une nouvelle molécule d'eau (depuis le continuum vers la sphère d'hydratation), assurant ainsi au Cu^{2+} une coordinance octaédrique constante par six molécules d'eau. Puisqu'on observe environ 10 échanges en une nanoseconde de simulation (cf. figure 13.8), on peut évaluer le temps caractéristique de ces échanges à $\tau_{\text{H}_2\text{O}} \approx 100\text{ps}$.

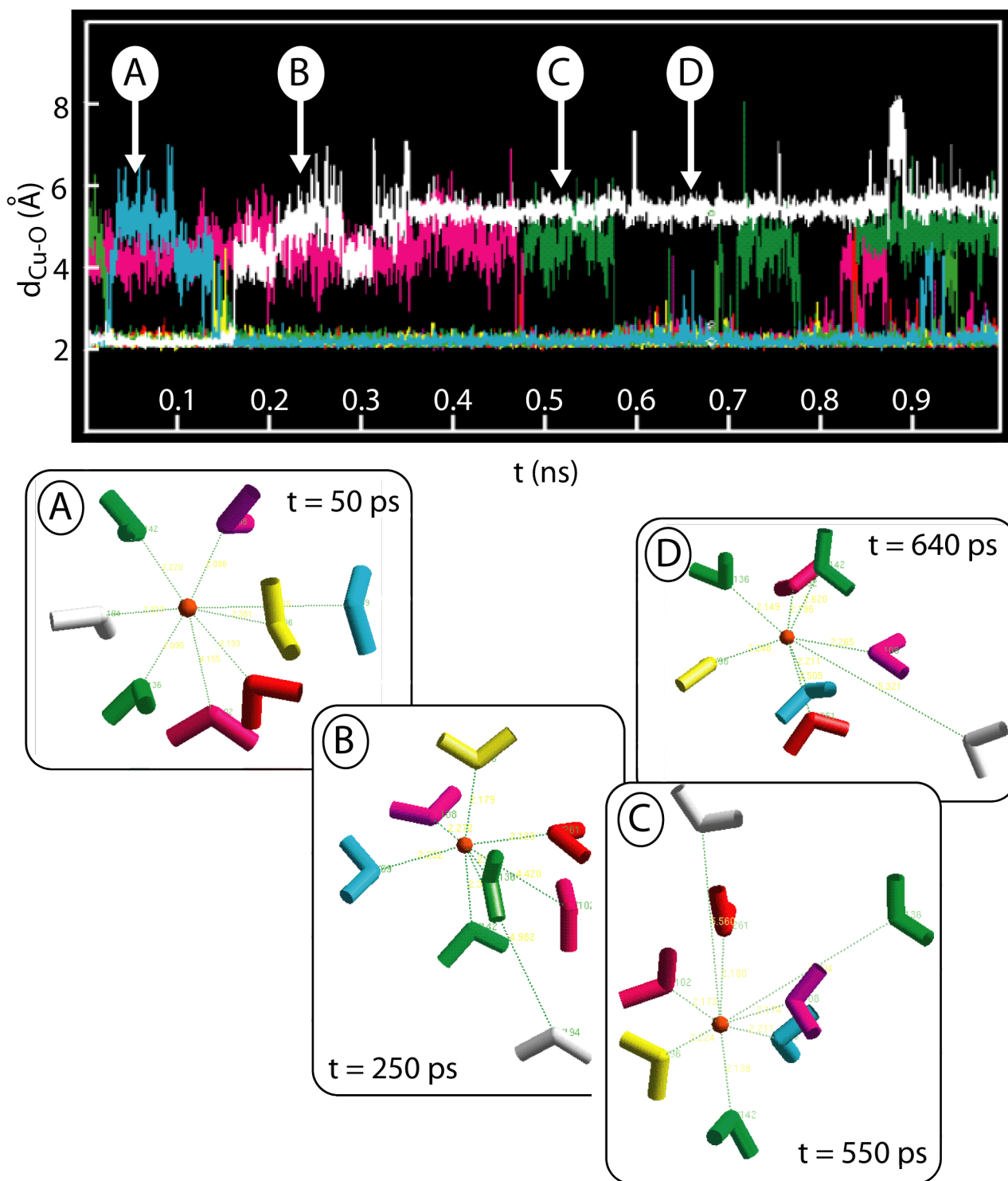


FIGURE 13.8 *Echange dynamique des molécules d'eau de la sphère d'hydratation du cation Cu^{2+} . Le cuivre est toujours hexacoordonné par 6 molécules d'eau. Ces 6 molécules d'eau connaissent un échange dynamique concerté avec les molécules d'eau du continuum, avec un temps caractéristique $\tau_{\text{H}_2\text{O}} \approx 100\text{ps}$. On observe l'échange de la molécule d'eau en blanc par la molécule d'eau en bleu entre les états **A** ($t=50\text{ps}$) et **B** ($t=250\text{ps}$), puis l'échange d'une molécule d'eau en vert par la molécule d'eau en magenta entre les états **B** ($t=250\text{ps}$) et **C** ($t=550\text{ps}$), et enfin le retour de la molécule d'eau verte par éjection de l'autre molécule d'eau de couleur verte entre les états **C** ($t=550\text{ps}$) et **D** ($t=640\text{ps}$).*

13.2.3 Mécanisme d'adsorption de Cu^{2+} sur un site simple.

Le mécanisme d'adsorption des cations Cu^{2+} par les sites simples est un **mécanisme concerté** (éjection de deux molécules d'eau simultanément à la fixation des deux oxygènes des carboxylates), conduisant à la formation d'un **complexe de sphère interne** (tel qu'on peut le décrire en modélisation moléculaire, c'est à dire sans molécule d'eau intercalée entre le centre métallique et le groupement pyruvate), comme le montre la figure 13.9. Dans un premier temps, le cuivre est libre (hexacoordonné par des molécules d'eau), et situé loin (i.e. plus de 5 Å) du site de fixation (cf. configuration **A** figure 13.9). Puis le cuivre libre se rapproche du site d'adsorption (cf. configuration **B** figure 13.9), à tel point que deux molécules d'eau sont éjectées en même temps de la sphère de coordination du cuivre à l'instant où les oxygènes négativement chargés du carboxylate entrent en jeu dans la coordination du cation Cu^{2+} (cf. configuration **C** figure 13.9). Enfin, les molécules d'eau éjectées ne participant plus à la coordination du cuivre retournent explorer le continuum tandis que la coordinance du site simple s'organise avec les quatre molécules d'eau restantes et le groupement carboxylate (cf. configuration **D** figure 13.9). La figure 13.9 présente l'exemple de l'adsorption du premier cuivre sur un site pyruvate P. Le même type de mécanisme a été observé sur les sites simples glucuronates G.

D'autre part, nous avons observé que sur tous les sites d'adsorption des Cu^{2+} **l'adsorption est irréversible**, c'est à dire qu'une fois fixé à un carboxylate, aucun Cu^{2+} ne se désorbe. Par contre, l'échange dynamique des molécules d'eau complétant la coordinance du cuivre a toujours lieu (cf. figure 13.10). Pour les systèmes **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F** et **G**, de la figure 13.10 les oxygènes négativement chargés du carboxylate sont toujours à une distance courte du cuivre (entre 2 et 2.2 Å), alors que les molécules d'eau connaissent un échange dynamique pour compléter la sphère de coordination du cuivre avec la constante caractéristique d'échange $\tau_{H_2O} \approx 100\text{ps}$ (déjà évaluée à la figure 13.8).

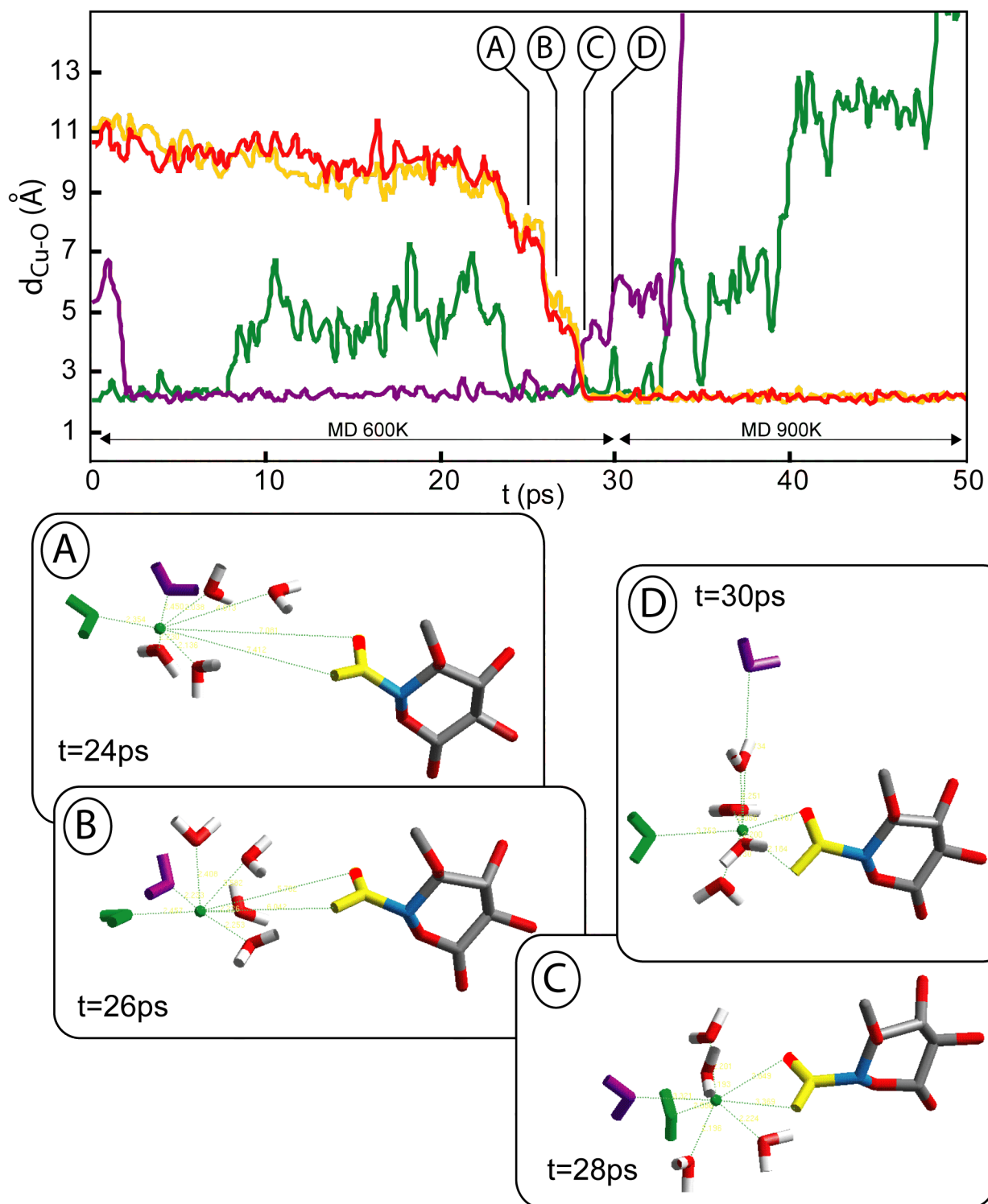


FIGURE 13.9 Mécanisme d'adsorption concerté de Cu^{2+} par un site pyruvate. **A** : Cuivre libre hexacoordonné loin du site d'adsorption. **B** : rapprochement du cuivre libre au voisinage du site d'adsorption. **C** : Adsorption du Cu^{2+} sur le pyruvate par éjection concertée de deux molécules d'eau et fixation des deux oxygènes négatifs du carboxylate. **D** : Site simple de type adsorbé.

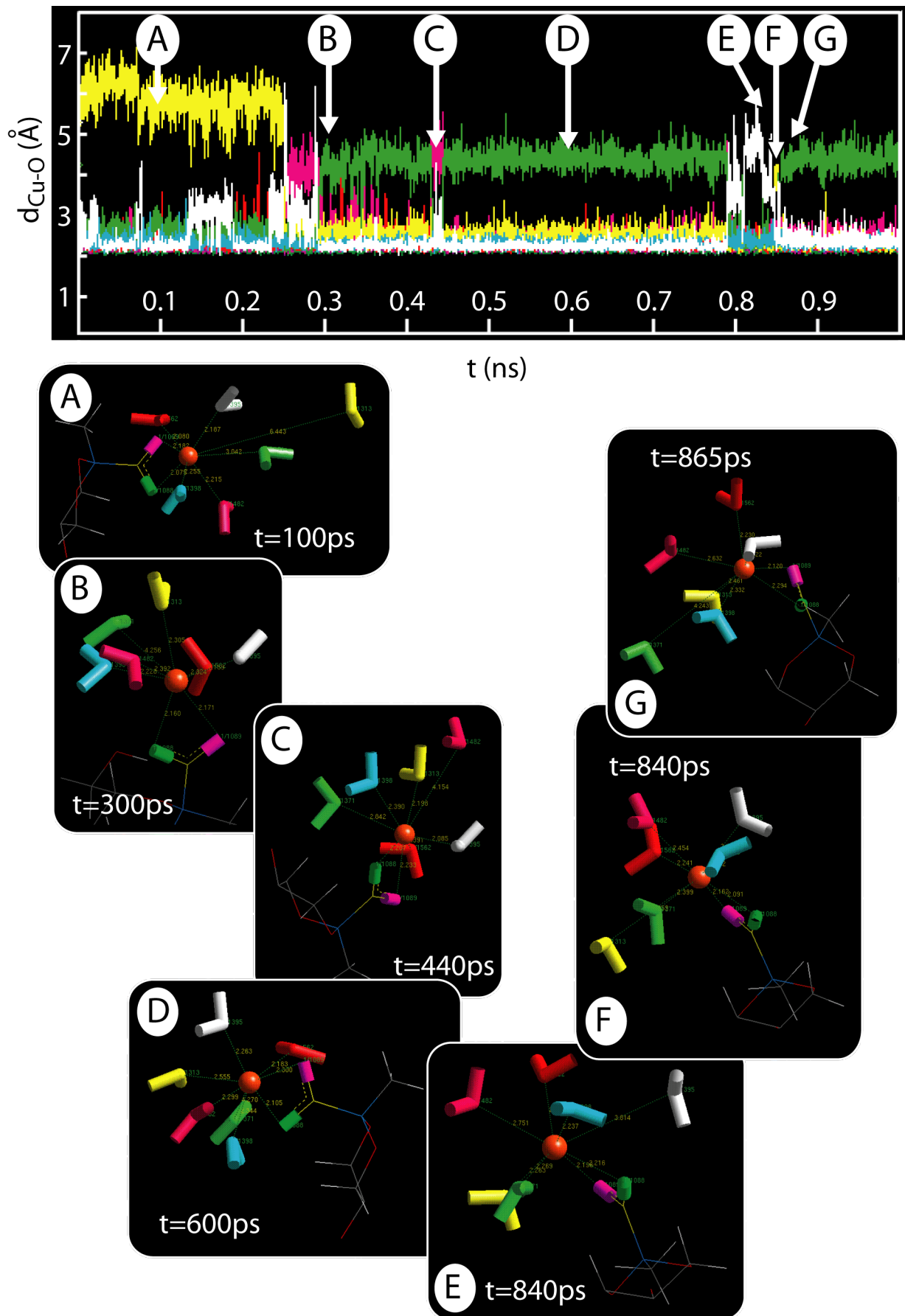


FIGURE 13.10 Adsorption irréversible sur les sites carboxylates, et échange dynamique des molécules d'eau complétant la sphère de coordination du cation Cu^{2+} (pendant la MD finale à 300K).

13.2.4 Mécanisme d'adsorption de Cu^{2+} par les sites chélatants.

L'adsorption du cuivre par des sites chélatants, c'est à dire des sites impliquant deux fonctions carboxylate de la même molécule de xanthane, est toujours obtenue en deux temps : (i) fixation d'un site de type simple (P ou G) puis (ii) arrangement de la structure moléculaire aboutissant à l'adsorption d'un deuxième site. Il n'a jamais été observé de site chélatant par un mécanisme concerté (arrivée simultanée de deux carboxylates autour d'un cuivre). Les sites chélatants sont donc formés via un **mécanisme par étape**, et conduisent encore une fois à des **complexes de sphère interne** (cf. figure 13.11 et 13.12).

La figure 13.11 décrit l'adsorption d'un site PG intra : **[A]** : Cu^{2+} libre situé loin des deux sites d'adsorption. **[B]** : fixation de Cu^{2+} sur le site glucuronate (par un mécanisme concerté -molécules d'eau non représentées), création d'un site simple G. **[C]** : réarrangement de la chaîne latérale pour conduire à **[D]** : création du site chélatant PG intra, par adsorption du deuxième groupement carboxylate (celui du pyruvate) sur le site simple G précédemment créé. **[E]** : arrivée d'une molécule d'eau du continuum pour compléter la coordinance du complexe (échange avec une molécule d'eau non représentée). Rem : La coordinance modèle de **[E]** pour $t=200\text{ps}$ est de 5. La coordinance peut être complétée à 6 dans la suite de la MD.

La figure 13.12 décrit la formation d'un site chélatant PG entre deux chaînes latérales différentes : **[A]** : site simple P déjà formé, avec un pyruvate et quatre molécules d'eau complétant la coordinance du cuivre à 6 ; **[B]** : réarrangement des chaînes dans la macromolécule pour arriver à **[C]** : complexe pyruvate-glucuronate PG, par éjection de deux molécules d'eau du complexe simple P précédemment formé. Rem : D'autres sites PG sont formés par l'adsorption initiale sur un site G puis l'adsorption d'un site P (les deux ordres d'adsorption ont été observés).

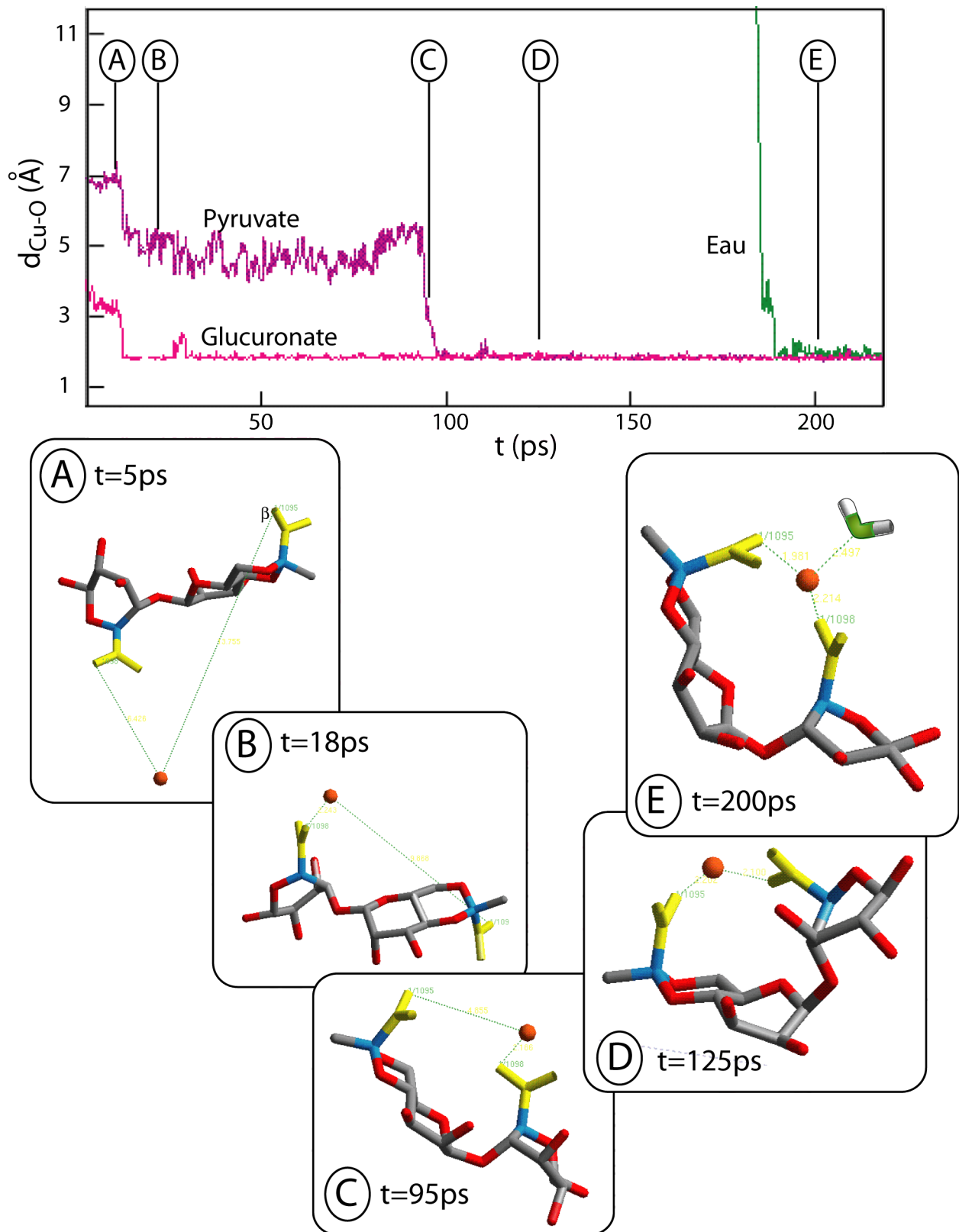


FIGURE 13.11 Mécanisme d'adsorption par étape de Cu^{2+} par un site chélatant intra-chaîne latérale (PGintra). Par souci de clarté les molécules d'eau n'ont pas été toutes représentées.

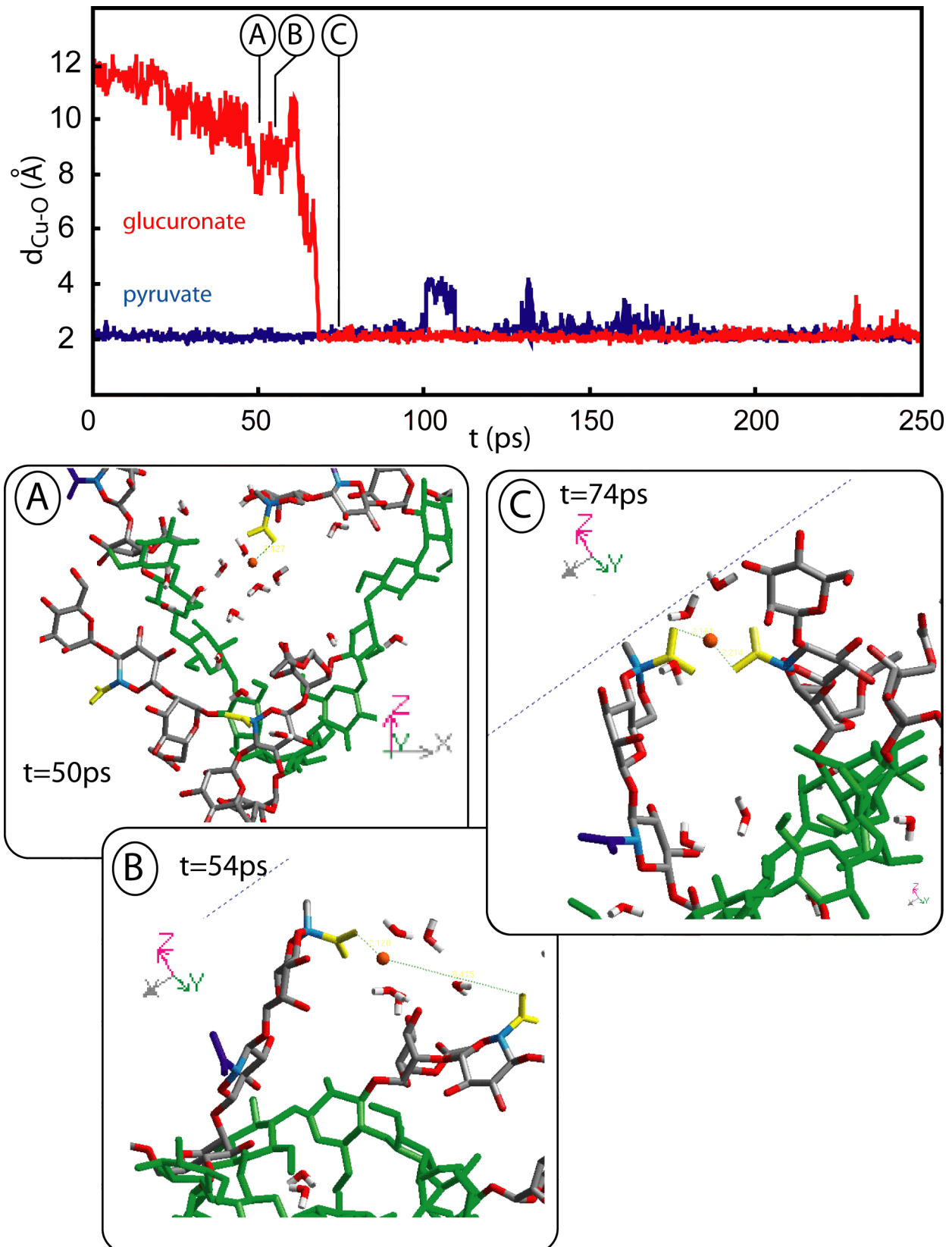


FIGURE 13.12 Mécanisme d'adsorption par étape de Cu^{2+} par un site chélatant inter-chaînes pyruvate-glucuronate (PG).

13.3 Evaluation des énergies de complexation du cuivre par le xanthane en modélisation moléculaire

13.3.1 Méthode directe pour l'évaluation des énergies de complexation du cuivre par le xanthane.

Les énergies d'adsorption de chaque site sont données aux tableaux 13.1, 13.2 et 13.3. Afin d'évaluer les énergies globales de complexation du cuivre pour chaque conformation (cf. section 12.1.5.3), nous avons simplement sommé les valeurs de ces énergies puis normalisé par le nombre de cuivres mis initialement en solution (soit 30 pour les conformations XCOIL et XKOIL, 20 pour la conformation XSIMPLE et 40 pour les conformations XANTI et XPARA). Les résultats sont alors donnés pour un cuivre en solution et 2 monomères de xanthane : $E_{\text{Cu-XCOIL/XKOIL}} = -768 \pm 96 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $E_{\text{Cu-XSIMPLE}} = -780 \pm 63 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $E_{\text{Cu-XANTI}} = -779 \pm 55 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $E_{\text{Cu-XSIMPLE}} = -785 \pm 75 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

D'emblée, ces résultats ne permettent pas de conclure sur la conformation générant le complexe le plus stable en présence de cuivre. D'abord parce que toutes les valeurs d'énergies sont très proches et se recouvrent dans leur écart type. De plus il apparaît que les conformations XCOIL et XKOIL seraient celles qui stabilisent le moins le cuivre (alors que pourtant ce sont les conformations où l'on retrouve le moins de cuivres libres en solution expérimentalement !). Il apparaît donc que la méthode directe pour le calcul de l'énergie de stabilisation des complexes Cu-Xanthane n'est pas adaptée.

La raison principale pour laquelle la méthode directe ne semble pas adaptée est que les énergies ont toutes été évaluées à un instant donné ($t_{\text{MD300Kfinal}}=300\text{ps}$), alors que l'énergie de stabilisation résultante de la complexation doit être une moyenne des énergies de chaque site au cours du temps (i.e. pendant la nanoseconde de dynamique finale à 300K). Or l'évaluation des 140 énergies de stabilisation de chaque cuivre pendant 1000ps n'est pas envisageable. On notera tout de même que pour une même famille de conformation, les énergies d'adsorption des sites suivent l'ordre suivant (cf. tableau 13.6) :

$$E_{\text{Cu - Chelatanant extra}} < E_{\text{Cu - Chelatanant intra}} < E_{\text{Cu - Simple}} < E_{\text{Cu - Libre}} < 0 \quad (13.1)$$

L'inégalité 13.1 signifie qu'un cuivre restant libre en solution stabilise peu le système Cu-xanthane, alors que la stabilisation du système Cu-xanthane est de plus en plus grande pour les sites d'adsorption Simple (P,G), Intra (PGintra) et Chelatanants extra (PG, GG, PP). Ce résultat rejoint l'ordre de celui des calculs sur des sites modèles (cf. tableau 12.8). Par contre il apparaît que dans les simulations à pH5.5, la valeur de l'énergie $E_{\text{Cu-libre}}$ semble être surestimée tandis que pour les simulations à pH3, la valeur de $E_{\text{Cu-Chelatanant}}$ semble être sous-estimée. Le fait que ces énergies ($E_{\text{Cu-libre}}$, $E_{\text{Cu-Chelatanant}}$) ne soient pas comparables à pH3 (XCOIL et XKOIL) et pH5.5 (XSIMPLE, XANTI et XPARA) a pour conséquence d'invalider la méthode directe pour la comparaison des énergies de complexation des systèmes Cu-xanthane en fonction de leur conformation. Par contre, le fait que l'inégalité 13.1 soit vérifiée sur les systèmes simulés, nous permet de valider le calcul par la méthode indirecte (car cette inégalité est déjà vérifiée dans la méthode indirecte, cf. tableau 12.8).

TABLE 13.6 Moyenne des énergies d'adsorption du cuivre par les différents types de sites en fonction de la conformation du xanthane, calculées par la méthode directe.

	XCOIL+XKOIL (pH3)	XSIMPLE (pH5.5)	XANTI (pH5.5)	XPARA (pH5.5)
	E_{Cu-ads} [kcal.mol ⁻¹]	E_{Cu-ads} [kcal.mol ⁻¹]	E_{Cu-ads} [kcal.mol ⁻¹]	E_{Cu-ads} [kcal.mol ⁻¹]
Libre	-556 ± 74	-702 ± 39	-698 ± 21	-688 ± 55
Simple (P,G)	-764 ± 78	-767 ± 44	-785 ± 46	-798 ± 63
Intra (PGintra)	NC	-843 ± 11	-827 ± 52	-827 ± 15
Chelatant (PG,GG,PP)	-832 ± 57	-878 ± 19	NC	-874 ± 64

NC: Non calculable car aucun site de ce type

13.3.2 Méthode indirecte pour l'évaluation des énergies de complexation du cuivre par le xanthane.

La méthode indirecte pour le calcul de l'énergie de complexation du cuivre par le xanthane dans une conformation donnée est expliquée au chapitre matériel & méthode. On rappelle brièvement qu'il s'agit de pondérer l'énergie d'adsorption de complexe modèle du cuivre (P, G, PGintra, PP, PG, GG) par le nombre de sites de chaque type rencontré dans une conformation donnée. Les énergies des complexes modèles ont déjà été calculées (cf. tableau 12.8 et équation 12.12). Les pondérations du nombre de sites par type de conformation ont également déjà été déterminées (cf. tableau 13.5). Finalement le calcul des énergies de complexation est donné au tableau 13.7 :

TABLE 13.7 Calcul des énergies de complexation du cuivre par le xanthane en fonction de sa conformation par la méthode indirecte.

	Type de site	Conformation				E_{Cu-ads} [kcal.mol ⁻¹]
		COIL+KOIL pH3	SIMPLE pH5.5	ANTI pH5.5	PARA pH5.5	
Nombre moyen de Cu_{ads} pour 10 cuivres en solution et Energie d'adsorption associée	Libre	0.67	1.50	1.25	1.75	-306.00
	Simple (P et G)	6.67	6.00	7.75	7.00	-502.00
	Intra (PGintra)	0.00	1.50	1.00	0.75	-586.00
	Chelatant extra (PG, PP, GG)	2.67	1.00	0.00	0.50	-627
Energie de complexation pour 10 Cuivre [kcal.mol ⁻¹]		-5223	-4977	-4859	-4803	
Energie de complexation $E_{Cu-xanthane}$ pour 1 Cuivre et 2 monomères de xanthane [kcal.mol⁻¹]		-522	-498	-486	-480	

Les résultats des calculs des énergies de complexation par la méthode indirecte ($E_{\text{Cu-XCOIL/XKOIL}} = -522 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $E_{\text{Cu-XSIMPLE}} = -498 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $E_{\text{Cu-XANTI}} = -486 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $E_{\text{Cu-XSIMPLE}} = -480 \text{ kcal.mol}^{-1}$) sont beaucoup plus discriminants que ceux obtenus par la méthode directe (cf. tableau 13.7). En particulier l'énergie de complexation du cuivre par le xanthane à pH3 ($E_{\text{Cu-XCOIL/XKOIL}} = -522 \text{ kcal.mol}^{-1}$) est bien inférieure à celle des conformations ordonnées à pH5.5 ; ce qui signifie que le cuivre est mieux complexé à pH3 qu'à pH5.5. En considérant arbitrairement le xanthane à pH5.5 comme un mélange des trois conformations XSIMPLE, XANTI et XPARA en même quantité, et en considérant le xanthane à pH3 comme un coil, on peut finalement conclure sur les résultats des énergies de complexation du cuivre par le xanthane donnés par la modélisation moléculaire : **$E_{\text{Cu-xanthane pH3}} = -522 \text{ kcal.mol}^{-1}$** et **$E_{\text{Cu-xanthane pH5.5}} = -488 \text{ kcal.mol}^{-1}$** (pour un cuivre et deux monomères de xanthane en solution).

Ce résultat est particulièrement intéressant : il démontre que la complexation d'un cation métallique peut être meilleure à pH acide qu'à pH basique car le moindre nombre de sites complexants disponibles à pH acide peut être compensé par une organisation conformationnelle de la molécule favorisant la saturation des sites. Dans le cas du xanthane, une plus grande proportion d'hélices rigides à pH5.5 l'empêche de créer des sites chelatants, tandis qu'à pH3, même s'il y a moins de sites d'adsorption potentiels (carboxylates moins déprotonés), la structure en coil de la molécule permet aux chaînes latérales de complexer d'avantage de cuivres (grâce à leur souplesse elles explorent mieux l'espace et augmentent leur probabilité de rencontre avec un cuivre) et permet également de créer d'avantage de sites chelatants (plus stabilisants).

Ce propos est à modéré en fonction du taux de couverture : à faible concentration totale en cuivre ($[\text{Cu}]_{\text{tot}} \leq 20 \text{ mM}$, conditions vérifiées lors des titrages et de la modélisation moléculaire) on favorise l'adsorption sur les sites forts, et donc les différences entre l'adsorption à pH3 (conformation coil) et pH5.5 (conformation hélicoïdale) seront accentuées par rapports à celles observables à haute concentration totale en cuivre ($[\text{Cu}]_{\text{tot}} \approx 100 \text{ mM}$, conditions requises pour les expériences EXAFS). En pratique le taux de couverture en EXAFS est supérieur à celui des titrages ou de la modélisation moléculaire, la différences entre l'adsorption du cuivre à pH3 et à pH5.5 devrait être moins prononcée sur nos résultats EXAFS que sur ceux des titrages et de la modélisation moléculaire.

13.4 Ordre local du cuivre

13.4.1 Résultats en spectroscopie EXAFS : RDF-EXAFS

La figure 13.13 présente les spectres EXAFS des échantillons. Bien que certains spectres se ressemblent (XC5 et Mix5 ; XB3 et GlcA5 ; Pyr5, XA3 et XA5) nous ne pouvons pas conclure qualitativement sur ces simples comparaisons de spectres. Il a été nécessaire de passer dans l'espace réel des distances (par les TF) afin de comparer et fitter les différents spectres entre eux.

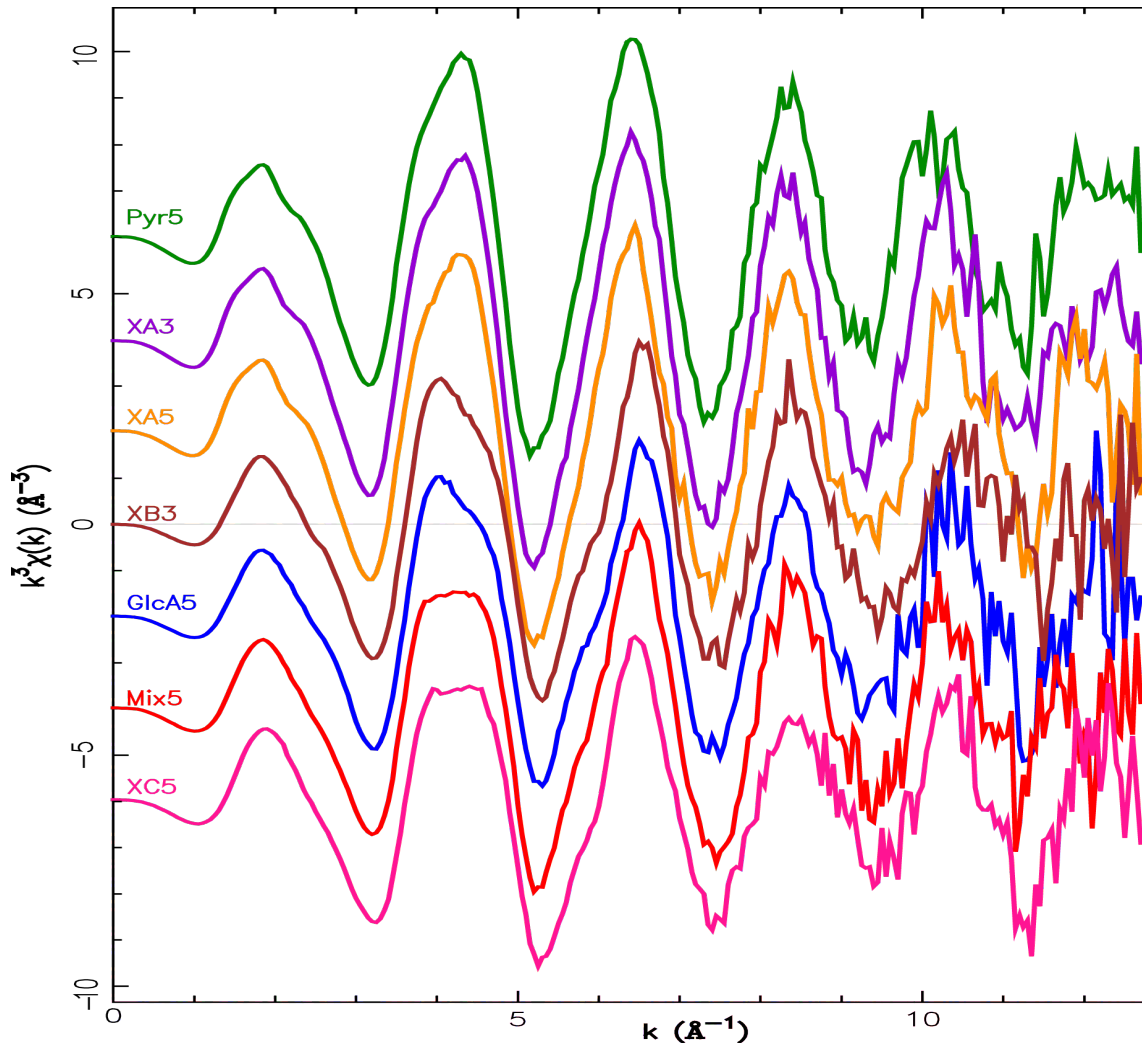


FIGURE 13.13 Spectres EXAFS en $k^3\chi(k)$ des échantillons passés en spectroscopie d'absorption X. On rappelle (cf. figure 12.9) que les échantillons XA sont ceux du xanthane en présence de cuivre à 140ppm, XB et XC les échantillons du xanthane en présence de 1400ppm de cuivre, Pyr l'échantillon de l'acide pyruvique en présence de 635ppm de cuivre, GlcA les échantillons de l'acide glucuronique en présence de 635ppm de cuivre, Mix le mélange équimolaire des acides pyruviques et glucuroniques en présence de 635ppm de cuivre. Les chiffres 3 (resp. 5) indiquent que les échantillons sont à pH 3.5 (resp. 5.3).

Le tableau 13.8 présente les résultats des fits obtenus sur les TF des spectres EXAFS des échantillons analysés. Tous les fits proposés reconstruisent très fidèlement les données expérimentales, jusqu'à $R=2.35$ voir 3.08 \AA (dépendant des fits). A titre d'exemple, la figure 13.14 présente les TF des échantillons XA3 (xanthane à pH3.5 +Cu à 140 ppm) et XA5 (xanthane à pH5.5 +Cu à 140 ppm) et leur fits respectifs. On attribue le premier pic à des atomes d'oxygène, situés entre 1.93 et 1.97 \AA , tandis que le deuxième petit pic décalé d'environ 0.35 \AA vers les longues distances (situé

entre 2.3 à 2.4 Å) est modélisé indifféremment par un atome d'oxygène ou de carbone (nous avons choisi de l'attribuer aux premiers voisins carbone, cf. tableau 13.8). Pour les distances supérieures, les fits n'ont pas tous été réalisés (dû à la qualité limitée de certaines données).

La comparaison des résultats entre les fits sur les complexes modèles (Pyr5, Glc5, et Mix5) et les complexes du xanthane (XA3, XA5, XB3, XC5) ne permet pas de conclure sur une seule ressemblance marquante entre les complexes Cu-Xanthane et les complexes Cu-références. En effet, seul le complexe XA3 (xanthane+Cu -à faible concentration- 140ppm à pH3.5) ressemble très fortement au spectre de l'acide pyruvique+Cu (Pyr5), et leurs fits sont également très proches (cf. lignes XA3 et Pyr5 du tableau 13.8, et fig. 13.15). Cette observation abonde dans le sens des observations expérimentales de [Bergmann et al. \(2008\)](#), et montre que les sites pyruviques sont les premiers sites occupés par le cuivre dans le xanthane : les sites pyruviques sont les sites "forts" d'adsorption du cuivre. Par contre, à plus haut pH (XA5) ou à plus haute concentration (XB3, XC5), il n'apparaît pas de similitudes flagrantes entre les spectres xanthane+Cu et les spectres des complexes modèles, on peut simplement dire que la composante Pyr5 est moins importante. Enfin, puisque nous ne possédons pas la connaissance du spectre du cuivre dans l'eau (les échantillons Cu3.6, Cu4.7 et Cu5.3 présentés à la section matériel & méthode n'ayant pu être passés au cours du run EXAFS faute de temps³), nous ne pouvons pas proposer d'étude de combinaisons linéaires entre cuivre aqueux+complexes modèles pour reconstruire les spectres des complexes xanthane+Cu.

TABLE 13.8 Résultats structuraux pour Cu^{2+} complexé par le xanthane et les ligands modèles, issus de l'analyse des données EXAFS.

	Atome	<i>N</i>	<i>R</i> (Å)	σ^2 (Å ²)	R-Factor
Pyr5	O	4	1.97	0.0055	0.014
	C	1.3	2.4	0.009*	
GlcA5	O	4	1.95	0.0055	0.017
	C	0.8	2.39	0.009*	
	C	2.5	2.84	0.009*	
Mix5	O	4	1.95	0.006	0.006
	C	1.7	2.35	0.009*	
	C	1.2	2.88	0.009*	
XA3	O	4.4	1.97	0.0054	0.005
	C	1.5	2.36	0.009*	
XA5	O	4*	1.96	0.0059	0.0098
	C	2.5	2.89	0.008*	
	O	1.8	3.08	0.008*	
XB3	O	4	1.93	0.0075	0.017
	C	1.3	2.37	0.009*	
	C	2.5	2.82	0.009*	
XC5	O	4*	1.94	0.0094	0.007
	C	1.1*	2.38	0.009*	
	C	1.9	2.92	0.009*	

N: Nombre d'atomes, *R*: distance interatomique, σ^2 : Facteur de Debye Waller, R-Factor: résidu entre fit et expérience.* Paramètre fixé.

3. Nous avons récupéré les données expérimentales de différents auteurs ayant travaillé sur le cuivre dans l'eau : Proux et Matynia, mais leurs données s'avèrent avoir été recueillies à température ambiante et non à -270K, ce qui interdit toute utilisation du spectre pour une combinaison linéaire et rend toute comparaison directe impossible.

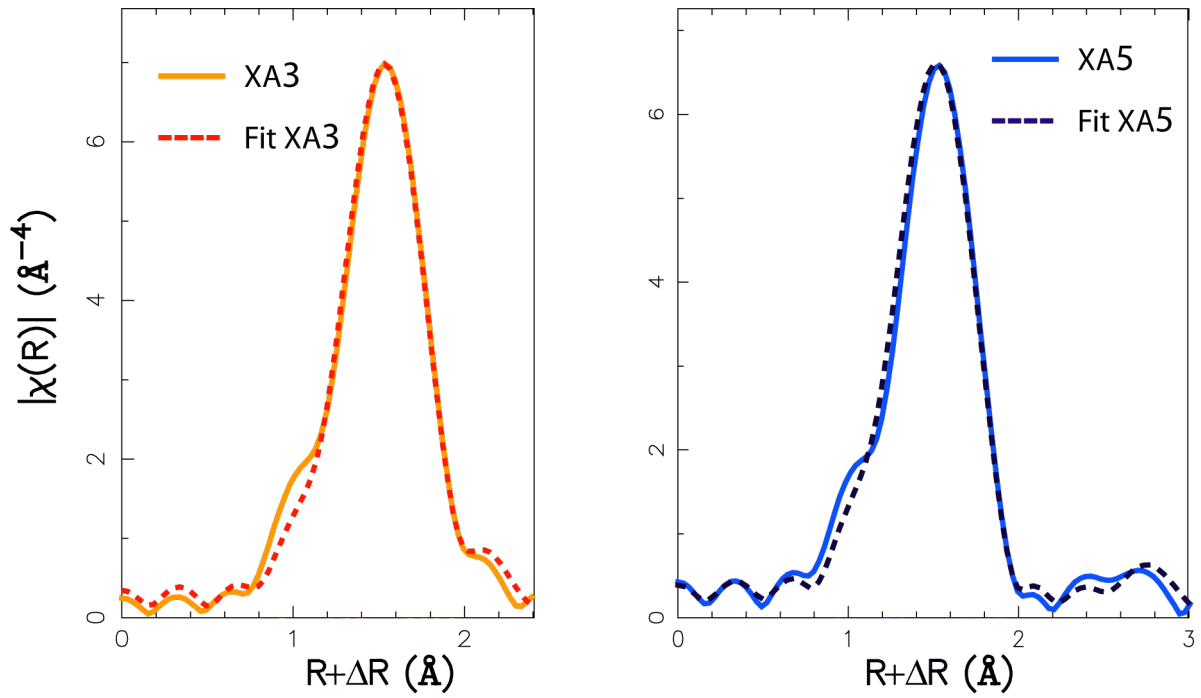


FIGURE 13.14 Transformée de Fourier et fits des spectres EXAFS des échantillons XA (xanthane+cuivre à 140ppm) aux pH3.5 et 5.5. Avec $\Delta R = -0.4 \text{ \AA}$.

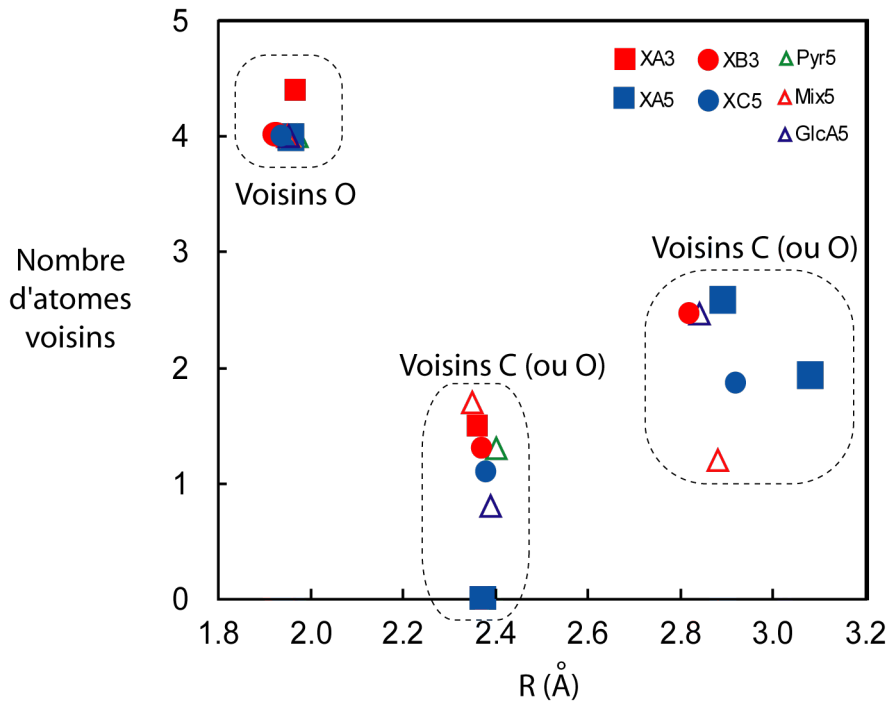


FIGURE 13.15 Résultats des fits sur les RDF-EXAFS.

La figure 13.15 propose une synthèse des résultats des fits des RDF-EXAFS. Si l'on s'intéresse particulièrement aux spectres obtenus **sur les complexes xanthane+Cu** à faible concentration en cuivre (XA3 et XA5, 140ppm) et à forte concentration en cuivre (XB3 et XC5, 1400ppm Cu), il apparaît clairement que :

1. Les atomes de cuivre dans les échantillons xanthane-Cu à pH5.5 ont un moins grand nombre de voisins carbone à $\approx 2.35 \text{ \AA}$ qu'à pH3 (cf. figure 13.15). Pour les spectres XA3 et XA5, on observe également un moins grand nombre de voisins oxygène à $\approx 1.96 \text{ \AA}$ à pH5.5 qu'à pH3.5.
2. La valeur du facteur de Debye-Waller est toujours plus importante pour la première couche à pH5.5 que pour la première couche à pH3.5 (cf. tableau 13.8), ce qui indique un plus grand désordre des complexes à pH5.5 qu'à pH3.5.

Ces deux résultats indiquent une meilleure complexation du cuivre à pH3.5 qu'à pH5.5. Ces différences d'amplitudes sont également clairement visibles sur les RDF-EXAFS (cf. figure 13.15).

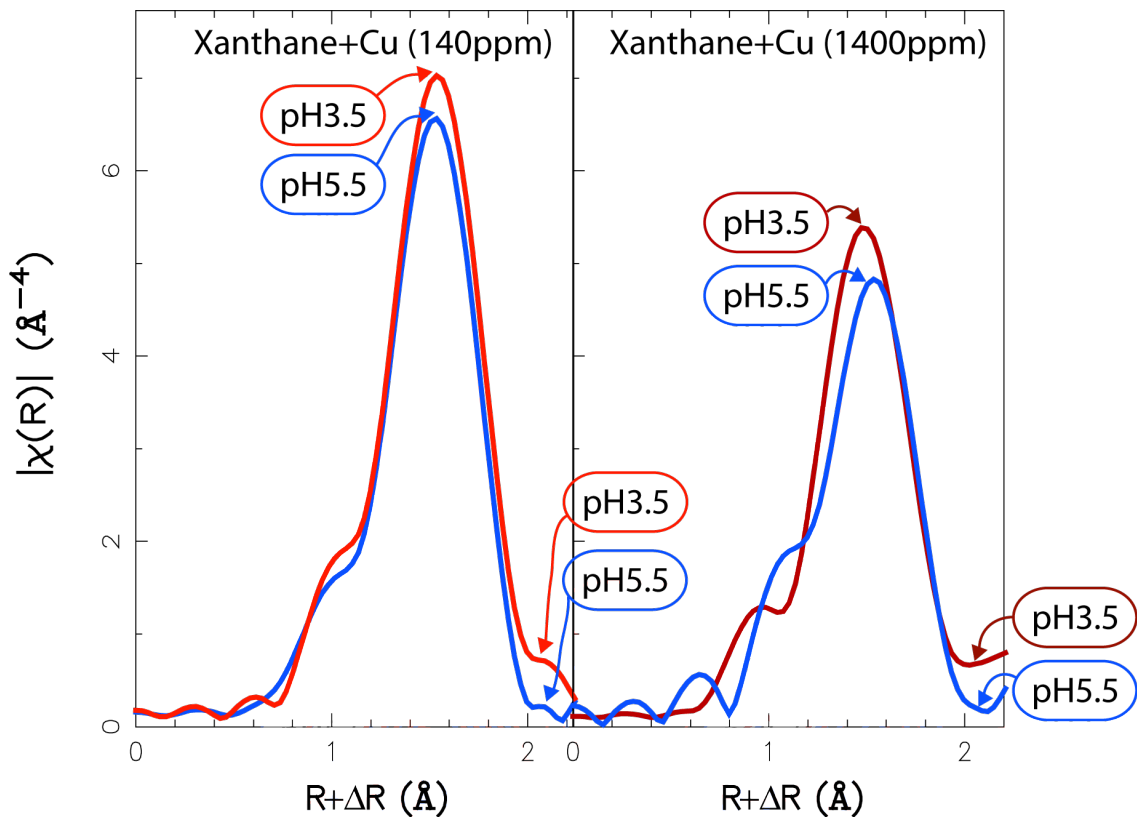


FIGURE 13.16 Comparaison des Transformées de Fourier des spectres EXAFS (RDF-EXAFS) des échantillons xanthane+cuivre (à 140ppm et 1400ppm) aux pH3.5 et 5.5. Les amplitudes des deux pics (à 1.97 et 2.35 Å) sont plus importantes à pH3.5 qu'à pH5.5. Avec $\Delta R = -0.4 \text{ \AA}$.

13.4.2 Ordre local du cuivre en modélisation moléculaire : RDF-MD

Cette section traite de la construction des RDF-MD théoriques par combinaisons linéaires des RDF théoriques Cu-Ligands.

Le principe de sommation expliqué à la section 12.2.2 (cf. équation 12.17) est rappelé ci-après à la figure 13.17 (copie de la figure 12.24). La méthode a été appliquée en prenant en compte l'occurrence de chaque site dans chaque conformation explorée : cf. tableau 13.9 (copie du tableau 13.5), et en prenant en compte les RDF-Cu-Ligand_{solo} des sites Cu-Libre, P, G, PG (cf. figure 12.21) et la RDF-Cu-Ligand_{dans Xanthane} du site PG_{intra} (cf. figure 12.23). Le calcul permet d'obtenir les RDF-MD, qui sont les reconstructions des RDF-EXAFS du cuivre dans les différentes conformations étudiées en modélisation moléculaire (cf. figure 13.18).

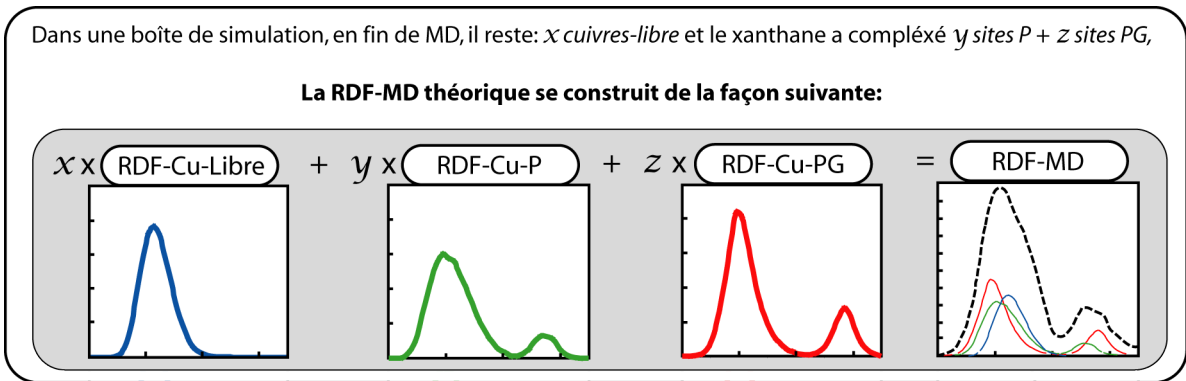


FIGURE 13.17 Rappel : Principe de calcul d'une RDF-MD théorique, par combinaison linéaire des RDF-Cu-Ligand, où x , y et z sont les occurrences moyennes de chaque type de site complexant obtenu lors des scénarios en MD.

TABLE 13.9 Rappel : Nombre moyen de types de sites par conformation explorée pour 10 cuivre mis en solution initialement.

		Conformation			
		pH3	pH5.5	pH5.5	pH5.5
Type de site		COIL+KOIL	SIMPLE	ANTI	PARA
Nombre moyen de Cu _{ads} pour 10 cuivres en solution	Libre	0.67	1.50	1.25	1.75
	Simple (P et G)	6.67	6.00	7.75	7.00
	Intra (PGintra)	0.00	1.50	1.00	0.75
	Chelatat extra (PG, PP, GG, PGG, PAc)	2.67	1.00	0.00	0.50

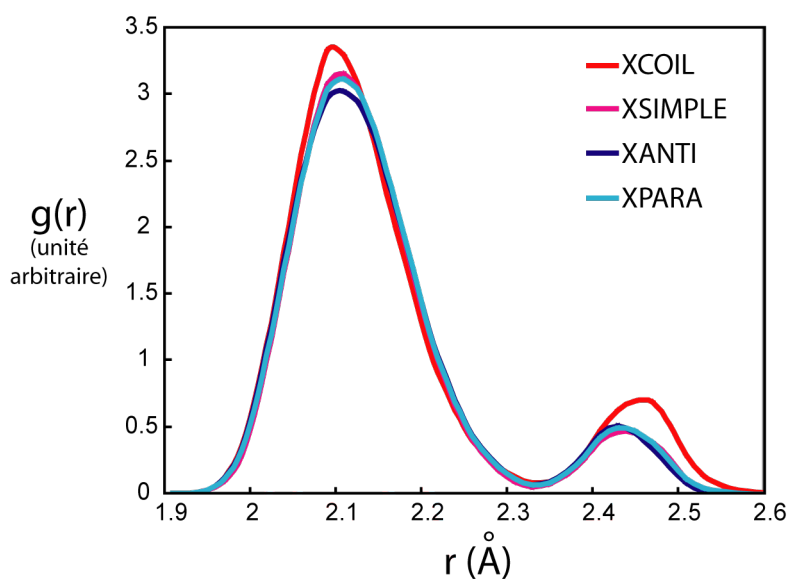


FIGURE 13.18 Construction des RDF-MD théoriques du xanthane pour les conformations XCOIL/XKOIL, XSIMPLE, XANTI et XPARA.

Finalement, en considérant arbitrairement que le xanthane à pH5.5 est constitué d'une proportion égale d'hélices simples, double parallèles et antiparallèles et que le xanthane à pH3 est formé majoritairement de coil, nous pouvons tracer les simulations de la première couche EXAFS du Cuivre dans le xanthane en fonction du pH (cf. figure 13.19) :

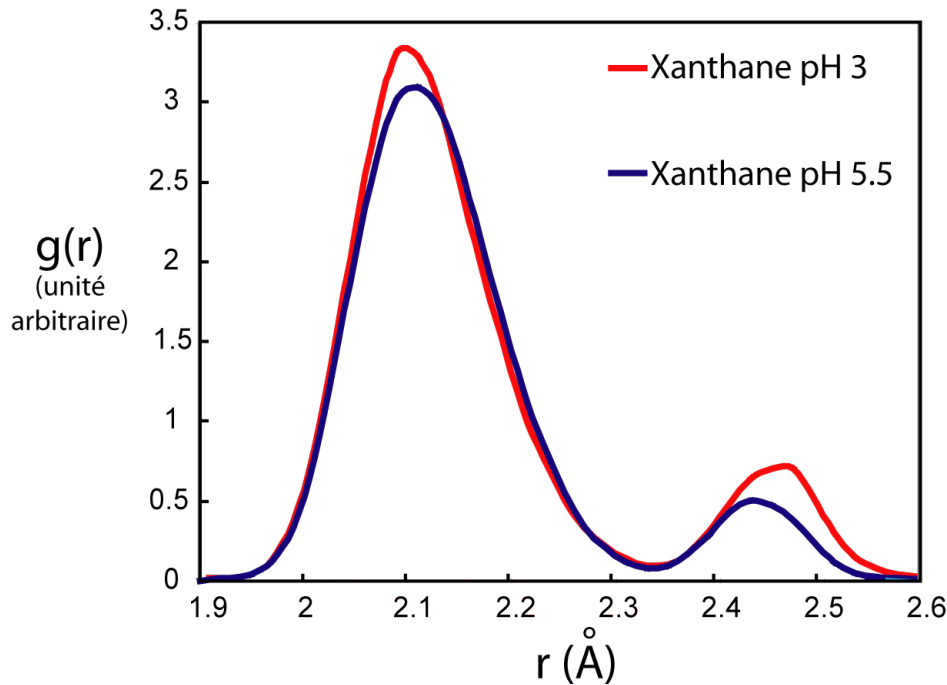


FIGURE 13.19 *RDF-MD théoriques du xanthane à pH3 et pH5.5.*

Nos résultats de modélisation moléculaire montrent différents points caractéristiques pour la TF de l'EXAFS du Cuivre (limitée aux premiers voisins) :

- La **RDF a pH3 présente des pics plus intenses que la RDF à pH5.5**. L'écart Δr entre les pics est de **0.32 Å** (à pH5.5) à **0.36 Å** (à pH3).
- Le pic de l'oxygène de la RDF à pH 3 est légèrement décalé vers la gauche (distance plus courte) que le pic de l'oxygène de la RDF à pH5.5.
- Le pic du carbone de la RDF à pH 3 est légèrement décalé vers la droite (distance plus longue) que le pic du carbone de la RDF à pH5.5.

Ces caractéristiques sont dues au fait que les conformations à pH3 comportent plus de sites chélatants et moins de sites Cuivre-Libre que les conformations à pH5.5.

Chapitre 14

Discussion : comparaison des résultats expérimentaux avec les résultats de modélisation moléculaire

14.1 Comparaison des expériences de titrages avec la modélisation moléculaire

14.1.1 Définition de l'état d'équilibre

Nous avons vu que le calcul de l'énergie de complexation du cuivre par modélisation moléculaire donne les valeurs de stabilisation suivantes : $E_{\text{Cu-xanthane pH3}} = -522 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $E_{\text{Cu-xanthane pH5.5}} = -488 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Ces énergies de complexation sont par définition égales à l'énergie libre de complexation, notée ΔG° , représentant l'état d'équilibre en deux extrêmes : tous les cuivres sont à l'infini du xanthane (Etat infini) et tous les cuivres sont complexés au xanthane (Etat condensé) (cf. figure 14.1).

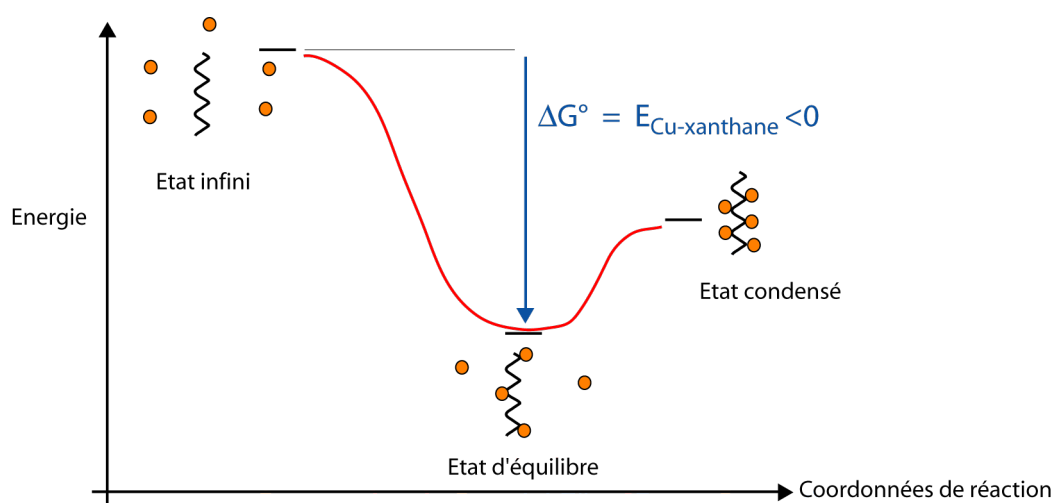


FIGURE 14.1 Définition de l'énergie libre de complexation.

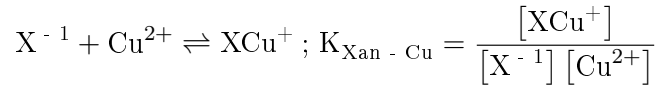
14.1.2 Comparaison des stabilisations énergétiques expérimentales (titrages) et modélisées (MD).

Nous pouvons calculer le gain d'énergie ω_{Model} du à la meilleure complexation à pH3 qu'à pH5.5 d'après les résultats de modélisation moléculaire (cf. Eq 14.1) :

$$\omega_{\text{Model}} = \frac{\Delta G_{\text{Model pH3}}^0}{\Delta G_{\text{Model pH5.5}}^0} = \frac{E_{\text{Cu-xanthane pH3}}}{E_{\text{Cu-xanthane pH5.5}}} = \frac{-522\text{kcal/mol}}{-488\text{kcal/mol}} = 1.07 \quad (14.1)$$

Le gain d'énergie modélisé est donc de 7% entre l'état complexé à pH5.5 et complexé à pH3.

D'autre part, nos données expérimentales nous ont permis de calculer les constantes de complexation K du cuivre par le xanthane à pH3.5 et pH5.5.



Nous rappelons les valeurs expérimentales de $\text{Log}K_{\text{Cu-xanthane pH3.5}}=3$ et $\text{Log}K_{\text{Cu-xanthane pH5.5}}=2.6$. Les valeurs des énergies libres de complexation associées peuvent être calculées à 298K par la théorie :

$$\Delta G_{\text{exp pH3.5}}^0 = -\text{Log}K_{\text{Cu-xanthane pH3.5}} * 2.3 * R * T = -17096 \text{ J.mol}^{-1} = -4.085 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

$$\Delta G_{\text{exp pH5.5}}^0 = -\text{Log}K_{\text{Cu-xanthane pH5.5}} * 2.3 * R * T = -14817 \text{ J.mol}^{-1} = -3.540 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Nous pouvons calculer le gain d'énergie ω_{Exp} du à la meilleure complexation à pH3.5 qu'à pH5.5 d'après les résultats expérimentaux (cf. Eq 14.2) :

$$\omega_{\text{Model}} = \frac{\Delta G_{\text{Exp pH3.5}}^0}{\Delta G_{\text{Exp pH5.5}}^0} = \frac{-17096\text{J/mol}}{-14817\text{J/mol}} = \frac{-4.085\text{kcal/mol}}{-3.540\text{kcal/mol}} = 1.15 \quad (14.2)$$

Le gain d'énergie expérimental est donc de 15% entre l'état complexé à pH5.5 et complexé à pH3.5.

D'un point de vue théorique, il peut apparaître plus rigoureux de définir le gain d'énergie Ω à pH3/3.5 par rapport à pH5.5 comme une différence (et non comme un rapport). Le raisonnement est le même que précédemment, il vient :

$$\Omega_{\text{Model}} = \Delta G_{\text{Model pH3}}^0 - \Delta G_{\text{Model pH5.5}}^0 = -552 - (-488) \text{ [kcal/mol]} = -64 \text{ [kcal/mol]} \quad (14.3)$$

$$\Omega_{\text{Exp}} = \Delta G_{\text{Exp pH3.5}}^0 - \Delta G_{\text{Model pH5.5}}^0 = -4.085 - (-3.540) \text{ [kcal/mol]} = -0.54 \text{ [kcal/mol]} \quad (14.4)$$

Il est logique d'obtenir des valeurs de $\Delta G_{\text{Model}}^0$ différentes de ΔG_{Exp}^0 , puisque notre modélisation moléculaire était limitée en solvation. Nous ne prenons donc pas en compte l'énergie libre de solvation du xanthane (et du cuivre) dans nos simulations modélisées alors que ces énergies de solvations sont prises en compte dans les résultats expérimentaux. L'écart important entre Ω_{Model} et Ω_{Exp} se justifie de deux manières : une partie de cette écart doit être due à une paramétrisation limitée du champ de force utilisé, l'autre partie de cette écart n'est autre que la valeur de $\Delta G_{\text{solvation}}^0$ du Cuivre + $\Delta G_{\text{solvation}}^0$ du xanthane.

Par contre, il est tout à fait remarquable de trouver des valeurs de ω_{Exp} et ω_{Model} du même ordre de grandeur. Expérimentalement le gain d'énergie à pH3.5 par rapport au pH5.5 est de 15%,

et dans notre modélisation il est de 7% entre le pH3 et le pH5. Il est très probable que cette augmentation lors de la modélisation soit supérieure à 7% si on comparait le pH3.5 et le pH5.5 au lieu du pH3 au pH5.5 comme nous l'avons fait car à pH3.5, on aura toujours un coil et presque autant de sites déprotonés qu'à pH 5.5, mais nous rappelons que nous avons démontré par la modélisation, que la conformation coil (souple) peut compenser un moins grand nombre de site déprotonés pour mieux complexer le cuivre qu'une hélice rigide totalement déprotonée. En définitive, la modélisation moléculaire apporte une explication très satisfaisante à l'observation expérimentale : la meilleure complexation du cuivre par le xanthane à pH acide par rapport au pH neutre peut s'expliquer par un changement de conformation coil (à pH3)/ hélice (à pH5.5) qui vient compenser une plus grande disponibilité des sites carboxylates à pH5.5.

14.2 Comparaison RDF-EXAFS expérimentales v.s. RDF-MD théoriques

14.2.1 Limites intrinsèques des comparaisons RDF-EXAFS v.s. RDF-MD

Intrinsèquement, les comparaisons entre les RDF-EXAFS expérimentales et les RDF-MD théoriques seront limitées par le fait que l'analyse fine des données de spectroscopie **EXAFS** implique l'utilisation des théories de la **mécanique quantique**, alors que la **modélisation moléculaire** utilise les principes de la **mécanique classique** newtonienne. Ainsi, le principal effet occulté dans nos simulations est l'effet Jahn-Teller. Rappelons brièvement que l'effet Jahn-Teller parfois également connu sous le nom de distorsion de Jahn-Teller, ou théorème de Jahn-Teller, décrit la déformation géométrique des molécules non linéaires sous certaines situations. Cet effet électronique, démontré grâce à la théorie des groupes, indique que les molécules dégénérées non linéaires ne peuvent pas être stables. Cela se traduit essentiellement par le fait que toute molécule non linéaire ayant un état fondamental électronique dégénéré subira une déformation géométrique qui enlève cette dégénérescence, car la déformation abaisse l'énergie globale du complexe. En particulier, les complexes hexacoordinés du Cuivre II dans l'eau sont connus pour illustrer cet effet. La figure 14.2 illustre l'effet Jahn-Teller sur le complexe $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (Cu-libre) :

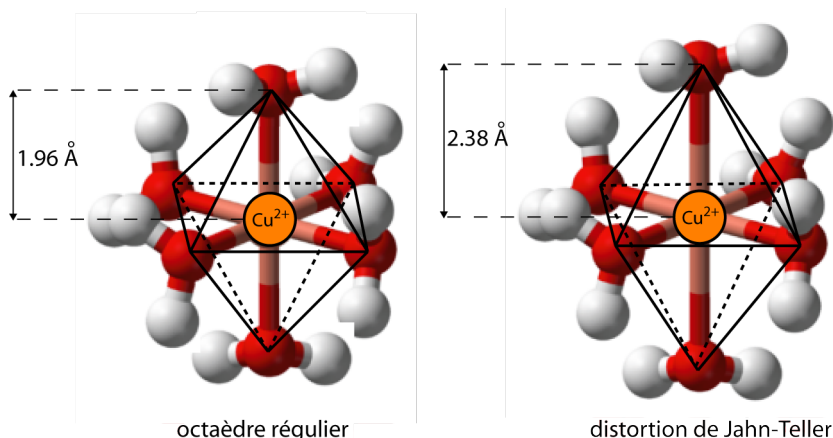


FIGURE 14.2 L'effet Jahn-Teller est responsable de la distorsion tétragonale de l'octaèdre du Cuivre II hexacoordonné dans l'eau ($\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$). Les distances équatoriales sont de l'ordre de 1.96 Å, alors que les distances axiales sont augmentées et oscillent autour de 2.38 Å.

Ainsi, l'effet Jahn-Teller génère sur les RDF-EXAFS expérimentales du Cu-Libre un pic d'oxygène centré à 1.96 Å mais également un pic (moins intense) à 2.38 Å dû à l'effet Jahn-Teller. Cet effet Jahn-Teller n'est pas observé pour les RDF-MD théoriques du Cu-Libre qui ne présentent qu'un seul pic d'oxygène (centré à 1.96 Å).

La non prise en compte de l'effet Jahn-Teller dans les simulations permet de proposer deux nouvelles interprétations issus de la comparaison des données :

- L'effet Jahn-Teller peut expliquer des pics plus étroits dans les simulations (RDF-MD) par rapport aux expériences (RDF-EXAFS), puisque l'effet Jahn-Teller entraîne une plus grande distribution des distances des atomes d'oxygène autour du cuivre (cf. figure 14.3).
- Le deuxième pic entre 2.3 et 2.5 Å est uniquement dû aux contributions des premiers voisins carbones dans les RDF-MD théoriques, alors que dans les RDF-EXAFS expérimentales il est généré d'une part par ces premiers voisins carbone mais également par l'effet Jahn-Teller sur les atomes d'oxygènes axiaux du complexe.

Remarque : Dans la suite du document, les pics des RDF situés entre 2.3 et 2.5 Å seront toujours appelés "pic de carbone", même si ils peuvent être générés par des atomes de carbone proprement dit et des atomes d'oxygène axiaux par effet Jahn-Teller, puisqu'ils ont été dénommés ainsi dans l'ensemble du document.

14.2.2 Limites méthodologiques des comparaisons RDF-EXAFS v.s. RDF-MD.

L'outil de calcul des RDF sous Cerius², permettant d'obtenir les RDF-MD, n'intègre pas les termes de déphasage et fonction d'amplitude (décroissante selon la distance au cuivre) impactant le signal expérimental des RDF-EXAFS (cf. Eq 12.16 pour le détail de ces termes). Les pics de carbone (i.e. les pics simulés les plus lointains) auront donc une amplitude surévaluée dans les RDF-MD.

L'amplitude d'un signal EXAFS expérimental est connue pour être fortement affectée par le désordre thermique. Dans la méthode de calcul proposée (cf. section 12.2.2.2 et 12.2.2.3), le désordre thermique est pris en compte par l'intégration des 4000 conformations calculées pendant 1 nanoseconde, afin d'assumer que notre modèle représente bien toutes les conformations structurales du cuivre existant dans les complexes Cu-Xanthane expérimentaux. Nos simulations numériques ont été réalisées à 300K (afin de se placer à la même température que les titrages), alors que les spectres expérimentaux d'EXAFS ont été enregistrés à 10K. Il s'agit ici d'un problème de calage de modèle : les 300K de la modélisation moléculaire ne correspondent pas aux 10K réels expérimentaux. Puisque nous n'avons pas cherché à caler notre modèle en température (cela aurait nécessité plusieurs jeux de simulations numériques à des températures différentes, e.g. relancer les dernières dynamiques MD-final à 50K, 200K...), l'effet de l'agitation thermique sur la largeur des pics n'est pris en compte que de façon qualitative.

Ainsi, nous proposons simplement une comparaison qualitative de l'évolution des RDF-MD théoriques et RDF-EXAFS expérimentales (évolution des amplitudes des pics et des distances (r_{\max}) en fonction du pH). Dans le temps limité de notre étude, les comparaisons quantitatives par simulation de spectre EXAFS à partir des données modélisées (e.g. avec le logiciel FEFF) n'ont pas pu être réalisées.

14.2.3 Comparaisons RDF-EXAFS expérimentales v.s. RDF-MD théoriques.

Afin de pouvoir comparer directement les distances des résultats expérimentaux d'EXAFS et les simulations RDF obtenues en modélisation moléculaire, nous avons retranscrit les données en distances réelles (R en Å), par la méthode décrite à la section 12.2.3 "Comparaison des distances en Modélisation Moléculaire et spectroscopie EXAFS". La figure 14.3 présente la comparaison des résultats expérimentaux des TF d'EXAFS et des résultats de Modélisation Moléculaire des RDF simulant cette première couche EXAFS.

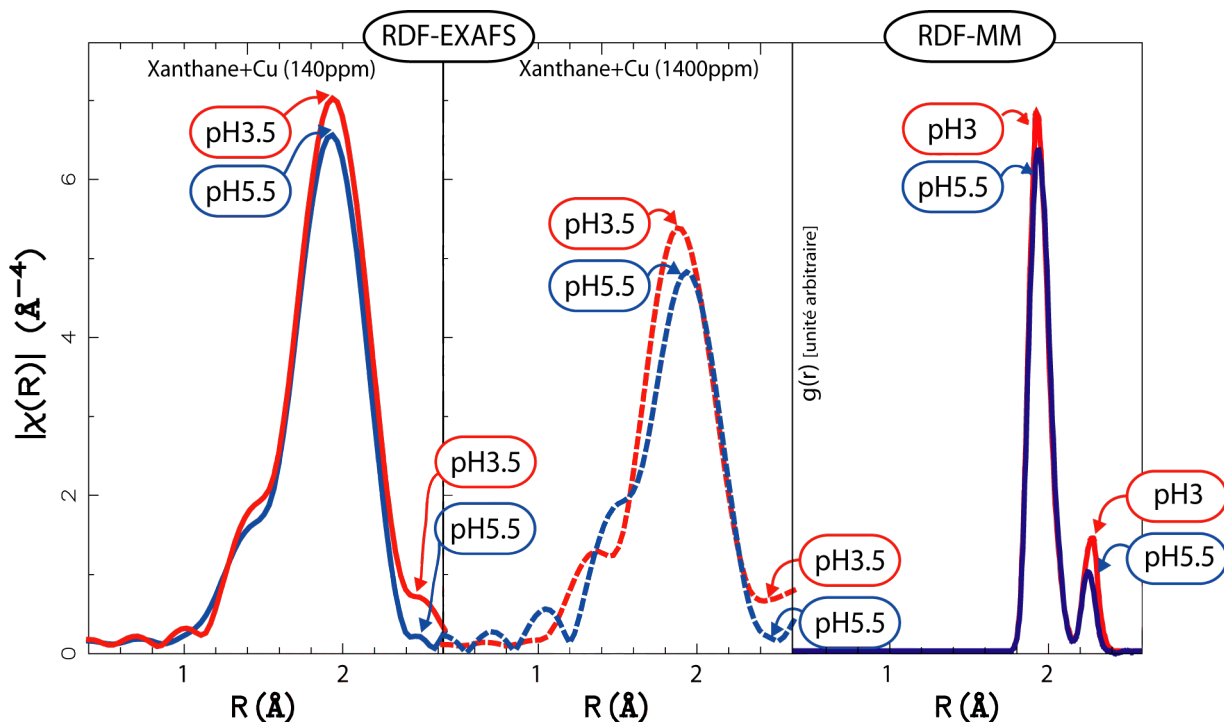


FIGURE 14.3 Comparaison des RDF-EXAFS expérimentales et des RDF-MD théoriques sur les systèmes Xanthane+Cu à pH3 et pH5. Les pics de l'oxygène et du carbone sont plus intenses à pH3/3.5 qu'à pH5.5 pour les systèmes expérimentaux comme pour les systèmes modélisés.

Les similitudes RDF-EXAFS v.s. RDF-MD :

- Les différences d'amplitudes observées expérimentalement entre les expériences à pH3 et celles à pH5 sont respectées : **Les deux pics** (celui de l'oxygène centré vers 1.96 Å et celui du carbone centré entre 2.35 et 2.45 Å) **sont plus intenses à pH3/3.5 qu'à pH5.5.**
- Les différences d'amplitudes $\frac{\text{Amplitude pic O à pH3/3.5}}{\text{Amplitude pic O à pH5.5}} \approx 90\%$ sont du même ordre de grandeur pour les RDF-EXAFS que pour les RDF-MD.

Les différences RDF-EXAFS v.s. RDF-MD :

- L'écart δR entre le pic O et le pic C vaut $\delta R_{\text{exp}}=0.40$ à 0.44 Å entre les deux pics pour les données expérimentales, et il est seulement de $\delta R_{\text{model}}=0.32$ à 0.36 Å pour les données modélisées, soit une différence d'environ 15% entre δR_{exp} et δR_{model} . Ainsi, la méthode proposée pour reconstruire les premières couches EXAFS reste encore limitée quantitativement, en particulier, un travail sur un affinage de la paramétrisation du champ de force utilisé devrait être réalisé dans l'optique de simuler des premières couches EXAFS par RDF quantitative.
- Les pics des RDF-MD sont plus étroits que les pics des RDF-EXAFS. Nous avons vu que cela peut s'expliquer d'une part par la non-prise en compte de l'effet Jahn-Teller en modélisation moléculaire, d'autre part les paramètres décrivant le désordre thermique dans sous Cerius² ont été utilisés par défaut, et n'ont donc pas été ajustés.
- L'amplitude des pics de carbone dans les RDF-MD est surévaluée car la modélisation moléculaire ne prend pas en compte la décroissance rapide du signal expérimental plus on s'éloigne du cuivre central considéré.

Avantages et inconvénients de la méthode proposée :

Toutefois, même si la modélisation moléculaire ne donne pas de résultats quantitatifs, il est important de souligner que notre méthode de reconstruction des TF expérimentales d'EXAFS donne d'une part une vision très pratique d'une première couche de coordination en comparant le signal EXAFS expérimental avec les structures moléculaires des complexes du cuivre formés dans le xanthane ; d'autre part, **la grande tendance observée en EXAFS (une moindre intensité des deux pics d'O et de C à pH5.5 par rapport au pH3/3.5) se retrouve qualitativement par RDF en modélisation moléculaire**, suggérant que la complexation du cuivre est meilleure à pH5.5 qu'à pH3/3.5. De plus, la modélisation moléculaire apporte un élément supplémentaire d'interprétation, en suggérant qu'**une plus grande intensité des pics d'O et de C correspond à un cuivre mieux complexé par des contributions en groupement COO⁻** (ces contributions augmentant le pic d'O et le pic de C). Cette approche modèle donne un nouvel éclairage aux résultats expérimentaux d'EXAFS. Cependant, la méthode de modélisation des TF EXAFS par RDF reste assez lourde, puisque l'on cherche à traduire un signal moyen, il est nécessaire de produire un grand nombre de simulations en MD afin de pouvoir générer des RDF ayant une valeur statistique (i.e. une bonne représentation des distances moyennes dans l'état d'équilibre en MD).

L'amélioration de la méthode de reconstruction des TF EXAFS reste également limitée par des considérations plus générales : nous avons vu qu'il est impossible de travailler aux mêmes concentrations en titrages et en expériences EXAFS, car de faibles concentrations en cuivre ($<10^{-3}\text{M}$) ne donneront que des signaux bruités en EXAFS. Or, nos simulations numériques ont été effectuées à faible concentration totale en cuivre ($[\text{Cu}]_{\text{tot}} \approx 10^{-3}\text{M}$), et il conviendrait donc, pour être totalement rigoureux, d'appliquer la méthode de simulation des premières couches EXAFS par RDF sur des simulations ayant des concentrations plus importantes en cuivre (de l'ordre de celles utilisées en EXAFS i.e. $[\text{Cu}]_{\text{tot}} \approx 10^{-1}\text{M}$). Dans l'hypothèse où ces simulations numériques donneraient les mêmes résultats que les RDF déjà réalisées à basse concentration en cuivre, nous pourrions alors confirmer la conclusion déjà mentionnée (les pics de O et C sont plus intenses à pH3 qu'à pH5, traduisant une meilleure complexation du cuivre par le xanthane à pH acide). Cependant, on peut supposer que les types de sites observés à faible et forte concentration en cuivre restent les mêmes (c'est d'ailleurs ce que suggère la comparaison de nos résultats à la figure 14.3). Enfin, l'amélioration de la méthode devra chercher à traduire $g(r)$ (la densité de probabilité de trouver un atome à une distance r du cuivre central), donné par les RDF en unité arbitraire, en nombre de voisins. Cela pourra en particulier se faire par des études sur des complexes modèles simples en modélisation moléculaire, où le nombre de voisins est connu.

Perspectives

Il est clair que la méthode proposée, même en ajustant au mieux les paramètres du champ de force, ne pourra pas reconstruire quantitativement les RDF expérimentales par simulation, du fait des limites intrinsèques présentées ci-avant. En effet, une reconstruction quantitative devra prendre en compte les effets quantiques, négligés dans nos simulations. Une méthode de calcul quantique adaptée aux grands systèmes biologiques, sur lesquels les sites réactifs sont repérés, (dite méthode QM/MM pour "Quantum mecanic/Molecular mecanic") peut par exemple être l'utilisation d'ONIOM. Une perspective d'amélioration des simulations des RDF-EXAFS passe donc par l'introduction de calculs quantiques.

Remarque importante sur l'interprétation des pics des RDF

Comme nous l'avons déjà évoqué à la section 12.2.2.2 "Résultats préliminaires : calcul des RDF-Cu-Ligand_{solo}", il paraît important de rappeler que tous nos calculs de modélisation moléculaire ont été réalisés à partir de structures carboxylates conjuguées (cf. figure 14.4 **A**), connues pour être la forme dominante en solution (Vollhardt, 2004), alors que les structures solides avec localisation de la charge sur un seul oxygène du carboxylate (extraite des modèles cristallins de la Cambridge Structural Database -CSD-, cf. figure 14.4 **B**) sont souvent utilisées pour modéliser les données expérimentales d'EXAFS.

Si l'on se place dans l'hypothèse A où les structures des carboxylates sont conjuguées, on est dans l'hypothèse utilisée lors de l'interprétation de nos résultats EXAFS. Le premier pic vers 1.97 Å correspond aux premiers atomes voisins d'Oxygène, le second pic vers 2.4 Å au premier atome voisin de Carbone plus la contribution d'atomes d'Oxygène axiaux (par effet Jahn-Teller), le troisième pic et les suivants correspondent à des couches de coordination plus éloignées, où à de la diffusion multiple (cf. figure 14.4).

Si l'on se place dans l'hypothèse B où les structures des carboxylates portent la charge négative localisée sur un seul atome d'oxygène, nous sommes dans l'hypothèse d'une structure solide cristalline donnée par CSD. Le premier pic vers 1.97 Å correspond alors aux premiers atomes voisins d'Oxygène, le second pic vers 2.4 Å correspond exclusivement à la contribution d'atomes d'Oxygène axiaux (par effet Jahn-Teller), le troisième pic vers 2.8 Å et les pics suivants correspondent au premier atome voisin de Carbone et à l'atome d'Oxygène du carboxylate ne portant pas la charge négative, auquel il faut ajouté des contributions dues à la diffusion multiple (cf. figure 14.4).

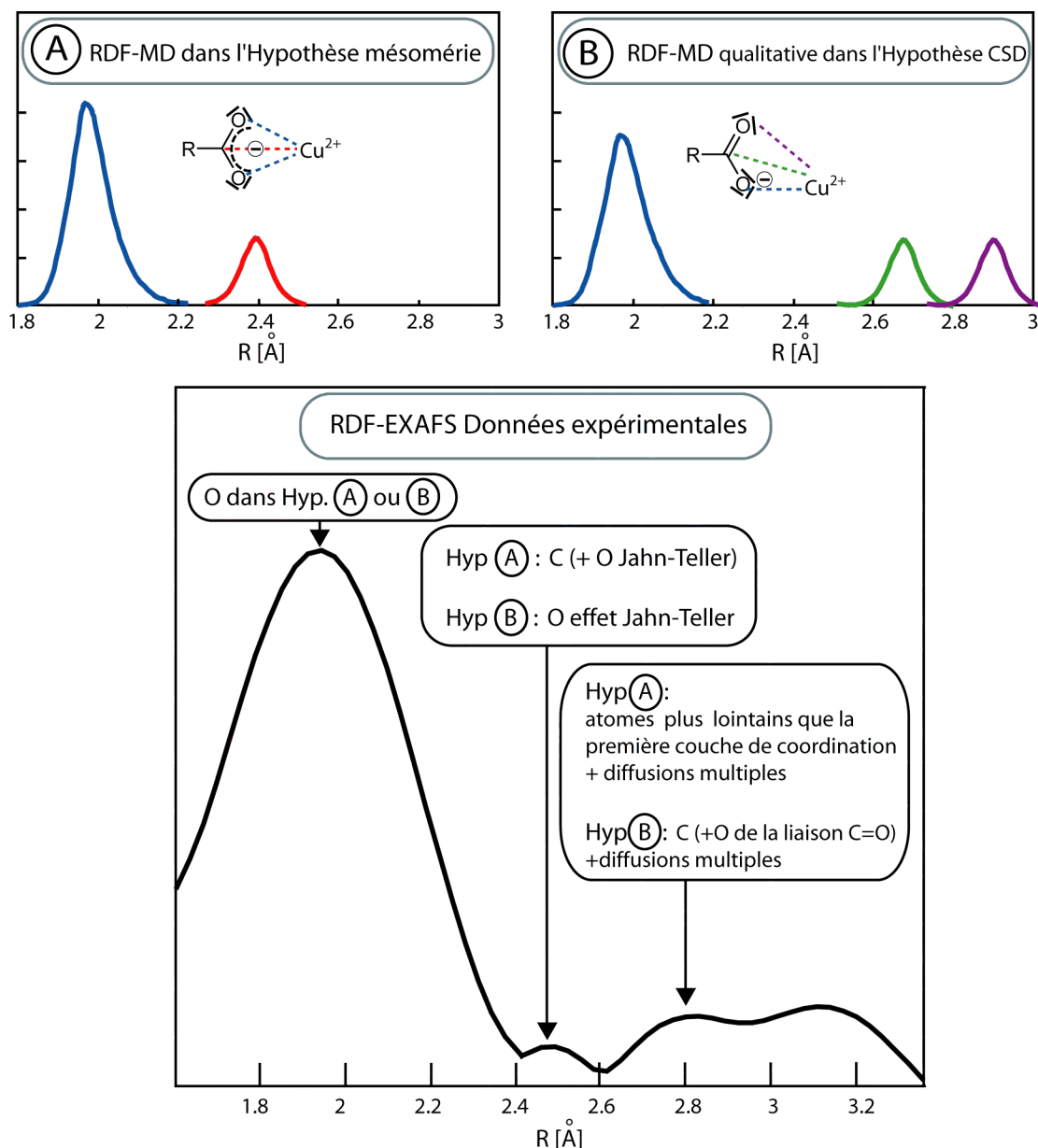


FIGURE 14.4 Les différentes interprétations possibles des pics des RDF-EXAFS en fonction de l'hypothèse structurale des carboxylates : conjugués (A) ou avec charge localisée (B).

La figure 14.4 met en évidence la nécessité d'éclaircir ce point d'interprétation sur les distances entre l'atome central métallique et ses plus proches voisins dans les RDF-EXAFS expérimentales et les RDF-MD théoriques. Cette étape, qui n'est pas triviale, devra passer par un dialogue entre spécialistes de la modélisation moléculaire et spécialistes de la spectroscopie EXAFS. Nous mettons en évidence que l'utilisation des modèles CSD, obtenus sur des solides, est critiquable lors de la modélisation de données obtenues sur des échantillons en solutions ou en pâtes amorphes.

14.3 Compréhension du système

Notre étude en modélisation moléculaire permet une bonne compréhension de notre système xanthane+Cu²⁺. Nous expliquons bien le fait que la complexation du cuivre soit plus importante à pH acide qu'à pH neutre par la formation de complexes chelatants inter-chaînes latérales plus nombreux à pH3/3.5 qu'à pH5.5. Nous avons montré que la formation de complexes chelatants inter-chaînes latérales très stabilisants (PG, PP et GG) détermine la stabilité globale du complexe xanthane+Cuivre. A pH5.5, ces complexes ont du mal à apparaître car les hélices rigides empêchent la rencontre de différentes chaînes latérales, tandis qu'à pH3/3.5 la structure souple des coils du xanthane permet plus facilement la formation de ces complexes inter-chaînes latérales. Ces effets de conformations compensent les effets thermodynamiques classiques du pH qui génère plus de sites potentiels de fixation du xanthane à pH5.5 qu'à pH3/3.5 où de nombreux sites acides sont encore protonés.

Cependant, n'oublions pas que notre étude de modélisation moléculaire est fondée sur une hypothèse forte : les coils prédominent à pH3/3.5, tandis que les hélices prédominent à pH5.5. Si cette hypothèse permet d'expliquer nos résultats expérimentaux, il n'est pas garanti que ce soit exactement ce changement conformationnel qui s'opère *in situ* puisque les indices expérimentaux de dichroïsmes circulaires traduisent un changement de conformation pH dépendant sans nous préciser sa nature. Nous pouvons tout à fait imaginer que le changement conformationnel opérant ces changements de capacité d'adsorption du cuivre soit un phénomène d'agrégation à pH acide (déjà discuté au chapitre 9 "Discussion") (Capron et al., 1998; Norton et al., 1984; Righetti et al., 1978). Mais quelle que soit la nature du changement conformationnel observé, les hypothèses émises ((i) plus de portions coils à pH acide, (ii) des hélices plus souples à pH acide, (iii) des agrégations d'hélices à pH acide) vont dans le même sens : elles expliquent toutes les deux bien la possibilité de complexes chelatants sur le cuivre entre différents groupements d'une même chaîne (hélice souple ou coil se repliant sur elle-même) ou de chaînes voisines (agrégation d'hélice). La première hypothèse (coils à pH acide) a été vérifiée par modélisation moléculaire (boîte de MD nommées XCOIL). Pour être exhaustif, notre travail pourrait proposer l'étude de l'autre hypothèse (agrégation à pH acide) par l'étude d'une conformation supplémentaire à pH3 constituée d'hélices simples parallèles distantes de quelques dizaines d'Angströms initialement, et convergeant vers une agrégation au cours de la MD (scénario nommé XAGREG). Intuitivement, une telle configuration devrait former de nombreux complexes chelatants de type PP et PG entre les chaînes agrégées, et donc, les résultats attendus pour les simulations XAGREG (non réalisées) semblent contenus dans les résultats déjà calculés sur les conformations XCOIL.

Quatrième partie

Conclusion générale

Chapitre 15

Synthèse des principaux résultats

L'objectif du présent travail de thèse était d'étudier les mécanismes mis en jeu lors de la complexation des métaux lourds par les substrats d'origine bactérienne, situés dans les couches superficielles du sol. La compréhension et la connaissance de ces mécanismes est essentielle pour améliorer les modèles prédictifs de transfert de polluants dans les sols, en particulier en ce qui concerne la phase colloïdale biologique. Les précédentes contributions scientifiques ayant mis en évidence l'implication des exopolysaccharides (EPS) bactériens des sols dans la complexation des éléments trace métalliques (ETM) (Guine et al., 2007, 2006; Muris, 2004), notre travail s'est inscrit dans cette continuité, et à cherché à établir la part des ETM complexée par les EPS en solution par l'étude d'un système modèle : Xanthane+Cuivre.

L'étude potentiométrique des complexes Cu-xanthane a permis dans un premier temps de calculer les constantes d'acidité du xanthane, et a mis en évidence l'effet de la force ionique (FI) sur les valeurs des constantes apparentes d'acidité. Cet effet de FI a pu être pris en compte par l'adaptation d'un modèle à capacité constante décrit par le cylindre englobant les hélices du xanthane. Dans un deuxième temps, les études complexométriques sur le cuivre par titrage et isothermes d'adsorption ont mis en évidence un comportement original du xanthane : le polysaccharide adsorbe plus de cuivre à pH3.5 qu'à pH5.5. Les valeurs des constantes apparentes de complexation du cuivre par le xanthane sont respectivement à pH3.5 et 5.5 : $\text{Log}K_{\text{Cu-XanpH3.5}}=3$ et $\text{Log}K_{\text{Cu-XanpH5.5}}=2.6$. Une étude bibliographique, couplée à des expériences de dichroïsme circulaire suggère que ce changement de comportement dans la capacité d'adsorption du cuivre est du à un changement conformationnel pH dépendant du polysaccharide. L'hypothèse est alors une conformation ordonnée en hélices rigides à pH5.5 défavorisant la formation de complexes chelatants très stabilisants entre différentes chaînes latérales, tandis qu'à pH3 une structure désordonnée, en coils ou en agrégats d'hélices parallèles, favorise la formation de ces complexes chelatants inter-chaînes latérales.

L'étude en modélisation moléculaire a ensuite eu pour objectif de vérifier l'hypothèse qu'un changement de conformation pH dépendant pouvait expliquer la plus grande capacité du xanthane à complexer le cuivre à pH3 qu'à pH5.5. Les résultats des MD sur différentes conformations désordonnées à pH3 (COIL, KOIL) et ordonnées en hélices simples ou doubles à pH5.5 (SIMPLE, ANTI, PARA) ont permis de valider l'hypothèse émise. Les conformations désordonnées à pH3 sont plus favorables à la complexation du cuivre que les conformations ordonnées à pH5.5, tant en quantité de cuivre adsorbé (il reste plus de cuivres libres dans les systèmes à pH5.5 que dans les systèmes à pH3), qu'en énergie de stabilisation ($E_{\text{Cu-xanthane pH3}} = -522 \text{ kcal.mol}^{-1} < E_{\text{Cu-xanthane pH5.5}} = -488 \text{ kcal.mol}^{-1} < 0$) et en terme de signal EXAFS simulé. Les énergies de stabilisation des complexes Cu-xanthane à pH3 et pH5.5 varient dans le même sens pour les systèmes modélisés (+7%) que pour les systèmes expérimentaux (+15%), mais la non prise en compte de la solvatation totale du xanthane lors de

nos simulations numériques interdit toute comparaison directe entre les valeurs des énergies des systèmes modélisés et celles des systèmes expérimentaux. En terme de spectroscopie EXAFS, la méthode développée permet une reconstruction qualitative des TF des spectres EXAFS expérimentaux du xanthane en fonction du pH, mais ne permet pas une comparaison quantitative. Finalement, l'étude en modélisation moléculaire permet d'expliquer l'augmentation de la capacité du xanthane à complexer le cuivre à bas pH. La modélisation permet de quantifier le nombre et le type de site (chélatant ou simple) impliqués dans la complexation du cuivre par le xanthane. Il apparaît qu'à pH3, les coils, qui sont des structures souples, favorisent la formation de sites chélatants inter-chaînes latérale, tandis qu'à pH5.5, bien que plus de sites potentiellement complexants soient disponibles, les structures rigides en hélice défavorisent l'apparition des complexes chélatants. Il en résulte, pour le xanthane, une moins bonne capacité globale à complexer le cuivre à pH5.5 qu'à pH3. La figure 15.1 propose une synthèse de ces principaux résultats

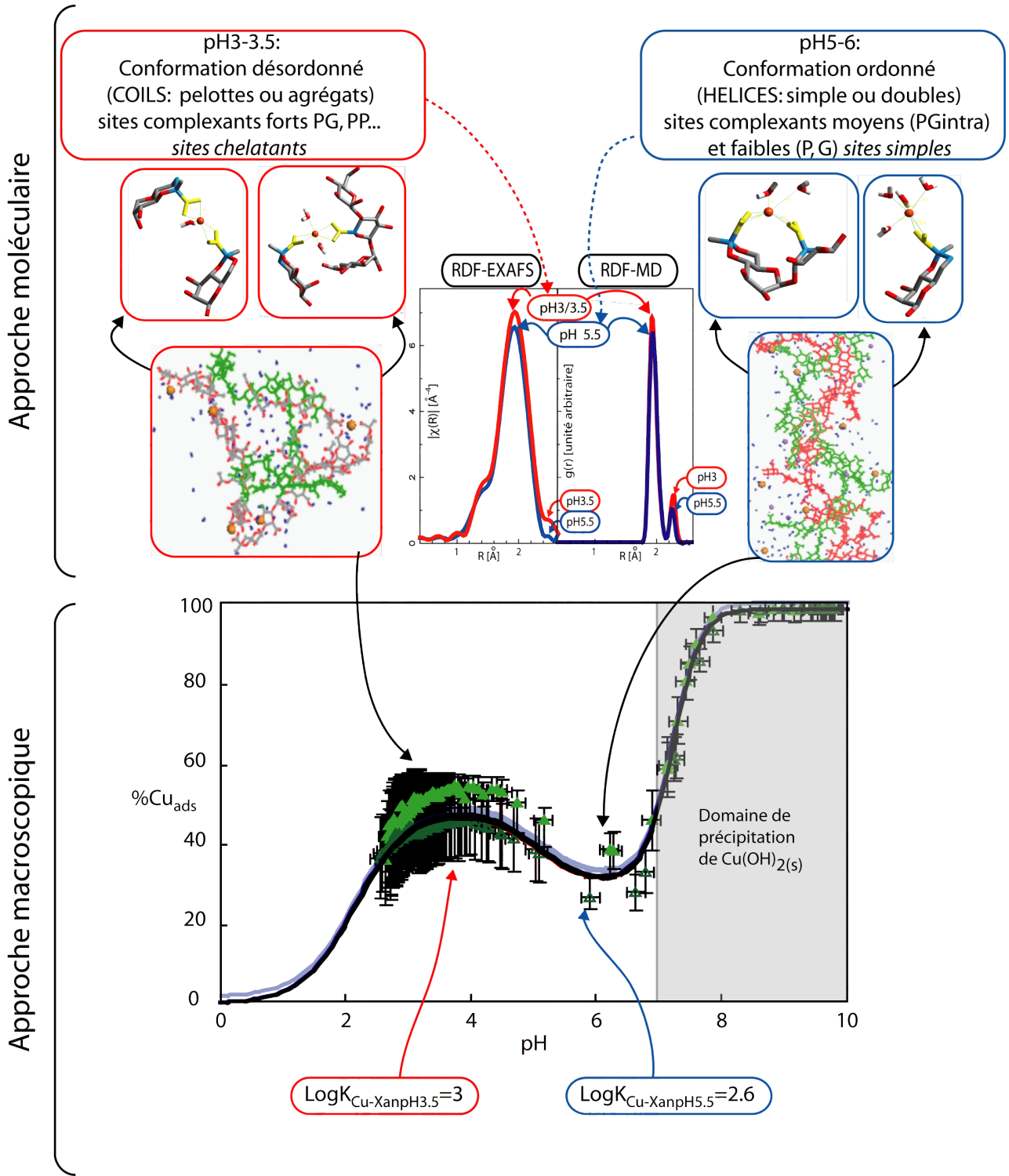


FIGURE 15.1 Synthèse des principaux résultats de titrage, de modélisation moléculaire et de spectroscopie EXAFS du xanthane en présence de cuivre, en fonction du pH. L'approche macroscopique a été menée, entre autre, par des titrages du xanthane en présence de cuivre. L'adsorption du cuivre est plus forte à pH3.5 qu'à pH5.5 (cf. triangles verts). Ce comportement original est du à un changement conformationnel du xanthane en fonction du pH. Les calculs de spéciations avec prise en compte d'un changement d'état pH-dépendant du xanthane permettent de modéliser les données (cf. lignes noires). L'approche en modélisation moléculaire, basée sur les deux états du xanthane (coil désordonné à pH3 et hélices ordonnées à pH5.5), met en évidence l'apparition de sites complexant forts à pH3 (sites chelatants, comme le Pyruvate-Cu-Glucuronate dit PG), et de sites plus faibles à pH5.5 (sites chelatants moyen PGintra, sites simples pyruviques P et glucuroniques G). L'approche moléculaire est complétée par l'acquisition des Fonctions de Distribution Radiales du cuivre (RDF) : RDF-EXAFS expérimentales, qui sont comparées aux RDF-MD théoriques. Qualitativement, les deux types de RDF présentent les deux premiers atomes voisins à des distances similaires, et une évolution semblable de l'amplitude de ces deux premiers pics (amplitude plus forte à pH3/3.5 qu'à pH5.5).

Chapitre 16

Conclusion et Perspectives

Ce travail s'inscrit dans un cadre d'investigation à échelles multiples de compréhension du piégeage d'un métal par un composé bactérien modèle, le Xanthane. Les conclusions qu'on peut en tirer, ainsi que les perspectives pour de futurs travaux se situent naturellement à différentes échelles.

16.1 A l'échelle moléculaire...

Nous avons mis en évidence un processus de complexation en désaccord avec la vision conventionnelle de la dépendance de la force de liaison avec le pH. Il est clair que dans le système étudié le cuivre est plus fortement fixé à pH3.5 qu'à pH 5.5. Ce résultat n'est pas compréhensible sans une étude détaillée des structures en présence. Il fait appel à la nécessité de comprendre les processus à l'échelle moléculaire, car les observations macroscopiques elles-mêmes ne suivent pas toutes forcément des schémas thermodynamiques simples.

Le travail présenté réussit à modéliser une structure complexe et compare des résultats expérimentaux de plusieurs types en arrivant à les mettre en relation avec le modèle moléculaire construit : ceci est un résultat intéressant en soi. Cependant, à l'échelle du modèle moléculaire proprement dit, certains points mériteraient d'être investigués plus en détail. En particulier, l'effet Jahn-Teller, décrivant les distorsions de l'octaèdre de coordination du cuivre dans la réalité (phénomène d'origine quantique) n'est absolument pas pris en compte dans la modélisation moléculaire (utilisant des calculs de mécanique classique). On peut donc s'attendre à ce qu'une modélisation couplée de type QM/MM ("Quantum Mecanic/Moléculaire Mecanic", e.g. avec le code ONIOM) reproduise mieux les distributions des distances expérimentales. D'autre part, dans le cadre d'une nouvelle étude prolongée, l'effet de l'agrégation du xanthane mériterait une attention particulière, tout en mettant en IJuvre des expériences titrimétriques couplées à de la modélisation - il s'agirait donc de démontrer qu'un scénario de dynamique sur une nouvelle conformation agrégée à pH3 (AGREG) conduirait à favoriser la création de complexes chelatants de type PG, PP et PG, c'est à dire des résultats similaires à ceux obtenus sur les conformations coils à pH3 (XCOIL et XKOIL).

Jusqu'à quel point ce résultat affecterait-il les prédictions dans des systèmes complexes ? Il va de soi, comme pour toute étude moléculaire, qu'un seul système parmi des milliers existants est étudié ici, et que les résultats ne sont pas généralisables sans observation détaillée sur plusieurs systèmes. Comment passer du modèle simple xanthane étudié à la généralisation sur l'ensemble de la MO du sol ? L'effet modélisé de complexation renforcée à pH3 ne se reproduira probablement pas lors de la modélisation d'un ensemble de différentes structures extraites d'une matrice d'un

sol. Ceci dit, la compilation de plusieurs études à l'échelle moléculaire est susceptible d'apporter des connaissances utiles à l'échelle macroscopique. Ainsi, cette étude met déjà en évidence une multitude de sites existants sur un seul substrat macromoléculaire plutôt simple. Généralement, on approche l'adsorption des métaux lourds dans les sols en considérant un nombre de sites à réactivité différente limitée, on voit ici qu'il faut plutôt considérer un continuum de réactivités différentes. Les approches thermodynamiques ne tiennent généralement pas assez compte de cet effet d'hétérogénéité des sites, visible à l'échelle moléculaire.

16.2 A l'échelle macroscopique...

Sur un autre plan, ce travail met en évidence que la complexation des métaux dans les systèmes environnementaux permet, par le simple fait de l'existence des macromolécules, de générer des complexes chélatants stabilisants. On comprend ainsi mieux pourquoi les métaux retenus sur la matière organique des sols (considérée ici comme comparable aux EPS en terme de stabilité des liaisons chimiques) ont des forces de liaison élevées "de type chélatant" tel que constaté par simple comparaison de constantes (cf. tableau 4.3, et [Guine et al. \(2007\)](#)). Ce travail montre que les complexes simples sont moins stables que les complexes chélatants obtenus par repliement des macromolécules.

Une étude détaillée sur une structure particulière pose toujours la question du changement d'échelle vers un système "réel", i.e. de la généralisation d'un système simple à un système complexe. Une des questions posées en entrée de la thèse était d'investiguer la place éventuellement particulière des EPS dans la rétention des métaux dans les sols. Dans le cadre de cette étude, jusqu'à ce point, nous ne nous sommes pas aventurés à comparer les stabilités des liaisons chimiques du xanthane avec celles d'autres macromolécules existantes dans l'environnement aqueux du sol. Nous nous proposons de comparer maintenant la capacité réactive du xanthane avec les acides humiques (HA). Le calcul du nombre de carbone réactif sur le nombre de carbone total est $\frac{C_{\text{COOH}}}{C_{\text{tot}}} \approx \frac{1}{20}$ pour le xanthane. Il n'est pas très différent du rapport constaté sur les acides humiques $\frac{C_{\text{COOH}}}{C_{\text{tot}}} \approx \frac{1}{12}$ (compilation de quatre modèles de HA cf. [Matynia et al. \(2009\)](#)). Notons que d'autres EPS peuvent avoir des rapports $\frac{C_{\text{COOH}}}{C_{\text{tot}}}$ différents du xanthane, e.g. le dextrans n'a aucun site réactif, a contrario l'alginate a un ratio $\frac{C_{\text{COOH}}}{C_{\text{tot}}} \approx \frac{1}{5}$. Les constantes de complexation xanthane- Cu^{2+} et HA- Cu^{2+} sont comprises entre $\text{Log}K_{\text{Cu-Xan}}=2.6$ à 3 pour le xanthane et $\text{Log}K_{\text{Cu-HA}}=2.5$ à 3.8 pour les HA ([Matynia et al. \(2009\)](#)). Bien que ces constantes soient plus difficilement comparables, car ajustées avec des modèles de correction électrostatique différents, elles restent du même ordre de grandeur. Ainsi, les ratios $\frac{C_{\text{COOH}}}{C_{\text{tot}}}$ et les forces de réactions vis à vis des métaux, ont des valeurs proches pour le xanthane et les HA. De plus, les HA sont, comme le xanthane, formés de structures macromoléculaires complexes. Ces arguments justifient l'hypothèse que l'effet chélatant, lié à la possibilité de repliement des structures, est possible aussi bien sur une structure de type acide humique (HA) que sur une structure de type exopolysaccharide (EPS, dont xanthane). On peut alors postuler l'existence d'un rapport minimum $\frac{C_{\text{COOH}}}{C_{\text{tot}}}$ critique impliquant la possibilité de créer des sites chélatants. Ce rapport minimum est au plus celui du xanthane i.e. il est inférieur à $\frac{1}{20}$. La majorité de la MO du sol doit vérifier cette condition (à l'exception des acides gras, mais qui ne sont pas présents en grande proportion dans le MO du sol). De ce fait on en déduit que les EPS ne constituent pas une classe à part en terme de réactivité, mais que plutôt les deux matières organiques discutées ici (HA et xanthane) sont plutôt proches en terme de réactivité. Ceci permet donc de spéculer sur le fond de la réactivité de la matière organique globale du sol. En vue de la comparaison de ces deux matières organiques, en extrapolant ce résultat aux autres matières organiques macromoléculaires existantes des sols (débris de chaîne d'ADN par exemple), on peut se poser la question si toute la matière organique vivante ou partiellement

dégradée n'a pas finalement une réactivité globale unique (i.e. variant d'un facteur inférieur à 10 en terme de force de liaison), à partir de l'instant où les groupes fonctionnels sont accessibles. Il va de soi que cette discussion n'est rien d'autre qu'une invitation à des études futures alliant les échelles microscopiques et macroscopiques, et une illustration des apports que la comparaison d'études sur différentes échelles peut amener.

Enfin, notre travail a tenté de relier les échelles macroscopiques et moléculaires, par l'étude des énergies de stabilisation des complexes Cu-xanthane (énergies acquises expérimentalement et théoriquement), et par la comparaison des RDF-EXAFS expérimentales v.s. RDF-MD théoriques. Si nous avons pu retrouver les bonnes évolutions qualitatives, nos résultats ne concluent pas quantitativement, ce qui illustre la difficulté de couplage des échelles macroscopiques et moléculaires. Néanmoins, l'échelle microscopique permet réellement de **comprendre** et de **s'approprier** les **mécanismes** des phénomènes observés à l'échelle macroscopique.

16.3 Ouverture à l'échelle des transferts

Le résultat majeur de cette étude, pour les applications liées au transfert de polluants, est le fait qu'un substrat bactérien tel qu'un EPS puisse avoir une capacité de complexation des ETM supérieure à pH acide qu'à pH neutre. Ce résultat va à l'encontre de la vision simpliste qui consiste à dire que dans un système-sol, les polluants métalliques sont plus mobiles quand le pH est acide, car alors les cations sont sous formes libres dans l'eau. Il est en réalité nécessaire, pour une étude de transfert, de prendre en compte le système-sol et tous ses constituants réactifs, pour estimer la part de polluants transportée en solution et la part fixée aux colloïdes. La connaissance de la capacité de complexation des colloïdes n'est d'ailleurs pas suffisante pour prédire un transport éventuel, puisqu'il faut également connaître la mobilité des colloïdes. Dans le cas de l'EPS xanthane, nous avons montré que la complexation du cuivre est plus importante à pH3 qu'à pH5.5 ; mais il est également fort probable que le changement de conformation de l'EPS en fonction du pH conditionne la mobilité de ce colloïde. Quelle conformation sera la plus stable ? i.e. la moins facilement mobilisable pour du transport colloïdal ? Hélices rigides, coil ou hélices agrégées ? Ces questions se répercutent ensuite à l'échelle supérieure dans le sol : celle du biofilm. Si les différentes expériences en batch s'accordent aujourd'hui à donner des valeurs de $\log K$ pour la complexation des ETM (cf. chapitre 4) par les bactéries et les biofilms, en terme de transfert, les expériences menées en conditions dynamiques semblent contradictoires et difficilement reproductibles (Muris, 2004; Ueshima et al., 2008). Ces difficultés à prédire le transfert engendré par la dégradation de biofilms pourraient être expliquées, du moins en partie, par des phénomènes de changements conformationnels de ses constituants (tels que les protéines et les EPS) libérant ou bouchant les pores du sol utilisés lors du transfert de polluants vers les horizons inférieurs. Les changements conformationnels peuvent dépendre du pH, comme nous l'avons montré ici, mais aussi de la force ionique et de la teneur en eau du milieu poreux i.e. de la déshydratation des biofilms.

L'avancée dans la compréhension des mécanismes de transfert passe par une meilleure connaissance des systèmes environnementaux étudiés. Au cours des années mille neuf cent quatre-vingt dix et deux mille, ce sont principalement les avancées en microscopie électronique environnementale qui ont permis de comprendre l'organisation des systèmes biologiques environnementaux (biofilms, agrégation des sols par les polysaccharides) (cf. figure 16.1 (a) et (b)). Depuis une dizaine d'années, les études en modélisation moléculaire apportent un nouvel éclairage pour la compréhension des mécanismes de complexation des ETM par les EPS et de l'agrégation des polysaccharides (cf. figure 16.1

(c), (d), (e)). L'amélioration des champs de force utilisés et l'augmentation des puissances de calculs permettent aujourd'hui d'aborder des systèmes de plus en plus réalistes (cf. figure 16.1). Même si la modélisation moléculaire est encore loin de pouvoir simuler des systèmes réels, en terme de nombre d'atomes, de taille de boîte ou de temps de simulation, cette méthode s'impose aujourd'hui pour la compréhension des mécanismes mis en jeu à l'échelle moléculaire et traduisant des propriétés mesurables macroscopiquement (complexation, première couche de coordination déduite des données EXAFS). Ainsi, la modélisation moléculaire, judicieusement couplée à des études expérimentales modèles en laboratoire, doit permettre de continuer à avancer dans la connaissance des mécanismes (tels que la complexation des ETM par les EPS ou l'agrégation des polysaccharides) mis en jeu lors du transfert réactif des ETM dans les sols.

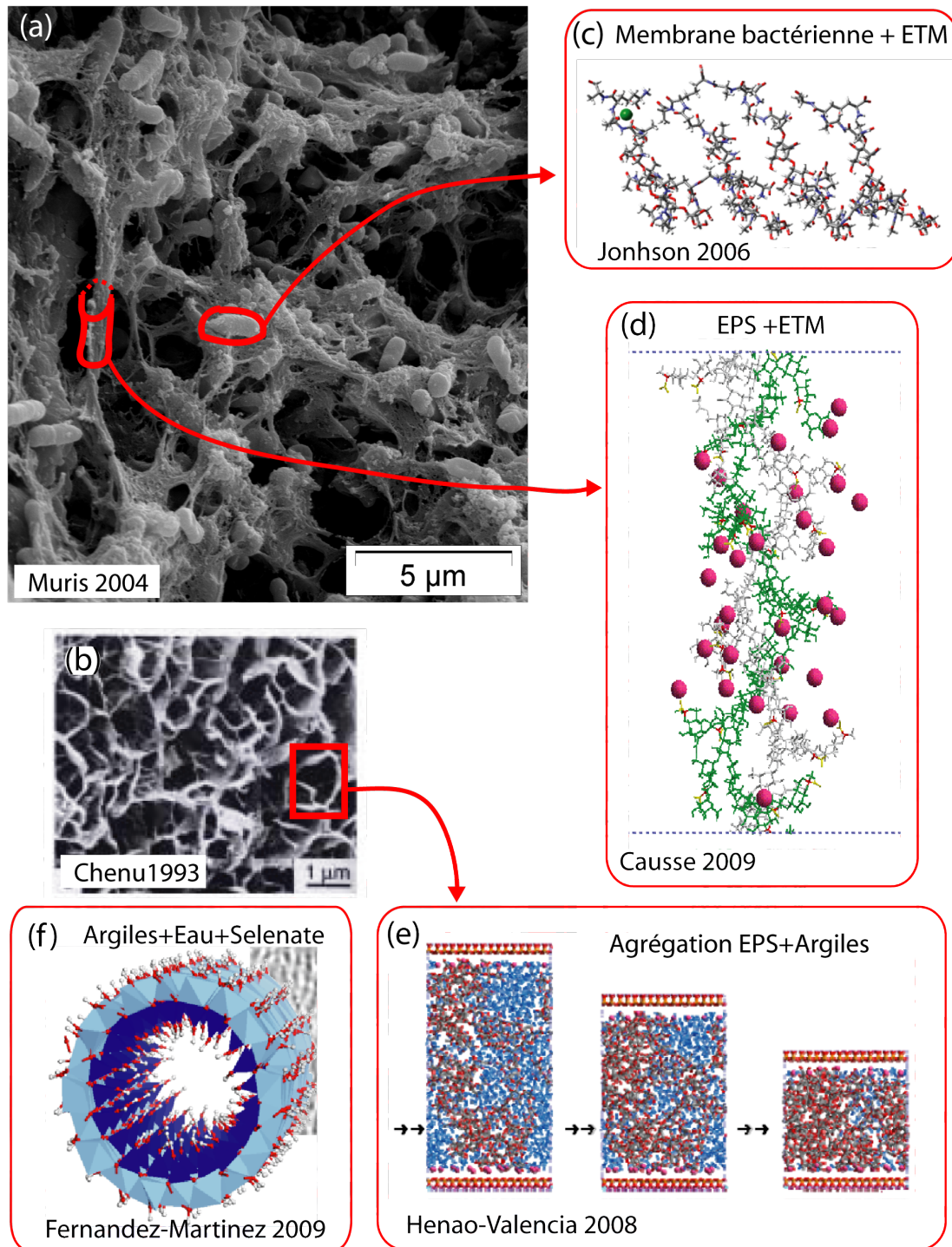


FIGURE 16.1 Photographies en microscopie électronique de systèmes environnementaux (biofilm (a), et agrégation d'argile par des EPS (b)) et représentation de quelques systèmes d'études en modélisation moléculaire permettant d'approfondir la connaissance des mécanismes mis en jeu lors de : (c) la complexation des cations métalliques par les surfaces bactériennes, (d) la complexation des ETM par des EPS, (e) l'agrégation de surfaces minérales par des EPS, (f) l'adsorption d'anions métalliques par une argiles de synthèse (l'imogolite). D'après Fernandez-Martinez (2009); Henao Valencia (2008); Causse et al. (2008); Johnson (2006); Muris (2004); Chenu (1993).

Table des matières

Résumé-Abstract	iii
Sommaire	vii
Remerciements	ix
Introduction	1
I Etat de l'art	9
1 La matière organique des sols et sa réactivité	11
1.1 Classification de la matière organique des sols	14
1.1.1 La litière	15
1.1.2 La fraction légère	15
1.1.3 La biomasse microbienne	16
1.1.4 Les substances humiques	18
1.1.5 Les matières organiques dissoutes -DOM- et les colloïdes	20
1.2 Le cas de l'environnement urbain	21
1.3 Ce qu'il faut retenir :	22
2 La réactivité de la biomasse bactérienne	23
2.1 Structure et réactivité des bactéries libres	23
2.1.1 Géométrie et structure membranaire des cellules bactériennes	23
2.1.2 Réactivité acide/base des bactéries libres	26
2.2 Structure et réactivité du biofilm bactérien	29
2.2.1 De la bactérie libre au biofilm	29
2.2.2 Structure du biofilm bactérien	30
2.2.3 Importance des EPS	31
2.2.4 Réactivité acide/base du biofilm bactérien	34
2.3 Ce qu'il faut retenir :	38
3 Les sucres dans les sols	39
3.1 Généralités	39
3.2 Importance des carbohydrates du sol	40
3.3 Structure et classification	40
3.4 Etat des sucres dans les sols	44
3.4.1 Les sucres libres	45
3.4.2 Les polysaccharides complexes ou EPS	45

3.4.3	Conséquences sur la réactivité des sucres dans les sols.	46
3.5	Ce qu'il faut retenir :	47
4	Mécanismes de rétention des ETM sur la MO du sol	49
4.1	Généralités	49
4.2	Définition du point de charge nulle	49
4.3	Les trois grands mécanismes de rétention des ETM sur la MO	52
4.3.1	L'échange d'ions en sphère externe	52
4.3.2	La complexation en sphère interne	52
4.3.3	La précipitation de surface	53
4.4	Constantes de complexations typiques MO-Métaux	53
4.4.1	Formalisme de la complexation en solution aqueuse	53
4.4.2	Condition préalable aux comparaisons des constantes thermodynamiques	53
4.4.3	Constantes de complexation ligands organiques-métaux	55
4.4.4	Constantes de complexation MO-métaux	57
4.4.5	Contribution des EPS à l'augmentation de réactivité des substrats bactériens ?	57
4.5	Ce qu'il faut retenir :	60
5	Définition du système modèle d'étude Xanthane+Cu²⁺	61
5.1	le choix de l'exopolysaccharide xanthane	61
5.2	le choix du polluant métallique Cu ²⁺	62
II	Etude à l'échelle macroscopique des complexes Xanthane-Cu²⁺	65
6	Introduction	67
6.1	Structure chimique du xanthane	67
6.2	Les hélices 5-1 du xanthane : l'état ordonné	68
6.3	Transitions conformationnelles du xanthane : hélice rigide-brin flexible	69
6.3.1	Etats ordonné (hélices) et désordonné (coil)	69
6.3.2	Scénarios des transitions conformationnelles	72
6.3.3	Liens avec la longueur de persistance q	73
6.4	Le xanthane en solution	74
6.5	Titrages potentiométriques du xanthane	75
6.5.1	Rappels théoriques sur les titrages de surface réactive	75
6.5.2	Titrages acide/base du xanthane	80
6.5.3	Titrages en présence de métaux	81
7	Matériel & Méthode	83
7.1	Purification du xanthane	83
7.2	Caractérisations CPG et RMN du xanthane	83
7.2.1	Chromatographie Phase Gaz du xanthane	83
7.2.2	Résonance Magnétique Nucléaire des protons	84
7.2.3	Conclusion sur la caractérisation chimique du xanthane	86
7.3	Titrages acidobasiques	86
7.3.1	Définition du mélange équivalent	86
7.3.2	Protocole expérimental des titrages	87
7.3.3	Traitement des données	87

TABLE DES MATIÈRES

7.3.4	Modélisation des titrages acide/base	89
7.4	Titrages en présence de cuivre et isothermes d'adsorption	95
7.4.1	Titration acidobasique en présence de cuivre	95
7.4.2	Isothermes d'adsorption du cuivre	96
7.4.3	Détermination de l'incertitude de nos mesures	97
7.4.4	Modélisation des isothermes de sorption du cuivre	97
7.5	Dichroïsme circulaire	98
8	Résultats	99
8.1	Titrages acidobasiques	99
8.1.1	Allure générale des courbes	99
8.1.2	Titration du mélange équivalent Pyr+GlcA en fonction de la force ionique - Modélisation à un et deux sites discrets sans effet électrostatique.	103
8.1.3	Titration du xanthane en fonction de la force ionique - Modélisation à un seul site avec effet électrostatique.	105
8.1.4	Comparaison du xanthane et du mélange équivalent d'acides pyruvique et glucuronique - Modélisation à deux sites discrets sans effets électrostatiques.	106
8.2	Titrages acide-base en présence de cuivre	108
8.3	Isothermes d'adsorption du Cuivre	112
8.4	Dichroïsme circulaire	114
9	Discussion	115
9.1	Modélisation de la spéciation du xanthane avec 2 états de référence	115
9.2	Nature des 2 états de référence ? - possible amélioration du modèle	118
10	Résumé : ce qu'il faut retenir	121
III	Etude à l'échelle moléculaire des complexes Xanthane-Cu²⁺	123
11	Introduction	125
11.1	Modélisation Moléculaire & systèmes environnementaux	125
11.2	Modélisation Moléculaire & xanthane	125
11.3	Objectifs de notre étude en Modélisation Moléculaire	126
12	Matériel & Méthode	129
12.1	Modélisation Moléculaire	129
12.1.1	Mécanique moléculaire	129
12.1.2	Dynamique Moléculaire	133
12.1.3	Construction des "boîtes" modèles	137
12.1.4	Scénarios en dynamique moléculaire	150
12.1.5	Outils d'analyse en modélisation moléculaire	151
12.2	Ordre local du cuivre : expérience et modélisation	158
12.2.1	RDF-EXAFS ou fonction de distribution radiale expérimentale	158
12.2.2	RDF-MD ou fonction de distribution radiale théorique	163
12.2.3	Comparaison des distances en Modélisation Moléculaire et spectroscopie EXAFS173	

13 Résultats	175
13.1 Résultats préliminaires en modélisation moléculaire.	175
13.2 Mécanisme d'adsorption du cuivre en modélisation moléculaire	186
13.2.1 Temps nécessaire à l'adsorption des Cu^{2+}	186
13.2.2 Sphères de coordination du cuivre	186
13.2.3 Mécanisme d'adsorption de Cu^{2+} sur un site simple.	188
13.2.4 Mécanisme d'adsorption de Cu^{2+} par les sites chelatants.	191
13.3 Evaluation des énergies de complexation du cuivre par le xanthane en modélisation moléculaire	194
13.3.1 Méthode directe pour l'évaluation des énergies de complexation du cuivre par le xanthane.	194
13.3.2 Méthode indirecte pour l'évaluation des énergies de complexation du cuivre par le xanthane.	195
13.4 Ordre local du cuivre	197
13.4.1 Résultats en spectroscopie EXAFS : RDF-EXAFS	197
13.4.2 Ordre local du cuivre en modélisation moléculaire : RDF-MD	200
14 Discussion : comparaison des résultats expérimentaux avec les résultats de modélisation moléculaire	203
14.1 Comparaison des expériences de titrages avec la modélisation moléculaire	203
14.1.1 Définition de l'état d'équilibre	203
14.1.2 Comparaison des stabilisations énergétiques expérimentales (titrages) et modélisées (MD).	204
14.2 Comparaison RDF-EXAFS expérimentales v.s. RDF-MD théoriques	206
14.2.1 Limites intrinsèques des comparaisons RDF-EXAFS v.s. RDF-MD	206
14.2.2 Limites méthodologiques des comparaisons RDF-EXAFS v.s. RDF-MD.	207
14.2.3 Comparaisons RDF-EXAFS expérimentales v.s. RDF-MD théoriques.	207
14.3 Compréhension du système	212
IV Conclusion générale	215
15 Synthèse des principaux résultats	217
16 Conclusion et Perspectives	221
16.1 A l'échelle moléculaire...	221
16.2 A l'échelle macroscopique...	222
16.3 Ouverture à l'échelle des transferts	223
Table des matières détaillée	230
Table des figures	239
Liste des tableaux	242
Bibliographie	245

Table des figures

1	Grand ski en descendant Comberousse, Belledonne, Avril 2006. Photo Stéphane Roudnitska	xi
2	Formalisme de l'Equation de Convection Dispersion (ECD) et représentations graphiques modèles associées. Evolution de profils de concentrations observés à un temps donné en fonction des conditions hydrodynamiques (advection(2), dispersion(1)), des processus réactionnels (adsorption -réaction chimique dans le cas d'un Kd linéaire- (4), transformation biologique ou radiologique (3)), et du transport colloïdal (f). Cas d'une injection de type créneau, concentration initiale en soluté C_0 . D'après Sigg et al. (2000) et Muris (2004)	3
3	Les différentes échelles de travail -en noir-, des exemples d'outils d'étude expérimentale -en rouge- et de modélisation -en bleu-. Cadre (a) adapté de Behra (1987)	5
1.1	Exemple simple de réactivité en chimie organique : l'addition nucléophile sur une cétone.	11
1.2	Les mystères de la chimie : librement adapté de Calvin & Hobbes, (c) Bill Watterson.	13
1.3	L'activité microbienne, au cIJur de la production de la matière organique réactive des sols. La litière et la fraction légère apporte le C organique nécessaire aux microbes pour la minéralisation d'une part, et la biosynthèse et l'humification d'autre part, constituant l'humus. Les différents pools de la MO du sol sont représentés en <i>italique</i>	17
1.4	Modèle structural d'acide humique d'après Stevenson (1994)	18
1.5	Modèle structural d'acide humique d'après Schulten and Schnitzer (1993)	19
1.6	Courbes de titrage des acides humiques (HA) extraits des tourbes <i>Carex peat</i> (CP) <i>Sphagnum Peat</i> (SP). Les symboles et les lignes pleines réfèrent respectivement aux données expérimentales et à la modélisation par modèle non-électrostatique. On observe bien les deux sauts de pH lors du titrage, correspondant aux dosages des sites carboxyliques (de $pK_a \approx 4$) et phénolique (de $pK_a \approx 9$). D'après Matynia et al. (2009)	19
1.7	Distribution de la taille des particules, colloïdes et solutés organiques et inorganiques en milieu aqueux, d'après Lead and Wilkinson (2006)	20
1.8	Photo aérienne du bassin d'infiltration d'eau pluviale urbaine Django Reinhardt (Chassieu -Est lyonnais-, Rhône) naturellement végétalisé. D'après Saulais et al. (2008) , avec le concours technique de R. Saleri R. et H. Lequay H. (labo MAP-ARIA, Ecole Nationale Supérieure d'Architecture de Lyon)	21
2.1	Exemple de calcul de la surface bactérienne de Pseudomonas putida . Photo MEB de Muris (2004)	24
2.2	Structure chimique du peptidoglycane (à gauche) et représentation schématique (à droite). Le peptidoglycane (ou muréine, ou mucocomplexe, ou mucopeptide) est un polymère de glycosaminopeptide où la N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuramique (NAM) sont liées par des liaisons osidiques $\beta(1 \rightarrow 4)$ formant des chaînes linéaires, liées entre elles transversalement par des oligopeptides	25
2.3	Structure membranaire des bactéries à Gram positif (à gauche) et Gram négatif (à droite), d'après Tortora et al. (2003)	25

2.4	Localisation des différents groupements fonctionnels réactifs dans les structures moléculaires des composants membranaires. Les groupements acides, neutres et basiques sont respectivement encadrés en rouge, vert et bleu.	26
2.5	Comparaison du modèle universel de Borrok and Fein (2005) avec les courbes de titrages acide-base de <i>Cupriavidus metallidurans</i> , <i>Escherchia coli</i> , et <i>Pseudomonas putida</i> . Les symboles et les lignes pleines réfèrent respectivement aux mesures et aux modèles (paramètres dans le tableau sous le graphique), d'après Guine et al. (2006) ; Muris (2004)	28
2.6	Les différents états de la bactérie <i>Pseudomonas putida</i> , développée en culture liquide -cellules libres à gauche- et en biofilm -à droite-. Mise en évidence de l'importance de la matrice extracellulaire. Photos MEB de Muris (2004)	29
2.7	Cycle de formation d'un biofilm (Davies, 2004)	30
2.8	Coupe fine d'une cellule bactérienne (non identifiée) à Gram négatif, (Beveridge, 1989). Illustration des constituants membranaires et EPS : (PM) la membrane plasmique, (M) le réseau de peptidoglycane (M pour Muréine), (OM) la membrane externe, et les EPS à l'extérieur : couches S (S) et capsule (C).	33
2.9	Schéma de l'organisation du biofilm bactérien. Le réseau d'EPS lie les bactéries entre elles et à la surface colonisée. Sur ce squelette d'EPS, d'autres biomolécules du milieu vont se fixer : protéines, acides nucléiques, etc.	34
2.10	Réactivités acide/base comparées du biofilm et des cellules libres de <i>Pseudomonas putida</i> . Adapté des données de Muris (2004)	35
2.11	Réactivités acide/base comparées des cellules libres de <i>Bacillus licheniformis</i> avec ou sans EPS. Adapté des données de Tourney et al. (2008)	36
3.1	Le β -D-Glucose sous forme aldose (a) et cyclique (b),(c) et (d), en représentations de Fisher (a) et (b), projection de Haworth (c), et représentation topologique(d)	40
3.2	Structures chimiques de quelques sucres communs	41
3.3	Anomérie $\alpha \rightleftharpoons \beta$ du D-Glucose	41
3.4	Transitions conformationnelles pour le β -D-Glucose. Formes chaises (1-a) et (1-b), formes enveloppes (2), bateaux croisés (3) et bateau (4). La forme la plus stable est la chaise (1-a), car tous les substituants sont alors en positions équatoriales	42
3.5	Structures chimiques des principaux polysaccharides d'origine végétale	43
3.6	Structure chimique d'une unité répétitive du polysaccharide acide synthétisé par <i>Pseudomonas</i> strain Pf9, d'après Cescutti et al. (1995)	43
3.7	Structure chimique d'une unité répétitive du polysaccharide acide synthétisé par <i>Rhizobium</i> sp. strain ANU280 (NGR234), d'après Djordjevic et al. (1986) . <i>Rhizobium</i> est une souche bactérienne symbiotique de la rhizosphère, capable de fixer l'azote.	44
3.8	Motif répétitif de la chitine, polysaccharide microbien principal constituant des parois fongiques	45
4.1	Mobilité électrophorétique (EM) de la souche bactérienne <i>Geobacillus stearothermophilus</i> à l'état juvénile (phase exponentielle de croissance) ou âgée après 24h en phase plateau (et donc comportant des substances extracellulaires), d'après Heinrich et al. (2008) . Données expérimentales (carrés) collectées pour $FI = 0.1M$ en $NaNO_3$ et modèles associés (lignes). Le pH_{PCN} est respectivement de 1.8 et 4.5 pour les bactéries jeunes et âgées. La charge de surface des deux substrats bactériens est négative pour les $pH > pH_{PCN}$	51

4.2	Schématisation des principaux mécanismes d'adsorption d'un cation métallique bivalent hexacoordonné sur les surfaces organiques négativement chargées en solution, d'après Sigg et al. (2000)	54
4.3	Maximisation de l'effet chelatant pour les complexes formant des cycles à 5 ou 6 atomes. 55	
4.4	Corrélation linéaire entre les valeurs des $\log K_{Me-acetate}$ et $\log K_{Me-bacterie}$, pour un consortium de bactéries extraites de rivières, de sols forestiers et de sols cultivés, d'après Johnson et al. (2007)	59
6.1	Structure moléculaire d'une unité répétitive du xanthane.	67
6.2	Structure hélicoïdale du xanthane : (a) vue longitudinale et (b) vue axiale. D'après Moorhouse et al. (1977)	69
6.3	Observation en microscopie électronique des hélices simples (S) et doubles (D) du xanthane, et des transitions hélices simples \rightleftharpoons hélices doubles (S \rightleftharpoons D), pour du xanthane à pH 7, FI=0.1 mM en acétate d'ammonium dans du glycérol 50%. D'après Foss et al. (1987)	70
6.4	Conceptualisation des forces stabilisatrices dues aux liaisons hydrogènes F_H et des forces de répulsions électrostatiques dues aux carboxylates négativement chargés F_R . A température fixée, lorsque la FI augmente F_R est neutralisée par les contre ions du sel du fond ionique, alors $F_H > F_R$ on s'oriente vers une structure rigide, avec les chaînes latérales le long de la chaîne principale, il y a formation des hélices ζ_1 simples ou doubles. Lorsque la FI est faible ou la température élevée ($T > T_m$), les forces de répulsions électrostatiques deviennent prédominantes, les chaînes latérales ne sont plus stabilisées vers la chaîne principale par les ponts hydrogènes, la structure est désordonnée : elle forme des brins flexibles ou coils.	71
6.5	Transitions conformationnelles ordre-désordre du xanthane en fonction de FI, T. Adapté de Morris (1995) ; Milas and Rinaudo (1979) ; Morris et al. (1977)	71
6.6	Dissociation incomplète du xanthane et association d'hélices doubles, adapté de Laneuville (2004) ; Morris (1995) ; Milas and Rinaudo (1984) ; Morris et al. (1977)	73
7.1	Résultats de la CPG pour les sucres neutres contenus dans l'échantillon de xanthane. Les deux oses majoritaires sont le glucose (Glc) et le Mannose (Man) -l'inositol étant l'étalon interne-. Le rapport expérimental Man/Glc=0.745	84
7.2	Bilan de l'hydrolyse acide du xanthane. Les liaisons éthers rompues lors de l'hydrolyse acide au TFA sont préférentiellement les liaisons affaiblies par la présence d'un oxygène en β , i.e. les liaisons entre deux sucres successifs et celles entre le sucre et les acétates. Les résultats expérimentaux montrent que les acides pyruviques ne sont pas détachés des mannoses auxquels ils sont liés par l'hydrolyse simple, cela nécessiterait une hydrolyse enzymatique spécifique (Laneuville, 2004 ; Christensen and Smidsrød, 1991 ; Yalpani, 1988).	85
7.3	Structure chimique de l'unité répétitive du xanthane avec ses protons caractéristiques en RMN 1H et spectre & données RMN 1H . Dans notre échantillon de xanthane, l'acide glucuronique (2) -GlcA- est présent sur chaque monomère alors que l'acide pyruvique (1) -Pyr- n'est présent qu'un monomère sur deux.	86
7.4	Montage expérimental pour la mesure des courbes de titrage.	88
7.5	Caractéristique géométriques du cylindre contenant la double hélice ζ_1 du xanthane. Adapté de Moorhouse et al. (1977) ; Okuyama et al. (1980)	90

7.6	Condensateur cylindrique entre le xanthane (cylindre de rayon R1 au centre négativement chargé avec la densité de charge σ) et les contres ions du FI (cylindre concentrique positivement chargé de rayon R2). L'eau entre les plaques du condensateur a une permittivité diélectrique $\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r$	92
7.7	Application du théorème de Gauss pour le calcul du champ et du potentiel électrostatique créé par le condensateur cylindrique xanthane+FI	93
7.8	Schématisation des modèles adoptés pour les parties ordonnées et désordonnées du xanthane. Le facteur d'ordonnement $\beta \in [0.9; 1]$ va évoluer avec la FI.	95
7.9	Courbe d'étalonnage de l'électrode spécifique au cuivre.	96
8.1	Production de proton de surface lors de la rupture d'une liaison acétate par hydrolyse basique.	99
8.2	Allure générale d'une courbe de titrage acide/base du xanthane. On observe les deux sauts caractéristiques de $[H_S]$ en fonction du pH. Le premier saut à pH3-5 correspond à la déprotonation des acides carboxyliques contenus dans la molécule ; le second saut à pH10-11 aux pseudo H_S créés lors de la déacétylation du xanthane.	100
8.3	Titration aller-retour-aller du xanthane avec un temps de stabilisation court entre deux point successif (10 min.). Les données expérimentales sont bien superposables, indiquant que l'hypothèse des équilibres thermodynamiques est valide pour $pH \in [2.75; 8.5]$	101
8.4	Réaction hypothétique de l'acide pyruvique sur l'acide glucuronique, selon la réaction de protection des cétones par les diols en milieu acide (Vollhardt, 2004; Warren, 1982). Le produit de cette condensation in situ pourrait ensuite être détruit par la réaction inverse de déprotection en milieu basique et donc relarguer des pseudo protons de surface H_S à pH 9.	101
8.5	Allure générale d'une courbe de titrage acide/base du mélange équivalent Pyr+GlcA. On observe les deux sauts caractéristiques de $[H_S]$ en fonction du pH. Le premier saut à pH3-5 correspond à la déprotonation des acides carboxyliques contenus dans le mélange ; le second saut à pH8-10 aux pseudo H_S créés lors de la rupture de liaisons formées <i>in situ</i>	102
8.6	Titrages et modélisation du mélange équivalent Mix = Pyr+GlcA en fonction de FI. La variation des pK_a apparents est bien décrite par la loi de Davies.	103
8.7	Evolution du pK_a de quelques acides carboxyliques simples en fonction de la FI. Les données expérimentales (Exp.) sont celles de Martell and Smith (2004) et les modélisations suivent la loi de Davies $\log \gamma_i = -A * z_i^2 * \left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - B * I \right)$ avec : A : Distance minimale d'approche ($\approx 0,5 \text{ mol}^{1/2}\text{L}^{1/2}$ dans l'eau), B : Paramètre fixé, tel que $B \in [0.2; 0.3]$, ici $B=0.25$, z_i charge de l'ion i, ici $z=1$ et $I = \frac{1}{2} * \sum c_i z_i^2$ force ionique (FI) de la solution en mol/L avec c_i concentration de l'ion i en solution en mol/L. Les constantes de réactions aux différentes FI peuvent se calculer à partir de la constante pour $I=0(\text{M})$: $K_a(I) = \frac{\gamma_{H^+} [H^+] * \gamma_{A^-} [A^-]}{[HA]} = \gamma_1 * \gamma_1 * \frac{[H^+] * [A^-]}{[HA]} = \gamma_1^2 * K_a(I = 0)$. Rem : la loi de Davies est généralement applicable avec la formule rappelée ci-avant jusqu'à $I=0.5$, or pour les acides carboxyliques simples étudiés, cette loi reste valable jusqu'à $I=2$	104
8.8	Titrages du xanthane en fonction de FI. Modélisation par le modèle cylindrique à capacité constante paramétré structuralement.	105
8.9	Comparaison des titrages du xanthane et du mélange équivalent Pyr+GlcA aux différentes FI.	106

8.10	Modélisation acide/base à deux sites discrets non électrostatiques présentée en carte topographique de NSS en 3D (a) -à gauche- et 2D (b) -à droite-. La concentration totale des sites est fixée grâce aux données structurales : $T_1 = 0.5 \text{ mmol.g}^{-1}$ et $T_2 = 1 \text{ mmol.g}^{-1}$. Les solutions dans l'aire grisée sont exclues pour des raisons chimiques et structurales; les solutions acceptables doivent vérifier $T_1 < T_2$ et $pK_2 > pK_1$ (i.e. $pK_{\text{Pyr}} < pK_{\text{GlcA}}$). Le meilleur fit est atteint pour $pK_1 = 1.85$ et $pK_2 = 2.82$ (flèches dans (a) et (b)). Ces valeurs sont relativement proches de celles de l'acide pyruvique et de l'acide glucuronique tabulées par Martell and Smith (2004) (valant respectivement 2.26 et 3.02 pour $I=0.1M$). Les doubles flèches sur la figure (b) indiquent l'incertitude sur les pK modélisés : l'incertitude sur le $pK_2 (\pm 0.2)$ -le plus acide- est plus grande que celle sur $pK_1 (\pm 0.01)$	107
8.11	Comparaison des titrages du xanthane et du mélange équivalent Pyr+GlcA à FI fixé=0.1 M, et modélisation non électrostatique à deux sites discrets.	107
8.12	Comparaison de l'adsorption du cuivre par le xanthane et le mélange équivalent Pyr+GlcA pour deux concentrations totales en cuivres différentes $[Cu]_{\text{tot}}=0.13\text{mM}$ (ou mmol/g) et $[Cu]_{\text{tot}}=0.046\text{mM}$ (ou mmol/g) à FI fixé=0.1 M.	109
8.13	Adsorption du Cuivre et diagramme de relargage de protons en fonction du pH, par le xanthane (figures de gauche) et le mélange équivalent Pyr+GlcA (figures de droites) pour différentes concentrations en cuivre total (de haut en bas respectivement $[Cu_{\text{tot}}] = 0.13 \text{ mmol/g}$ -en rouge-, $[Cu_{\text{tot}}] = 0.046 \text{ mmol/g}$ -en bleu-, $[Cu_{\text{tot}}] = 0.028 \text{ mmol/g}$ -en vert-), pour FI=0.1M.	110
8.14	Isotherme d'adsorption du cuivre par le xanthane et le mélange équivalent Pyr+GlcA à pH 3.5 et pH 5.5 et FI fixée = 0.1 M.	112
8.15	Modélisation des isothermes d'adsorption du cuivre par le xanthane à pH 3.5 et pH 5.5 et FI fixée = 0.1 M.	113
8.16	Spectre de dichroïsme circulaire du xanthane en fonction du pH à FI=0.1M en KF	114
9.1	Matrices de spéciation et vecteur colonne des constantes thermodynamiques utilisées pour la modélisation de l'adsorption du cuivre par le xanthane à deux états (désordonné : X_d et ordonné : X_o).	116
9.2	Modélisation de la chute d'adsorption du cuivre sur le xanthane, via un modèle à deux état pH dépendants : xanthane ordonné (X_o à pH neutre) \rightleftharpoons xanthane désordonné (X_d à pH acide).	117
9.3	Transitions conformationnelles du xanthane en fonction de FI, T et du pH	119
11.1	La modélisation moléculaire selon Calvin & Hobbes. D'après (c) Bill Watterson.	127
12.1	Représentation schématique des paramètres pris en compte dans le calcul d'énergie potentielle, sur l'exemple de l'acide pyruvique branché en O4 et O6 sur l' α -mannose. Par soucis de clarté, un unique exemple par type d'énergie a été placé sur la molécule. Les atomes en jaunes correspondent au site carboxylate COO^- , les autres suivent le code couleur normalisé : gris=C, blanc=H, rouge=O.	129
12.2	Représentation des différents termes liés de la fonction d'énergie potentielle.	130
12.3	Représentation des termes non-liés de la fonction d'énergie potentielle.	131
12.4	Représentation de plusieurs minima d'énergie potentielle atteints en fonction de la conformation initiale de la molécule.	132
12.5	Représentation schématique de l'algorithme <i>Leap frog</i>	134

12.6	Exemple de conditions périodiques répétées à l'infini. Les calculs ne s'effectuent que dans la cellule centrale, mais les interactions avec les cellules voisines sont prises en compte (cercles noirs). L'exemple choisi montre une double hélice de xanthane (jaune et bleu) en présence de cations Cu^{2+} et Na^+ solvatés par des molécules d'eau (rouge et blanc).	135
12.7	Petites molécules et fragments de molécules utilisés lors de nos simulations numériques et lors de la synthèse du xanthane. Rem : par la suite, les sites carboxylates COO^- seront systématiquement représentés en jaune.	139
12.8	Principe de la synthèse de notre polysaccharide de xanthane. Les couleurs des atomes suivent le code usuel (gris=C, rouge=O, blanc=H) sauf pour la représentation du dernier polysaccharide ou les groupements carboxylates sont en jaune, et la chaîne principale du xanthane en vert.	141
12.9	Squelette du xanthane et définition des angles dièdres de torsion caractéristiques (ϕ_i , ψ_i) dans la conformation hélicoïdale 5_1 (à exactement 4.93 résidus par tour d'hélice), d'après Perez and Vergelati (1987) . Par souci de clarté, les hydroxydes simples liés aux hexoses n'ont pas été représentés. les cycles A,B,C,D et E correspondent respectivement aux hexoses α mannose (Man'), acide β glucuronique (GlcA), α mannose (Man), β glucose (Glc') et β glucose (Glc) déjà représentés en figure 6.1.	142
12.10	Vue axiale (a) et longitudinale (b) de deux tours d'hélice simple (XSIMPLE) de notre xanthane, générée à partir des paramètres de Perez and Vergelati (1987) rappelés en figure 12.9 dans une boîte de 86 Å de hauteur. La chaîne principale de glucose est représentée en vert, tandis que les chaînes latérales respectent le code couleur usuel (gris=C, rouge=O, et blanc=H). Les groupements carboxyliques déprotonés (COO^-) sont représentés en jaune, et les carbones en α des carboxylates en bleu.	143
12.11	Vue axiale et longitudinale de deux tours d'hélice double antiparallèle (XANTI) (a) et parallèle (XPARA) (b) de notre xanthane dans une boîte de 86 Å de hauteur. Chaque hélice simple a une couleur unique, afin de mieux observer la géométrie engendrée par la double hélice.	144
12.12	Allure caractéristique d'un coil du xanthane (XCOIL). La chaîne principale (en vert) décrit une courbe très variable d'une simulation à l'autre, les chaînes latérales sont plus ouvertes vers l'extérieur que dans les conformations hélicoïdales.	145
12.13	Exemples de CI dans la boîte, vue de profil (en haut) et vue de dessus (en bas). Les molécules d'eau sont représentées en bleu. Les nuages de 20 molécules d'eau solvatent les cation Cu^{2+} (boules oranges), tandis que les petits nuages de 10 molécules d'eau solvatent les cations Na^+ (petites boules roses difficilement discernables). Les CI de gauche (a) et (c) ont été appliquées à la conformation XSIMPLE pour former les boîtes XSIMPLEa et XSIMPLEc. Les CI de droite (b) et (d) ont été appliquées aux conformations XPARA et XANTI pour former les boîtes XPARAb, XPARAd, XANTIb et XANTId.	147
12.14	Exemples de boîtes prêtes pour la MD : XSIMPLEc (en haut) et XANTIa (en bas) en vues longitudinale (à gauche) et axiale (à droite). Les molécules d'eau sont en bleu, les cations Cu^{2+} et Na^+ respectivement en boule orange et petite boule rose. Pour XSIMPLE, la chaîne principale du xanthane est en vert, les carboxylates en jaune portés par des carbones bleu, et le reste des chaînes latérales suit le code couleur conventionnel (gris=C, rouge=O, blanc=H). Pour XANTI, chaque hélice simple constituant la double hélice est représentée par une couleur unique (jaune ou bleu).	148

12.15	Représentation de deux conditions initiales de type e (hydratées). XCOILe (en haut) et XPARAe (en bas) en vue selon les axes Oz (à gauche) et Oy (à droite). Les molécules d'eau sont en bleu, les cuivres en orange, et les sodiums en rose.	149
12.16	Scénario de dynamique moléculaire appliqué à tous nos systèmes.	150
12.17	Diagramme de spéciation de l'acide pyruvique en présence de cuivre à pH fixé = 5.35. Les zones d'expériences de titrages et isothermes balayent des concentrations totales en cuivre variant entre 10^{-3} et 10^{-5} M, et la complexation du cuivre par l'acide pyruvique est alors de l'ordre de 15 à 20% à pH5.5. Les zones d'expériences EXAFS doivent avoir une concentration totale en cuivre plus élevée de l'ordre de 10^{-1} M; il faut donc avoir des concentrations élevées en acide pyruvique (environ 10^{-1}) pour obtenir une complexation du cuivre supérieure à 80%.	161
12.18	Photos du porte-échantillon après congélation (à gauche) et de la ligne expérimentale pénétrant dans le cryostat -cylindre orange- (à droite).	162
12.19	Comparaison des RDF-Cu-Libre théoriques ($\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6$) par la méthode (i) de sommation des plus proches voisins (un seul pic correspondant à la distance Cu-Oi) et par la méthode directe (ii) entre le cuivre central et les 6 molécules d'eau (ajout de deux distances supplémentaires, correspondant aux distances entre les oxygènes voisins ou situés à deux sommets opposés de l'octaèdre de coordination). La méthode (i) génère des résultats comparables aux données des RDF-EXAFS, alors que la méthode (ii) génère des résultats non comparables aux RDF-EXAFS.	164
12.20	Résultats des RDF-Cu-Ligand_{solo} pour les différents ligands : Cu-Libre, P, G, PG, PP, GG et PGintra. Les sommes ΣY sont les sommes des distances au cuivre central de plusieurs voisions Y, intégrées sur 1ns avec un pas de temps de 0.25ps. Voir légende page précédente. Les sommes totales sont les RDF-Cu-Ligand _{solo} notées ΣEXAFS	166
12.21	Comparaison des RDF-Cu-Ligand _{solo} calculées pour les différents types de site complexant Cu-Libre, P, G, PP, PG, GG et PGintra.	167
12.22	Comparaison des RDF-Cu-Ligand _{dans Xanthane} avec les RDF-Cu-Ligand _{solo}	169
12.23(a)	A gauche, comparaison des RDF des sites PPG et PG, considérées par la suite comme similaires. (b) A droite, comparaison des RDF-Cu-PGintra _{dans Xanthane} et RDF-Cu-PGintra _{solo} , considérées par la suite comme différentes.	171
12.24	Exemple de calcul d'une RDF-MD théorique.	172
12.25	Structure du complexe bi-Malate+Cu.	173
13.1	Photos des systèmes modèles du xanthane à pH3 en conformation XCOIL et XKOIL pendant la dernière MD à 300K à $t_{MD300K\text{finale}} = 300\text{ps}$ pour différentes conditions initiales et numérotation des ions Cu^{2+} . Les cations Cu^{2+} sont représentés par des boules oranges, les chaînes principales du xanthane sont en vert, les groupements carboxylates en jaune (pour les XCOIL seulement) et les autres atomes suivent le code couleur usuel (gris=C, rouge=O, blanc=H).	176
13.2	Photos des systèmes modèles du xanthane à pH5.5 en conformation XSIMPLE, XANTI et XPARA pendant la dernière MD à 300K à $t_{MD300K\text{finale}} = 300\text{ps}$ pour les CI a, b, c et d et numérotation des ions Cu^{2+} . Les cations Cu^{2+} sont représentés par des boules oranges. Pour XSIMPLE : les chaînes principales du xanthane sont en vert, les groupements carboxylates en jaune (sauf pour XANTI) et les autres atomes suivent le code couleur usuel (gris=C, rouge=O, blanc=H). Pour XPARA et XANTI, chaque fragment d'hélice simple constituant la double hélice a une couleur unie. Les bordures des cellules, vides, n'ont pas été représentées.	177

13.3	Représentation des structures spatiales des différents types de sites simples obtenus lors de nos simulations (la numérotation des sites est donnée sous chaque image). On observe les sites attendus : P et G.	182
13.4	Représentation des structures spatiales des différents types de sites chelatants obtenus lors de nos simulations (la numérotation des sites est donnée sous chaque image). On observe les sites attendus : PG, PP, GG et PGintra ; mais également deux nouveaux sites chelatants : PAc et PPG.	183
13.5	Comparaison à pH3 et pH5.5 du nombre de Cu ²⁺ adsorbés par type de site, pour 10 Cu ²⁺ initialement.	184
13.6	Résultats des simulations en présence de 2000 molécules d'eau (en bleu). A gauche et au centre, vues longitudinale et axiale du résultat de XPARAe. Les Na ⁺ sont en rose, ils se fixent autour du xanthane à 90% après 750ps de MD final à 300K. A droite, résultat de XCOILE, les Cu ²⁺ sont en vert, ils ne se sont pas encore fixés après 1000ps de MD finale à 300K.	185
13.7	Période d'adsorption des Cu ²⁺ pendant nos scénarios de MD.	186
13.8	Echange dynamique des molécules d'eau de la sphère d'hydratation du cation Cu ²⁺ . Le cuivre est toujours hexacoordonné par 6 molécules d'eau. Ces 6 molécules d'eau connaissent un échange dynamique concerté avec les molécules d'eau du continuum, avec un temps caractéristique $\tau_{H_2O} \approx 100$ ps. On observe l'échange de la molécule d'eau en blanc par la molécule d'eau en bleu entre les états A (t=50ps) et B (t=250ps), puis l'échange d'une molécule d'eau en vert par la molécule d'eau en magenta entre les états B (t=250ps) et C (t=550ps), et enfin le retour de la molécule d'eau verte par éjection de l'autre molécule d'eau de couleur verte entre les états C (t=550ps) et D (t=640ps).	187
13.9	Mécanisme d'adsorption concerté de Cu ²⁺ par un site pyruvate. A : Cuivre libre hexacoordonné loin du site d'adsorption. B : rapprochement du cuivre libre au voisinage du site d'adsorption. C : Adsorption du Cu ²⁺ sur le pyruvate par éjection concertée de deux molécules d'eau et fixation des deux oxygènes négatifs du carboxylate. D : Site simple de type adsorbé.	189
13.10	Adsorption irréversible sur les sites carboxylates, et échange dynamique des molécules d'eau complétant la sphère de coordination du cation Cu ²⁺ (pendant la MD finale à 300K).	190
13.11	Mécanisme d'adsorption par étape de Cu ²⁺ par un site chelatant intra-chaîne latérale (PGintra). Par souci de clarté les molécules d'eau n'ont pas été toutes représentées.	192
13.12	Mécanisme d'adsorption par étape de Cu ²⁺ par un site chelatant inter-chaînes pyruvate-glucuronate (PG).	193
13.13	Spectres EXAFS en $k^3\chi(k)$ des échantillons passés en spectroscopie d'absorption X. On rappelle (cf. figure 12.9) que les échantillons XA sont ceux du xanthane en présence de cuivre à 140ppm, XB et XC les échantillons du xanthane en présence de 1400ppm de cuivre, Pyr l'échantillon de l'acide pyruvique en présence de 635ppm de cuivre, GlcA les échantillons de l'acide glucuronique en présence de 635ppm de cuivre, Mix le mélange équimolaire des acides pyruviques et glucuroniques en présence de 635ppm de cuivre. Les chiffres 3 (resp. 5) indiquent que les échantillons sont à pH 3.5 (resp. 5.3).	197
13.14	Transformée de Fourier et fits des spectres EXAFS des échantillons XA (xanthane+cuivre à 140ppm) aux pH3.5 et 5.5. Avec $\Delta R = -0.4$ Å.	199
13.15	Résultats des fits sur les RDF-EXAFS.	199

13.16	Comparaison des Transformées de Fourier des spectres EXAFS (RDF-EXAFS) des échantillons xanthane+cuivre (à 140ppm et 1400ppm) aux pH3.5 et 5.5. Les amplitudes des deux pics (à 1.97 et 2.35 Å) sont plus importantes à pH3.5 qu'à pH5.5. Avec $\Delta R = -0.4$ Å.	200
13.17	Rappel : Principe de calcul d'une RDF-MD théorique, par combinaison linéaire des RDF-Cu-Ligand, où x, y et z sont les occurrences moyennes de chaque type de site complexant obtenu lors des scénarios en MD.	201
13.18	Construction des RDF-MD théoriques du xanthane pour les conformations XCOIL/XKOIL, XSIMPLE, XANTI et XPARA.	201
13.19	RDF-MD théoriques du xanthane à pH3 et pH5.5.	202
14.1	Définition de l'énergie libre de complexation.	203
14.2	L'effet Jahn-Teller est responsable de la distorsion tétragonale de l'octaèdre du Cuivre II hexacoordonné dans l'eau ($\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$). Les distances équatoriales sont de l'ordre de 1.96 Å, alors que les distances axiales sont augmentées et oscillent autour de 2.38 Å.	206
14.3	Comparaison des RDF-EXAFS expérimentales et des RDF-MD théoriques sur les systèmes Xanthane+Cu à pH3 et pH5. Les pics de l'oxygène et du carbone sont plus intenses à pH3/3.5 qu'à pH5.5 pour les systèmes expérimentaux comme pour les systèmes modélisés.	208
14.4	Les différentes interprétations possibles des pics des RDF-EXAFS en fonction de l'hypothèse structurale des carboxylates : conjugués (A) ou avec charge localisée (B).	211
15.1	Synthèse des principaux résultats de titrage, de modélisation moléculaire et de spectroscopie EXAFS du xanthane en présence de cuivre, en fonction du pH. L'approche macroscopique a été menée, entre autre, par des titrages du xanthane en présence de cuivre. L'adsorption du cuivre est plus forte à pH3.5 qu'à pH5.5 (cf. triangles verts). Ce comportement original est dû à un changement conformationnel du xanthane en fonction du pH. Les calculs de spéciations avec prise en compte d'un changement d'état pH-dépendant du xanthane permettent de modéliser les données (cf. lignes noires). L'approche en modélisation moléculaire, basée sur les deux états du xanthane (coil désordonné à pH3 et hélices ordonnées à pH5.5), met en évidence l'apparition de sites complexant forts à pH3 (sites chélatants, comme le Pyruvate-Cu-Glucuronate dit PG), et de sites plus faibles à pH5.5 (sites chélatants moyen PGintra, sites simples pyruviques P et glucuroniques G). L'approche moléculaire est complétée par l'acquisition des Fonctions de Distribution Radiales du cuivre (RDF) : RDF-EXAFS expérimentales, qui sont comparées aux RDF-MD théoriques. Qualitativement, les deux types de RDF présentent les deux premiers atomes voisins à des distances similaires, et une évolution semblable de l'amplitude de ces deux premiers pics (amplitude plus forte à pH3/3.5 qu'à pH5.5).	219
16.1	Photographies en microscopie électronique de systèmes environnementaux (biofilm (a), et agrégation d'argile par des EPS (b)) et représentation de quelques systèmes d'études en modélisation moléculaire permettant d'approfondir la connaissance des mécanismes mis en jeu lors de : (c) la complexation des cations métalliques par les surfaces bactériennes, (d) la complexation des ETM par des EPS, (e) l'agrégation de surfaces minérales par des EPS, (f) l'adsorption d'anions métalliques par une argiles de synthèse (l'imogolite). D'après Fernandez-Martinez (2009) ; Henao Valencia (2008) ; Causse et al. (2008) ; Johnson (2006) ; Muris (2004) ; Chenu (1993)	225

Liste des tableaux

1	Synthèse des concentrations en métaux lourds et HAP dans les poussières et les eaux de ruissellement en milieu urbain & dans les sols de bassins d'infiltration.	2
1.1	Teneur massique en matière organique (MO) pour différents types de sols (secs), sur une profondeur de 15 cm. D'après Stevenson (1994) , Badin (2009) et Matynia et al. (2009)	14
2.1	Valeurs des paramètres pKa et [site] réactifs pour les modèles "universels" discrets non-électrostatiques de Borrok et al. (2005) et Johnson et al. (2007)	27
2.2	Variation dans la composition de la matrice extracellulaire du biofilm, d'après Guibaud et al. (2003) ; McSwain et al. (2004) ; Matsukawa and Greenberg (2004) ; Simões et al. (2005) ; Priester et al. (2006) ; Comte et al. (2006) ; Marcotte et al. (2007) et Causse (2009)	32
3.1	Contributions en différents type de sucres dans la MO du sol, d'après Stevenson (1994)	39
4.1	pH du point de charge nul (pH_{PCN}) pour différentes surfaces environnementales : solides minéraux, bactéries libres et biofilms. D'après Sigg et al. (2000) ; Chavant et al. (2002) ; Muris (2004) ; Heinrich et al. (2008)	50
4.2	Constantes thermodynamiques de complexation des cations métalliques par des ligands organiques simples, d'après Martell and Smith (2004) . Avec L=Ligand, H=hydrogènes, M=cation métallique et I=Force Ionique.	56
4.3	Constantes thermodynamiques de complexation des cations métalliques par des constituants de la MO du sol : SH, bactéries, biofilm. D'après : Plette et al. (1995, 1996) ; Daughney and Fein (1998) ; Fein et al. (2001) ; Yee and Fein (2001) ; Guibaud et al. (2003) ; Ngwenya et al. (2003) ; Muris (2004) ; Comte et al. (2006) ; Guine et al. (2006, 2007) ; Johnson et al. (2007) ; Matynia et al. (2009)	58
6.1	Résultats des titrages acide/base de Holzwarth (1976) et Zhang et al. (1987)	80
7.1	Concentrations équivalentes en mmol/L correspondant à 1g/L de xanthane.	87
7.2	Caractéristiques géométriques et physiques (charge et surface spécifique) du xanthane à l'état ordonné en hélice 5_1	91
8.1	Résultats des modélisations des titrages acide/base du mélange équivalent Pyr+GlcA	103
8.2	Résultats des modélisations des titrages acide/base du xanthane en fonction de la FI, par le modèle structural à capacitance cylindrique. Le paramètre structural β est défini au chapitre précédent.	105

8.3	Résultats des modélisations des titrages acide/base du xanthane et du mélange Pyr+GlcA à FI fixée=0.1M, par modélisation non électrostatique à deux sites discrets de concentrations totales respectives : $T_1=0.5\text{mmol.g}^{-1}$ and $T_2=1\text{mmol.g}^{-1}$	107
12.1	Fréquences vibratoires typiques de quelques liaisons.	135
12.2	Systèmes équivalents entre expérience (quantités de matière en mol/L) et modélisation (quantité de matière en particule par volume élémentaire).	137
12.3	Systèmes choisis en modélisation moléculaire et équivalence en terme de concentration.	138
12.4	Taux de déprotonation des groupements pyruviques et glucuroniques à pH 3.5 et pH 5.	140
12.5	Contenu des boîtes de modélisation moléculaires en fonction des différentes conformations : XCOIL, XKOIL, XSIMPLE, XANTI et XPARA et vérification de la neutralité globale de la charge dans chaque cellule.	146
12.6	Récapitulatif de toutes les boîtes de modélisation prêtes pour la MD avec les CI a, b, c et d.	148
12.7	Composition des boîtes de simulation avec les CI e.	150
12.8	Evaluation des énergies de complexation du cuivre par des systèmes modèles.	157
12.9	Composition des échantillons préparés pour l'étude en spectroscopie EXAFS. Les échantillons ayant pu être passés sous faisceau synchrotron sont grisés.	161
12.10	Distances moyennes au cuivre central des atomes d'oxygène et de carbone dans les RDF-Cu-Ligand _{solo} et les RDF-Cu-Ligand _{dans Xanthane}	168
12.11	Distances Cu-Malate réelles et modélisées pour différents facteurs de charge.	173
13.1	Synthèse des résultats des simulations numériques à pH3 (XCOIL et XKOIL) et des hélices simples à pH5.5 (XSIMPLE).	178
13.2	Synthèse des résultats des simulations numériques des hélices doubles antiparallèles à pH5.5 (XANTI).	179
13.3	Synthèse des résultats des simulations numériques des hélices doubles parallèles à pH5.5 (XPARA).	180
13.4	Coordinance moyenne du cation Cu^{2+} dans les différentes simulations numériques réalisées.	180
13.5	Nombre moyen de types de sites par conformation explorée pour 10 cuivre mis en solution initialement.	181
13.6	Moyenne des énergies d'adsorption du cuivre par les différents types de sites en fonction de la conformation du xanthane, calculées par la méthode directe.	195
13.7	Calcul des énergies de complexation du cuivre par le xanthane en fonction de sa conformation par la méthode indirecte.	195
13.8	Résultats structuraux pour Cu^{2+} complexé par le xanthane et les ligands modèles, issus de l'analyse des données EXAFS.	198
13.9	Rappel : Nombre moyen de types de sites par conformation explorée pour 10 cuivre mis en solution initialement.	201

Liste des abréviations

Å	: Angström (unité de mesure atomique, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
ATP	: AdénosineTriPhosphate
CI	: Conditions Initiales
EPS	: ExoPolySaccharide
ETM	: Élément Trace Métallique
FA	: acide fulvique
FI	: Force Ionique ou Fond Ionique
HA	: acide humique
HAP	: Hydrocarbures Poly Aromatiques
I	: Force Ionique
LPS	: LipoPolySaccharides
MD	: Dynamique Moléculaire
ME	: Minimisation de l'Energie
MEX	: Matrice EXtracellulaire
MO	: Matière organique
NSS	: Normalized Sum Square (Somme nomalisée des moindres carrés)
p	: $x \in]0, \infty[\mapsto p(x) = -\log(x)$
PG	: PeptidoGlycane
PM	: Poids Moléculaire
RDF	: Radial Distribution Function (Fonction de Distribution Radiale)
SH	: Substance Humique
TF	: Transformée de Fourier
TFA	: Acide trifluoroacétique
UFC	: Unité Formant Colonnie

Bibliographie

Bibliographie

- Adu, J. and J. Oades (1978). Physical factors influencing decomposition of organic materials in soil aggregates. *Soil Biology and Biochemistry* 10(2), 109–115.
- Allen, M. and D. Tildesley (1987). *Computer Simulation of Liquids*. Oxford : Oxford University Press.
- Aristilde, L. and G. Sposito (2008). Molecular modeling of metal complexation by a fluoroquinolone antibiotic. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(11), 2304–2310.
- Atkinson, S., C. Chang, R. Sockett, M. Camara, and P. Williams (2006). Quorum sensing in yersinia enterocolitica controls swimming and swarming motility. *Journal of Bacteriology* 188(4), 1451–1461.
- Auerbach, I. D., C. Sorensen, H. G. Hansma, and P. A. Holden (2000). Physical morphology and surface properties of unsaturated pseudomonas putida biofilms. *Journal of Bacteriology* 182(13), 3809–3815.
- Badin, A.-L. (2009). *Répartition et influence de la matière organique et des microorganismes sur l'agrégation et le relargage de polluants dans des sédiments issus de l'infiltration d'eaux pluviales urbaines*. Ph. D. thesis, Université de Lyon.
- Behra, P. (1987). *Etude du comportement d'un micropolluant métallique - le mercure - au cours de sa migration à travers un milieu poreux saturé : identification expérimentale des mécanismes d'échanges et modélisation des phénomènes*. Ph. D. thesis, Université Louis Pasteur.
- Benfatto, M., D. A. P, S. Della Longa, and N. V. Pavel (2002). Evidence of distorted fivefold coordination of the Cu^{2+} aqua ion from an x-ray-absorption spectroscopy quantitative analysis - art. no. 174205. *Physical Review B* 6517(17), 351–355. 0163 1829 English.
- Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. Di Nola, and J. R. Haak (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81, 3684–90.
- Bergmaier, D., C. Lacroix, M. G. Macedo, and C. Champagne (2001). New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells. *Applied Microbiology Biotechnology* 57, 401–406.
- Bergmann, D., G. Furth, and C. Mayer (2008). Binding of bivalent cations by xanthan in aqueous solution. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 245–251.
- Beveridge, T. J. (1989). Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralisation. *Annual Review of Microbiologie* 43, 147–171.

-
- Beveridge, T. J. and R. Murray (1980). Sites of metal deposition in the cell wall of bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology* 141(2), 876–887.
- Borrok, D. and J. Fein (2005). The impact of ionic strength on the adsorption of protons, pb, cd, and sr onto the surfaces of gram negative bacteria : testing non-electrostatic, diffuse, and triple-layer models. *Journal of Colloid and Interface Science* 286(1), 110–126.
- Borrok, D., B. Turner, and J. Fein (2005). A universal surface complexation framework for modeling proton binding onto bacterial surfaces in geology settings. *American Journal of Science* 305, 826–853.
- Boyanov, M. I., S. D. Kelly, K. M. Kemmer, B. A. Bunker, J. Fein, and D. A. Fowle (2003). Adsorption of cadmium to bacillus subtilis bacterial cell walls : a ph-dependant x-ray adsorption fine structure study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 3299–3311.
- Branda, S. S., A. Vik, L. Friedman, and R. Kolter (2005). Biofilms : the matrix revisited. *TRENDS in Microbiology* 13(1).
- Bresolin, T., M. Milas, M. Rinaudo, and J. Ganter (1998). Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 263–275.
- Briones, A. and L. Raskin (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Current Opinion in Biotechnology* 14(3), 270–276.
- Brown, J. and B. Peake (2006). Sources of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater runoff. *Science of the Total Environment* 359, 145–155.
- Brown, M. J. and J. Lester (1979). Metal removal in activated sludge : the role of bacterial extracellular polymers. *Water Research* 13(9), 817–837.
- Burgess, J. (1988). *Ions in solutions : basic principles of chemical interactions*. Chister, West Sussex, England : Ellis Horwood limited.
- Burns, R. G. and J. E. M. Stach (2000). Microbial ecology of soil biofilms : substrate bioavailability, bioremediation and complexity. In A. Violante, P. M. Huang, J. M. Bollag, and L. Gianfreda (Eds.), *3rd Symposium on Soil Mineral-Organic Matter-Microorganism Interactions and Ecosystem Health*, Ecological significance of the interactions among clay minerals, organic matter and soil biota., 22-26 May 2000, Naples-Capri, (Italy).
- Camesano, T. A. and K. J. Wilkinson (2001). Single molecule study of xanthan conformation using atomic force microscopy. *Biomacromolecules* 2(4), 1184–1191.
- Capron, I., S. Alexandre, and G. Muller (1998). An atomic force microscopy study of the molecular organisation of xanthan. *Polymer* 39(23), 5725–5730.
- Capron, I., G. Brigand, and G. Muller (1997). About the native and renatured conformation of xanthan exopolysaccharide. *Polymer* 38(21), 5289–5295.
- Carnali, J. (1991). A dispersed anisotropic phase as the origin of the weak-gel properties of aqueous xanthan gum. *Journal of Applied Polymer Science* 43, 929–941.
- Casewit, C., K. Colwell, and A. Rappe (1992). Application of a universal force field to organic molecules. *Journal of the American Chemical Society* 114(25), 10035.
-

BIBLIOGRAPHIE

- Causse, B., L. Spadini, C. Delolme, G. Sarret, J. Martins, A. Heyraud, and K. Mazeau (2008). Proton and Cu^{2+} reactivity of xanthan, a model bacterial exopolysaccharide. In *Goldschmidt 2008*, Vancouver, Canada. Cambridge Publications.
- Cescutti, P., S. F. Osman, W. F. Fett, and D. Weisleder (1995). The structure of the acidic exopolysaccharide produced by *Pseudomonas "gingeri"* strain pf9. *Carbohydrate Research* 275, 371–379.
- Chandrasekaran, R. (1999). X-ray and molecular modeling studies on the structure-function correlations of polysaccharides. *Macromolecular Symposia 140* (Application of Polymers in Foods), 17–29. 6-0 FIELD Section Title :General Biochemistry 17 Whistler Center Carbohydrate Research, Purdue Univ., West Lafayette, IN, USA. FIELD URL : written in English.
- Chandrasekaran, R. and A. Radha (1997). Molecular modeling of xanthan :galactomannan interactions. *Carbohydrate Polymers* 32(3/4), 201–208. 33-5 FIELD Section Title :Carbohydrates 22 Whistler Center for Carbohydrate Research, Purdue University, West Lafayette, IN, USA. FIELD URL : written in English.
- Chavant, P., B. Martinie, T. Meylheuc, M.-N. Bellon-Fontaine, and M. Hebraud (2002). *Listeria monocytogenes* lo28 : Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2), 728–737.
- Cheatham, T., J. L. Miller, T. Fox, T. Darden, and P. Kollman (1995). Molecular dynamics simulations on solvated biomolecular systems - the particle mesh ewald method leads to stable trajectories of dna, rna and proteins. *Journal of the American Chemical Society* 117(14), 4193–94.
- Cheetham, N. W. H. and E. N. M. Mashimba (1992). Proton and carbon-13 nmr studies on xanthan derivatives. *Carbohydrate Polymers* 17(2), 127–136.
- Chenu, C. (1993). Clay- or sand-polysaccharide associations as models for the interface between microorganisms and soil : water related properties and microstructure. *Geoderma* 56(1-4), 143–156.
- Cheshire, M. (1979). *Nature and Origin of Carbohydrates in Soils*. London, (England).
- Christensen, B., M. Myhr, and O. Smidsrød (1996). Degradation of double-stranded xanthan by hydrogen peroxide in the presence of ferrous ions : Comparison to acid hydrolysis. *Carbohydrate Research* 280, 95–99.
- Christensen, B. and O. Smidsrød (1991). Hydrolysis of xanthan in dilute acid : Effects on chemical composition, conformation, and intrinsic viscosity. *Carbohydrate Research* 214, 55–69.
- Christensen, B., O. Smidsrød, and B. Stokke (1993). Xanthans with partially hydrolyzed side chains : Conformation and transitions. In Y. M. (Ed.), *Carbohydrate and Carbohydrate Polymers, Analysis, Biotechnology, Modification, Antiviral, Biomedical and Other Applications*, pp. 166–173. ATL Press.
- Citeau, L. (2004). *Etude des colloïdes naturel présents dans les eaux gravitaires de sols contaminés : relation entre nature des colloïdes et réactivité vis-à-vis de métaux (Zn, Cd, Pb, Cu)*. Ph. D. thesis, AgroParisTech (France).
- Comte, S., G. Guibaud, and M. Baudu (2006). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (eps) resulting from activated sludge according to their type : Soluble or bound. *Process Biochemistry* 41(4), 815–823.

-
- Cordomi, A., O. Edholm, and J. J. Perez (2007). Effect of different treatments of longrange interactions and sampling conditions in molecular dynamic simulations of rhodopsin embedded in a dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer. *J Comput Chem* 28(6), 1017–1030.
- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11(3-4), 217–221.
- Cox, J. S., D. S. Smith, L. A. Warren, and F. G. Ferris (1999). Characterizing heterogeneous bacterial surface functional groups using discrete affinity spectra for proton binding. *Environnemental Science and Technology* 33(24), 4514–4521.
- Daughney, C. J. and J. B. Fein (1998). The effect of ionic strength on the adsorption of h^+ , cd^{2+} , pb^{2+} , and cu^{2+} by bacillus subtilis and bacillus licheniformis : a surface complexation model. *Journal of Colloid and Interface Science* 198(1), 53–77.
- Davey, M. E. and G. O' toole (2000). Microbial biofilms : from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(4), 847–867.
- Davies, D. (2000). Physiological events in biofilm formation. In D. Allison, P. Gilbert, H. Lappin-Scott, and M. Wilson (Eds.), *SGM Symposium 59 : Community Structure and Co-operation in Biofilms*, pp. 37–52. Cambridge University Press.
- Davies, D. (2004). <http://biology.binghamton.edu/davies/images/biofilm.jpg>.
- de Lurdes, M., S. Gonçalves, L. Sigg, M. Reutlinger, and W. Stumm (1987). Metal ion binding by biological surfaces : Voltammetric assessment in the presence of bacteria. *Science of The Total Environment* 60, 105–119.
- De Swaaf, M., G. Grobber, G. Eggink, T. De Rijk, P. Van der Meer, and L. Stijtsma (2001). Characterisation of extracellular polysaccharide produced by cryptocodium cohnii. *Applied Microbiology Biotechnology* 57, 395–400.
- Dea, I. (1982). Polysaccharide conformation in solutions and gels. In *Food Carbohydrates, IFT Basic Symposium Series*, pp. 420–457.
- Debret, G. (2007). *Etude Par Modélisation Moléculaire des Propriétés Mécaniques d'un Système Membranaire : Le Canal Mécanosensible MscL au sein de Bicouches Lipidiques Modèles*. Ph. D. thesis, Université Paris Diderot (Paris 7).
- Dentini, M., V. Crescenzi, and D. Blasi (1984). Conformational properties of xanthan derivatives in dilute aqueous solution. *International Journal of Biological Macromolecules* 6, 93–98.
- Ding, H., N. Karasawa, and W. Goddard (1992). Atomic level simulations on a million particles : the cell-multipole method for coulomb and london nonbond interactions. *Journal of Chemical Physics* 97(6), 4309–4305.
- Dittrich, M. and S. Sibling (2005). Cell surface groups of two picocyanobacteria strains studied by zeta potential investigations, potentiometric titration, and infrared spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* 286(2), 487–495.
- Djordjevic, S. P., B. G. Rolfe, M. Batley, and J. W. Redmond (1986). The structure of the exopolysaccharide from rhizobium sp. strain anu280 (ngr234). *Carbohydrate Research* 148(1), 87–99.
-

BIBLIOGRAPHIE

- Doublier, J.-L. (1993). Rhéologie des polyosides en milieu aqueux : Solutions, gels et mélanges. In *IFTEC*, La Haye, (Pays-Bas).
- Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers, and F. Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 350–356.
- Durand, C. (2003). *Caractérisation physico-chimique des produits de l'assainissement pluvial. Origine et devenir des métaux traces et des polluants organiques*. Ph. D. thesis, Université de Poitiers.
- Dzombak, D. A. and F. M. M. Morel (1990). *Surface Complexation Modeling : Hydrous Ferric Oxide*. New-York : Wiley-Interscience.
- Esgalhado, M. E., J. C. Roseiro, and M. T. A. Collaco (1995). Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *xanthomonas campestris*. *Process biochemistry* 30(7), 667–671.
- Evans, D. and B. Holian (1985). The nose-hoover thermostat. *Journal of Chemical Physics* 83(8), 4069–4074.
- Fein, J. (2006). Thermodynamic modeling of metal adsorption onto bacterial cell walls : current challenges. *Advances in Agronomy* 90, 179–202.
- Fein, J., C. J. Daughney, N. Yee, and T. Davis (1997). A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(23), 4267–4273.
- Fein, J. B. (2000). Quantifying the effects of bacteria on adsorption reactions in water-rock systems. *Chemical Geology* 169(3-4), 265–280.
- Fein, J. B., A. M. Martin, and P. G. Wightman (2001). Metal adsorption onto bacterial surfaces : development of a predictive approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(23), 4267–4273.
- Fernandez-Martinez, A. (2009). *Biodisponibilité du sélénium dans les sols volcaniques. Réactions à la surface de l'imogolite*. Ph. D. thesis, Université Joseph Fourier - Grenoble I.
- Filloux, A. and I. Vallet (2003). Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S : médecine sciences* 19(1), p. 77–83.
- Flemming, H. (1993). Biofilms and environmental protection. *Water Science and Technology* 27(7-8), 1–10.
- Flett, W., S. F. Osman, and M. F. Dunn (1989). Characterization of exopolysaccharides produced by plant-associated fluorescent pseudomonas. *Applied and Environmental Microbiology* 55(3), 579–583.
- Flores-Candia, J.-L. and W.-D. Deckwer (1999). Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan. *Biotechnology Progress* 15, 446–452.
- Foss, P., B. T. Stokke, and O. Smidsrød (1987). Thermal stability and chain conformational studies of xanthan at different ionic strengths. *Carbohydrate Polymers* 7(6), 421–433.
- Frangou, S., E. Morris, D. Rees, R. Richardson, and S. Ross-Murphy (1982). Molecular origin of xanthan solution rheology : Effect of urea on chain conformation and interactions. *Journal of Polymer Science* 20, 531–538.

-
- Gamble, D., M. Schnitzer, and I. Hoffman (1970). Cu²⁺-fulvic acid chelation equilibrium in 0.1 M KCl at 293 K. *Canadian Journal of Chemistry* 48, 3197–3204.
- Ganaye, A., T. Winiarski, and D. Goutaland (2007). Impact d'un bassin d'infiltration d'eaux pluviales sur sa zone non saturée : relation entre la rétention des métaux et l'hétérogénéité de la formation fluvioglaciale. In Graie (Ed.), *Novatech 2007 : 6th International Conference on Sustainable Techniques and Strategies in Urban Water Management*. Lyon, France.
- Garcia, J. (1989). The quantitative Jahn-Teller distortion of the Cu²⁺ site in aqueous solution by X-ray spectroscopy. *Chemical Physics* 132, 295–37.
- Göbel, P., C. Dierkes, and W. Coldewey (2007). Storm water runoff concentration matrix for urban areas. *Journal of Contaminant Hydrology* 91, 26–42.
- Goutaland, D., T. Winiarski, J.-S. Dubé, G. Bièvre, J.-F. Buoncristiani, M. Chouteau, and B. Giroux (2008). Hydrostratigraphic characterization of glaciofluvial deposits underlying an infiltration basin using ground penetrating radar. *Vadose Zone Journal* 7(1), 194–207.
- Guibaud, G., N. Tixier, A. Bouju, and M. Baudu (2003). Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* 52(10), 1701–1710.
- Guine, V., J. Martins, B. Causse, A. Durand, J.-P. Gaudet, and L. Spadini (2007). Effect of cultivation and experimental conditions on the surface reactivity of the metal-resistant bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 to protons, cadmium and zinc. *Chemical Geology* 236(3-4), 266–280. TY - JOUR.
- Guine, V., L. Spadini, G. Sarret, M. Muris, C. Delolme, J.-P. Gaudet, and J. M. F. Martins (2006). Zinc sorption to three gram-negative bacteria : Combined titration, modeling and EXAFS study. *Environmental Science and Technology* 40, 1806–1813.
- Gupta, U. C. (1967). Carbohydrates. In M. Peterson and G.H. (Eds.), *Soil Biochemistry*, pp. 91–118. London, (England) : Arnold.
- Haas, J. R., T. J. Dichristina, and R. Wade (2001). Thermodynamics of U(VI) sorption onto *Shewanella putrefaciens*. *Chemical Geology* 180(1-4), 33–54.
- Hassler, R. and D. Doherty (1990). Genetic engineering of polysaccharide structure : Production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Progress* 6, 182–187.
- Heinrich, H. T., P. J. Bremer, A. J. McQuillan, and C. J. Daughney (2008). Modelling of the acid-base properties of two thermophilic bacteria at different growth times. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72(17), 4185–4200.
- Henao Valencia, L. J. (2008). *Etude des bases moléculaires de l'agrégation des sols par des exopolysaccharides bactériens*. Ph. D. thesis, Université Joseph Fourier.
- Hockney, R. W. and S. P. Goel (1974). Quiet high-resolution computer models of plasma. *J Comput Phys* 14, 148–158.
- Holzwarth, G. (1976). Conformation of the extracellular polysaccharide of *Xanthomonas campestris*. *Biochemistry* 15(19), 4332–4339.
- Holzwarth, G. and J. Ogletree (1979). Pyruvate free- xanthan. *Carbohydrate Research* 76, 277–280.
-

BIBLIOGRAPHIE

- Holzwarth, G. and E. B. Prestridge (1977). Multistranded helix in xanthan polysaccharide. *Science* 197(4305), 757–9.
- Hoover, W. (1985). Canonical dynamics : Equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A* 31, 1695–697.
- Horton, D., O. Mols, Z. Walaszek, and W. C. Wernau (1985). Structural and biosynthetic studies on xanthan by ¹³C-n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate Research* 141(2), 340–346.
- Hunenberger, P. and J. McCammon (1999). Effect of artificial periodicity in simulations of biomolecules under ewald boundary conditions : a continuum electrostatics study. *Biophys Chem* 78(1-2), 69–88.
- Islam, K. and S. Wright (2006). *Microbial communities*. Encyclopedia of Soil Science. CRC Press.
- Jansson, P., L. Kenne, and B. Lindberg (1975). Structure of the extracellular polysaccharide from xanthomonas campestris. *Carbohydrate Research* 45, 275–282.
- Janzen, H. H., C. A. Campbell, S. A. Brandt, G. P. Lafond, and L. Townley-Smith (1992). Light-fraction organic matter in soils from long-term crop rotations. *Soil Science Society of America Journal* 56, 1799–1806.
- Jartun, M., R. Ottesen, E. Steinnes, and T. Volden (2008). Runoff of particle bound pollutants from urban impervious surfaces studied by analysis of sediments from stormwater traps. *Science of The Total Environment* 396(2-3), 147–163.
- Jeannes, P., J. Pittsley, and F. Senti (1961). Polysaccharide b-1459 : a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. *Journal of Applied Polymer Science* 5(17), 519–526.
- Johnson, K. J., J. E. Szymanowski, D. Borrok, T. Q. Huynh, and J. B. Fein (2007). Proton and metal adsorption onto bacterial consortia : Stability constants for metal-bacterial surface complexes. *Chemical Geology* 239(1-2), 13–26.
- Johnson, Kelly J.; Cygan, R. T. F. J. B. (2006). Molecular simulations of metal adsorption to bacterial surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 5075–5088.
- Kafi, M., J. Gasperi, R. Moilleron, M. Gromaire, and G. Chebbo (2008). Spatial variability of the characteristics of combined wet weather pollutant loads in paris. *Water Research* 42(3), 539–549.
- Kang, K. and D. Pettitt (1992). Xanthan, gellan, wellan and rhamosan. In W. R. . B. J.N. (Ed.), *Industrial Gums* (3rd Edition ed.), pp. 341–397 (Chap.13). Elsevier Science & Technology.
- Kelly, S. D., K. M. Kemmer, J. Fein, D. A. Fowle, M. I. Boyanov, B. A. Bunker, and N. Yee (2002). X-ray adsorption fine structure determination of ph-dependant u-bacterial cell wall interactions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66(22), 3855–3871.
- Kim, K., J. Myung, J. Ahn, and H. Chon (1998). Heavy metal contamination in dusts and stream sediments in the taejon area, korea. *Journal of Geochemical Exploration* 64(1-3), 409–419.
- Kitamura, S., K. Takeo, T. Kuge, and B. Stokke (1991). Thermally induced conformational transition of double-stranded xanthan in aqueous salt solutions. *Biopolymers* 31, 1243–1255.

-
- Koningsberger, D. and R. Prins (1988). *X-Ray Absorption : Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS, and XANES*. New-York (USA) : Wiley.
- Lagoueyte, N. and P. Paquin (1998). Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gum. *Food Hydrocolloids* 12, 365–371.
- Laneuville (2004). *Étude de l'interaction associative entre la b- lactoglobuline et le xanthane natif ou le xanthane traité aux hautes pressions hydrodynamiques*. Ph. D. thesis, Université Laval, (Canada).
- Lapasin, R. and S. Priel (1995). *Rheology of Industrial Polysaccharides : Theory and Applications*. Glasgow, Great Britain : Chapman & Hall. Glasgow.
- Larmet, H. (2007). *Mobilisation et transfert de Zn, Cd, Cu et des colloïdes bactériens dans les bassins d'infiltration d'eaux pluviales : Influence des conditions hydrodynamiques*. Ph. D. thesis, Université Joseph Fourier - Grenoble I, (France).
- Lead, J. R. and K. J. Wilkinson (2006). Aquatic colloids and nanoparticles : Current knowledge and future trends. *Environmental chemistry* 3, 159–171.
- Lecourtier, J., G. Chauveteau, and G. Muller (1986). Salt-induced extension and dissociation of a native double-stranded xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules* 8(5), 306–10.
- Lefeber, D. J., E. A. Arevalo, J. P. Kamerling, and J. F. G. Vliegthart (2002). Synthesis of a hexasaccharide fragment of the capsular polysaccharide of streptococcus pneumoniae type 3. *Canadian Journal of Chemistry Revue Canadienne De Chimie* 80(1), 76–81.
- Legret, M. (2005). Origine des polluants en domaine routier. In LCPC (Ed.), *Journées scientifiques du LCPC : Caractérisation et valorisation des sédiments et autres sous-produits de l'assainissement des chaussées.*, pp. 46–48. Bouguenais.
- Legret, M. and C. Pagotto (1999). Evaluation of pollutant loadings in the runoff waters from a major rural highway. *Science of The Total Environment* 235(1-3), 143–150.
- Leone, L., D. Ferri, C. Manfredi, P. Persson, A. Shchukarev, S. Sjöberg, and J. Loring (2007). Modeling the acid-base properties of bacterial surfaces : A combined spectroscopic and potentiometric study of the gram-positive bacterium bacillus subtilis. *Environmental Science and Technology* 41(19), 6465–6471.
- Levy, S., S. C. Schuyler, R. K. Maglothlin, and L. A. Staehelin (1996). Dynamic simulations of the molecular conformations of wild type and mutant xanthan polymers suggest that conformational differences may contribute to observed differences in viscosity. *Biopolymers* 38(2), 251–72. 33-8 FIELD Section Title :Carbohydrates 22 Dep. Mol. Cell. Dev. Biol.,Univ. Colorado,Boulder,CO,USA. FIELD URL : written in English.
- Limousin, G. (2007). La rétention et le relargage des polluants inorganiques par les surfaces solides en milieu aqueux : mécanismes, principes physiques et modélisation. In P. U. d. Franche-Comté. (Ed.), *Traitement et Epuration des Eaux Industrielles Polluées*. Besançon, France. : Crini, G. & Badot, P.-M. (Coordinateurs).
- Liu, W. and T. Norisuye (1988). Order-disorder conformation change of xanthan in 0.01 m aqueous sodium chloride : dimensional behavior. *Biopolymers* 27(10), 1641–54.
-

- Liu, W., T. Sato, T. Norisuye, and H. Fujita (1987). Thermally induced conformational change of xanthan in 0.01M aqueous sodium chloride. *Carbohydrate Research* 160, 267–81.
- Lowry, O. H. N. J. R. . A. L. F. and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 265–275.
- Ludwig, C. (1992). *GRFIT : A program for solving speciation problems, evaluation of equilibrium constants, concentrations, and their physical parameters*. Ph. D. thesis, University of Bern (Suisse).
- Manceau, A. and J. M. Combes (1988). Structure of mn and fe oxides and oxyhydroxides : A topological approach by exafs. *Physics and Chemistry of Minerals* 15(3), 283–295.
- Manceau, A., B. Lanson, and V. Drits (2002). Structure of heavy metal sorbed birnessite. part 3 : Results from powder and polarized exafs spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66(8), 2639–2663.
- Manno, E., D. Varrica, and G. Dongarra (2006). Metal distribution on road dust samples collected in an urban area close to a petrochemical plant at gela, sicily. *Atmospheric Environment* 40, 5929–5941.
- Marcotte, L., G. Kagelaer, C. Sandt, J. Barbeau, and M. Lafleur (2007). An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples. *Analytical biochemistry* 361, 7–14.
- Martell, A. and R. Smith (2004). Nist critically selected stability constants of metal complexes database ; standard reference database 46 programm, version 8.0.
- Martin, J. P. (1971). Decomposition and binding action of polysaccharides in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 3(1), 33–41.
- Matsukawa, M. and E. P. Greenberg (2004). Putative exopolysaccharide synthesis genes influence pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Journal of Bacteriology* 186(14), 4449–4456. 0021 9193 English.
- Matynia, A., T. Lenoir, B. Causse, L. Spadini, T. Jacquet, and A. Manceau (2009). Semi-empirical proton binding constants for natural organic matter. *soumis à Geochimica and Cosmochimica Acta*.
- McSwain, B. S., R. L. Irvine, M. Hausner, and P. A. Wilderer (2004). Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 71(2), 1051–1057.
- Mermillod-Blondin, F., G. Nogaro, F. Vallier, and J. Gibert (2008). Laboratory study highlights the key influences of stormwater sediment thickness and bioturbation by tubificid worms on dynamics of nutrients and pollutants in stormwater retention systems. *Chemosphere* 72(2), 213–223.
- Milas, M. and M. Rinaudo (1979). Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. *Carbohydrate Research* 76(1), 189–196.
- Milas, M. and M. Rinaudo (1984). On the existence of two different secondary structures for the xanthan in aqueous solutions. *Polymer Bulletin* 12, 507–514.
- Milas, M. and M. Rinaudo (1986). Properties of xanthan gum in aqueous solutions : Role of the conformational transition. carbohydrate research. *Carbohydrate Research* 158, 191–204.

-
- Milas, M., M. Rinaudo, and B. Tinland (1985). The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. *Polymer Bulletin* 14, 157–164.
- Milas, M., M. Rinaudo, and B. Tinland (1986). Comparative depolymerization of xanthan gum by ultrasonic and enzymic treatments. rheological and structural properties. *Carbohydrate Polymers* 6, 95–107.
- Millane, R. P. (1993). Molecular structures of some branched celluloses. *Cellul. : Chem., Biochem. Mater. Aspects*, 87–92. 43-3 FIELD Section Title :Cellulose, Lignin, Paper, and Other Wood Products Whistler Cent. Carbohydr. Res.,Purdue Univ.,West Lafayette,IN,USA. FIELD URL : written in English.
- Moorhouse, R., M. Walkinshaw, and S. Arnott (1977). Xanthan gum-molecular conformation and interactions. In *Extracellular Microbial Polysaccharides, ACS Symposium Series 45*, pp. 90–102. Washington, D.C. : American Chemical Society.
- Morris, E., D. Rees, G. Young, M. Walkinshaw, and A. Darke (1977). Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. a role for polysaccharide conformation in recognition between xanthomonas pathogen and its plant host. *Journal of Molecular Biology* 110(1), 1–16.
- Morris, V. (1990). Science, structure and applications of microbial polysaccharides. In W. P. . W. D. Phillips, G.O. (Ed.), *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, Volume 5, pp. 315–328. Oxford University, (England) : IRL Press.
- Morris, V. (1995). Bacterial polysaccharides. In S. A.M. (Ed.), *Food polysaccharides and their applications*, pp. 341–375, (Chap.11). New York, (USA) : Marcel Dekker Inc.
- Muller, G., M. Anrhourrache, J. Lecourtier, and G. Chauveteau (1986). Salt dependence of the conformation of a single-stranded xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules* 8, 167–172.
- Muller, G. and J. Lecourtier (1988). Temperature-induced extension and dissociation of native xanthan. *Carbohydrate Polymers* 9, 213–225.
- Muller, G., J. Lecourtier, G. Chauveteau, and C. Allain (1984). Conformation of the xanthan molecule in an ordered structure. *Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* 5(4), 203–208.
- Murakami, M., F. Nakajima, and H. Furumai (2008). The sorption of heavy metal species by sediments in soakaways receiving urban road runoff. *Chemosphere* 70(11), 2099–2109.
- Muris, M. (2004). *Caractérisation du transport colloïdal du zinc en milieu sableux*. Ph. D. thesis, Université Josphé Fourier.
- Ngwenya, B. T. (2007). Enhanced adsorption of zinc is associated with aging and lysis of bacterial cells in batch incubations. *Chemosphere* 67, 1982–1992.
- Ngwenya, B. T., I. W. Sutherland, and L. Kennedy (2003). Comparison of the acid-base behaviour and metal adsorption characteristics of a gram-negative bacterium with other strains. *Applied Geochemistry* 18(4), 527–538.
- Nogaro, G., F. Mermillod-Blondin, B. Montuelle, J.-C. Boisson, M. Lafont, B. Volat, and J. Gibert (2007). Do tubificid worms influence organic matter processing and fate of pollutants in stormwater sediments deposited at the surface of infiltration systems? *Chemosphere* 70(2), 315–328.
-

BIBLIOGRAPHIE

- Norton, I. T., D. M. Goodall, S. A. Frangou, E. R. Morris, and D. A. Rees (1984). Mechanism and dynamics of conformational ordering in xanthan polysaccharide. *Journal of Molecular Biology* 175(3), 371–94. 6-4 FIELD Section Title :General Biochemistry Dep. Chem.,Univ. York,York,UK. FIELD URL : written in English.
- O' Toole, G., K. Gibbs, P. Hagger, P. Phibbs, and R. Kolter (2000). The global carbon metabolism regulator *crc* is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 182(425-431).
- Okuyama, K., S. Arnott, R. Moorhouse, and M. Walkinshaw (1980). Fiber diffraction studies of bacterial polysaccharides. In F. A. . G. K.H. (Ed.), *Fiber Diffraction methods. ACS Symp. Ser. 141*, pp. 411–427. New York, (USA) : American Chemical Society.
- Omoike, A. and J. Chorover (2004). Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis* : Aqueous chemistry and adsorption effects. *Biomacromolecules* 5(4), 1219–1230. 1525 7797 English.
- Omoike, A., J. Chorover, K. D. Kwon, and J. D. Kubicki (2004). Adhesion of bacterial exopolymers to alpha-FeOOH : Inner-sphere complexation of phosphodiester groups. *Langmuir* 20(25), 11108–11114. 0743 7463 English.
- Paoletti, S., A. Cesaro, and F. Delben (1983). Thermally induced conformational transition of xanthan polyelectrolyte. *Carbohydrate Research* 123(1), 173–8.
- Paradossi, G. and D. A. Brant (1982). Light scattering study of a series of xanthan fractions in aqueous solution. *Macromolecules* 15(3), 874–879.
- Paradossi, G., E. Chiessi, A. Barbiroli, and D. Fessas (2002). Xanthan and glucomannan mixtures : synergistic interactions and gelation. *Biomacromolecules* 3(3), 498–504.
- Patra, M., M. Karttunen, M. Hyvonen, E. Falck, P. Lindqvist, and I. Vattulainen (2003). Molecular dynamics simulations of lipid bilayers : major artifacts due to truncating electrostatic interactions. *Biophys J* 84(6), 3636–3645.
- Perez, S. and C. Vergelati (1987). Molecular modeling of the xanthan chain conformations. *International Journal of Biological Macromolecules* 9(4), 211–18. 33-5 FIELD Section Title :Carbohydrates 6, 22 Cent. Rech. Macromol. Veg.,Martin d'Herès,Fr. FIELD URL : written in English.
- Peric, L., C. S. Pereira, S. Perez, and P. H. Hünenberger (2008). Conformation, dynamics and ion-binding properties of single-chain polyuronates : a molecular dynamics study. *Molecular Simulation* 34(4), 421–446.
- Pettitt, D. (1979). Xanthan gum. In B. J. . M. J.R. (Ed.), *Polysaccharides in Food*, pp. 263–282. London, (England) : Butterworths.
- Plette, A., M. Benedetti, and W. van Riemsdijk (1996). Competitive binding of protons, calcium, cadmium and zinc to isolated cell walls of a gram-positive soil bacterium. *Environmental Science & Technology* 30(1902-1910).
- Plette, A., W. van Riemsdijk, M. Benedetti, and A. van derWal (1995). pH dependent charging behavior of isolated cell walls of a gram-positive soil bacterium. *Journal of Colloid and Interface Science* 173, 354–363.

-
- Porter, J. R. (1976). Antony van leeuwenhoek : Tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriological Reviews* 40(2), 260–269.
- Priester, J. H., S. G. Olson, S. M. Webb, M. P. Neu, L. E. Hersman, and P. A. Holden (2006). Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in pseudomonas putida unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3), 1988–1996. 0099 2240 English.
- Pétavy, F. (2007). *Traitement et valorisation des sédiments de l'assainissement pluvial*. Ph. D. thesis, Ecole Centrale de Nantes et Université de Nantes.
- Pulcini (2001). Bacterial biofilms : a review of current research. *Nephrologie* 8, 439–441.
- Rao, Y. and G. Sureshkumar (2001). Improvement in bioreactor productivities using free radicals : Hocl-induced overproduction of xanthan gum from xanthomonas campestris and its mechanism. *Biotechnology & Bioengineering* 72(1), 62–68.
- Rappe, A., C. Casewit, K. Colwell, W. Goddard, and W. Skiff (1992). Uff, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society* 114(25), 10024–10035.
- Ravel, B. and M. Newville (2005). Athena and artemis : Interactive graphical data analysis using ifeffit. *J. Synchr. Rad.* 12, 537–541.
- Rees, D., E. Morris, D. Thom, and J. Madden (1982). Shapes and interactions of carbohydrate chains. In A. G.O. (Ed.), *The Polysaccharides*, Volume 1, pp. 195–290. USA : Academic Press, Inc.
- Richardson, R. K. and S. B. Ross-Murphy (1987). Non-linear viscoelasticity of polysaccharide solutions. 2 : Xanthan polysaccharide solutions. *International Journal of Biological Macromolecules* 9, 257–264.
- Righetti, P., R. Brown, and A. Stone (1978). Aggregation of ampholine on heparin and other acidic polysaccharides in isoelectric focusing. *Biochim Biophys Acta.* 542(2), 232–44.
- Rinaudo, M. and M. Milas (1978). Polyelectrolyte behavior of a bacterial polysaccharide from xanthomonas campestris comparison with carboxymethylcellulose. *Biopolymers* 17, 2663–2678.
- Rinaudo, M. and M. Milas (1982). Xanthan properties in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* 2(4), 264–9.
- Rinaudo, M., M. Milas, and M. Vincendon (1983). 1h and 13c nmr investigation of xanthan gum. *Macromolecules* 16, 816–819.
- Rocherfort, W. and S. Middleman (1987). Rheology of xanthan gum : Salt, temperature, and strain effects in oscillatory and steady shear experiments. *The Society of Rheology* 31(4), 337–369.
- Sato, T., S. Kojima, T. Norisuye, and H. Fujita (1984). Double-stranded helix of xanthan in dilute solution : further evidence. *Polymer Journal (Tokyo, Japan)* 16(5), 423–9.
- Sato, T., T. Norisuye, and H. Fujita (1984a). Double-stranded helix of xanthan : dimensional and hydrodynamic properties in 0.1 m aqueous sodium chloride. *Macromolecules* 17(12), 2696–700.
- Sato, T., T. Norisuye, and H. Fujita (1984b). Double-stranded helix of xanthan in dilute solution : evidence from light scattering. *Polymer Journal (Tokyo, Japan)* 16(4), 341–50.
-

BIBLIOGRAPHIE

- Saulais, M., J. Bedell, D. Lemoine, G. Blake, and C. Delolme (2008). Caractérisation de la végétation colonisant spontanément un bassin d'infiltration - diversité biologique et accumulation des métaux lourds. In *3eme Séminaire Scientifique de l'OTHU*, Lyon (France).
- Schulten, H. R. and M. Schnitzer (1993). A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften* 80, 29–30.
- Shatwell, K., I. Sutherland, and S. Ross-Murphy (1990). Influence of acetyl and pyruvate substituents on the solutions properties of xanthan polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules* 12, 71–78.
- Sho, T., T. Sato, and T. Norisuye (1986). Viscosity behavior and persistence length of sodium xanthan in aqueous sodium chloride. *Biophysical Chemistry* 25(3), 307–13. 33-5 FIELD Section Title :Carbohydrates 22 Dep. Macromol. Sci.,Osaka Univ.,Toyonaka,Japan. FIELD URL : written in English.
- Shu, C.-H. and S.-T. Yang (1990). Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *xanthomonas campestris*. *Biotechnology & Bioengineering* 35, 454–468.
- Sigg, L., P. Behra, and W. Stumm (2000). *Chimie des milieux aquatiques*. Paris (France) : Dunod 3ème édition.
- Simões, M., M. Pereira, and M. Vieira (2005). Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different mechanicals. *Water Research* 39, 5142–5152.
- Skjemstad, J., R. Dalal, and P. Barron (1986). Spectroscopic investigations of cultivation effects on organic matter of vertisols. *Soil Science Society of America Journal* 50, 354–359.
- Smith, I., K. Symes, C. Lawson, and E. Morris (1981). Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. *International Journal Biological Macromolecules* 3, 129–134.
- Sokolov, I., D. Smith, G. Henderson, Y. Gorby, and F. Ferris (2001). Cell surface electrochemical heterogeneity of the fe(iii)-reducing bacteria shewanella putrefaciens. *Environmental Science and Technology* 35, 341–347.
- Southwick, J., A. Jamieson, and J. Blackwell (1982). Conformation of xanthan dissolved in aqueous urea and sodium chloride solutions. *Carbohydrate Research* 99, 117–127.
- Sposito, G. (1989). *The chemistry of soils*. Oxford University Press (USA).
- Stevenson, F. (1994). *Humus Chemistry : Genesis, Composition, Reactions*. New York (USA) : Wiley-Interscience 2nd edition.
- Stigter, D. (1975). The charged colloidal cylinder with a gouy double layer. *Journal of Colloid and Interface Science* 53(2), 296–306.
- Stokke, B., O. Smidsrød, and A. Elgsaeter (1989). Electron microscopy of native xanthan and xanthan exposed to low ionic strength. *Biopolymers* 28, 617–637.
- Stokke, B. T., B. Christensen, and A. Elgsaeter (1998). Macromolecular proprieties of xanthan. In D. S. (Ed.), *Polysaccharides : Structural diversity and functional versatility*, pp. 433–472, (Chap13). New York, (USA) : Marcel Dekker Inc.

-
- Stumm, W. (1992). *Chemistry of the Solide-Water Interface* (Wiley-Interscience ed.). John Wiley & Son Inc.
- Sutherland, I. (1990). *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. Melbourne, (Australia) : University Press.
- Sutherland, I. W. (1981). Xanthomonas polysaccharides - improved methods for their comparison. *Carbohydrate Polymers 1*, 107–15.
- Sutherland, I. W. (1982). Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. In *Advances in Microbial Physiology*, pp. 80–150.
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides : a strong and sticky framework. *Microbiology Uk 147 Part 1*, 3–9.
- Swift, R. (1996). Organic matter characterization (chap.35). In *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods* (Soil Scientific Society ed.), pp. 1018–1020. Madison (USA).
- Tako, M. and S. Nakamura (1984). Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. *Agricultural and Biological Chemistry 48*, 2887–2993.
- Teo, B. (1986). *EXAFS : Basic Principles and Data Analysis*. Berlin (Germany) : springer-verlag edition.
- Thonart, P., M. Paquot, L. Hermans, H. Alaoui, and P. d'Ippolito (1985). Xanthan production by xanthomonas campestris nr1 b-1459 and interfacial approach by zeta potential measurement. *Enzyme and Microbial Technology 7*(5), 235–238.
- Thorpe, A. and R. Harrison (2008). Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic : A review. *Science of The Total Environment 400*(1-3), 270–282.
- Tironi, I., R. Sperb, P. E. Smith, and W. F. van Gunsteren (1995). A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *J Chem Phys 102*, 5451–59.
- Toner, B., A. Manceau, M. A. Marcus, D. B. Millet, and G. Sposito (2005). Zinc sorption by a bacterial biofilm. *Environmental Science and Technology 39*(21), 8288–8294.
- Torsvik, V., J. Goksoyr, and F. Daae (1990). High diversity in dna of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology 56*(3), 782–787.
- Tortora, G. J., B. R. Funke, and C. L. Case (2003). *Introduction à la microbiologie*. Saint-Laurent.
- Tourney, J., B. T. Ngwenya, F. Mossemans, L. Tetley, and G. L. Cowie (2008). The effect of extracellular polymers (eps) on the proton adsorption characteristics of the thermophile bacillus licheniformis s-86. *Chemical Geology 247*, 1–15.
- Tuccillo, M. (2006). Size fractionation of metals in runoff from residential and highway storm sewers. *Science of The Total Environment 355*(1-3), 288–300.
- Ueshima, M., B. R. Ginn, E. A. Haack, J. E. Szymanowski, and J. B. Fein (2008). Cd adsorption onto pseudomonas putida in the presence and absence of extracellular polymeric substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta 72*(24), 5885–5895.
- Van Elsas, J. D., J. T. Trevors, and E. M. Wellington (1997). *Modern Soil Microbiology*.
-

BIBLIOGRAPHIE

- Van Loosdrecht, M., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, and A. Zhender (1987). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 53(8), 1898–1901.
- Van Loosdrecht, M., J. Lyklema, W. Norde, and A. Zhender (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews* 54(1), 75–87.
- Verlet, L. (1967). Thermodynamical properties of lennard-jones molecules. *Physiol Rev* 159, 98–103.
- Vollhardt, P. C. (2004). *Traité de Chimie Organique* (4ème édition ed.). De Boeck.
- Warren, S. (1982). *Organic Synthesis : the disconnection approach*. Chichester (England) : John Wiley & Sons Ltd.
- Wightman, P. G., J. B. Fein, D. J. Wesolowski, T. J. Phelps, P. Bénézech, and D. A. Palmer (2001). Measurement of bacterial surface protonation constants for two species at elevated temperatures. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(21), 3657–3669.
- Woods, R., C. I. Basilio, D. S. Kim, and R. H. Yoon (1992). Ethyl xanthate chemisorption isotherms and eh-ph diagrams for the silver + water + ethyl xanthate system. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 328(1-2), 179–194.
- Wuertz, S., R. Spaeth, A. Hinderberger, T. Griebel, H. Flemming, and P. Wilderer (2001). A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activates sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Science and Technology* 43(6), 25–31.
- Yalpani, M. (1988). Polysaccharides. In E. S. P. B. Amsterdam (Ed.), *Syntheses, Modifications and Structure / Property Relations*, pp. 499. New York (USA).
- Yee, N. and J. Fein (2001). Cd adsorption onto bacterial surfaces : A universal adsorption edge ? *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(13), 2037–2042.
- Young, S.-L., M. Martino, C. Kienzle-Sterzer, and A. Torres (1994). Potentiometric titration studies on xanthan solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54, 121–127.
- Zegelaar-Jaarsveld, K., S. A. W. Smits, G. A. Van der Marel, and J. H. Van Boom (1996). Synthesis of a pentasaccharide corresponding to the repeating unit of the exopolysaccharide from cryptococcus neoformans serovar d. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 4, 1819–1832.
- Zhang, J. and F. Kong (2003). An efficient synthesis of a hexasaccharide-the repeating unit of the exopolysaccharide from cryptococcus neoformans serovar a. *Tetrahedron Letters* 44, 1839–1842.
- Zhang, L., W. Liu, T. Norisuye, and H. Fujita (1987). Double-stranded helix of xanthan : rigidity in 0.01m aqueous sodium chloride containing 0.01n hydrochloric acid. *Biopolymers* 26(3), 333–41.
- Zhang, L., T. Takematsu, and T. Norisuye (1987). Potentiometric titration of xanthan. *Macromolecules* 20(11), 2882–7.
- Zhang, T. and H. Fang (2001). Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology Letters* 23(5), 405–409.
- Zhang, X., P. L. Bishop, and M. J. Kupferle (1998). Measurement of polysaccharides and proteines in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology* 37(4-5), 345–348.

**Mécanismes d'adsorption des métaux lourds par les exopolysaccharides bactériens :
Le système Xanthane-Cuivre comme modèle d'étude.**

Résumé : Les ExoPolySaccharides (EPS) bactériens constituent une fraction réactive du sol vis-à-vis des Eléments Traces Métalliques (ETM). Le système xanthane-cuivre est étudié comme modèle de complexation des ETM par les EPS. L'étude à l'échelle macroscopique, par titrages acido-basiques, détermine les valeurs des pKa du xanthane ($pK_{\text{moyenI}=0.1M}=2.5$) et propose un modèle électrostatique à condensateur cylindrique pour expliquer les variations de pKa en fonction de la force ionique. Les titrages en présence de cuivre et isothermes d'adsorption montrent un résultat inédit : le xanthane adsorbe plus de cuivre à pH3.5 qu'à pH5.5. Les valeurs des constantes apparentes de complexation valent $\text{Log}K_{\text{Cu-XanpH3.5}}=3$ et $\text{Log}K_{\text{Cu-XanpH5.5}}=2.6$. Les résultats de dichroïsme circulaire suggèrent un changement conformationnel du xanthane pH-dépendant. Un modèle thermodynamique à deux états (xanthane désordonné à $\text{pH}<5$ vs ordonné à $\text{pH}>5$), couplé aux données pKa et $\text{Log}K_{\text{Cu}}$, permet de reconstruire fidèlement les données expérimentales. L'étude à l'échelle moléculaire par modélisation moléculaire (MM) montre que la structure désordonnée de l'EPS à pH3 favorise la formation de complexes chélatants très stabilisants entre deux chaînes latérales du xanthane et Cu^{2+} . A contrario, à pH5.5 en (structure hélices ordonnées) ce sont les sites complexants simples, moins stabilisants pour le cuivre, qui prédominent. Les résultats d'EXAFS et leur modélisation MM confirment la plus forte affinité du cuivre pour le xanthane à pH3 qu'à pH5.5. Cette étude montre l'importance de la conformation des EPS dans leur capacité à fixer les ETM, et l'intérêt de l'outil MM pour la compréhension de ces phénomènes à l'échelle moléculaire.

Mots clés : Xanthane, Cu^{2+} , adsorption, titrage, isotherme, modélisation moléculaire, EXAFS

**Adsorption mechanisms of heavy metals onto bacterial exopolysaccharides :
The Xanthan-Copper system as a model study.**

Abstract : Bacterial ExoPolySaccharides (EPS) constitute a soil reactive fraction towards Metallic Trace Elements (MTE). The xanthan-copper system is studied as a complexation model of MTE onto EPS. On a macroscopic scale, we performed acid base titrations, in order to determine the pK values of xanthan (average $pK_{I=0.1M}=2.5$) and proposed an electrostatic model with cylindrical condenser to explain the variations of pKa according to the ionic strength (IS). Titrations in the presence of copper and Cu^{2+} sorption experiments show an original result : the xanthan adsorbs more copper at pH3.5 than at pH5.5. The values of the apparent complexation constants are $\text{Log}K_{\text{Cu-XanpH3.5}}=3$ and $\text{Log}K_{\text{Cu-XanpH5.5}}=2.6$. Circular dichroism experiments suggest a pH-dependent conformational change in xanthan at fixed IS. A thermodynamic model with two states (disordered xanthan for $\text{pH}<5$ versus ordered for $\text{pH}>5$), coupled with the pKa and $\text{Log}K_{\text{Cu}}$ data, give an accurate reconstruction of experimental data. On a molecular scale, a molecular modelling study (MM) shows that the disordered structure of the EPS at pH3 leads to the formation of very stabilizing chelating complexes between two side chains of xanthan and Cu^{2+} . A contrario, at pH5.5 (helix ordered structure) simple complexation sites prevail, which are less stabilizing for copper. The EXAFS results and their modelling with MM confirm the strongest affinity of copper for xanthan at pH 3.5 than at pH5.5. This study shows the importance of the EPS conformation in their ability to fix the MTE, and the advantage of the MM tool for the comprehension of these phenomena on a molecular scale.

Key words : Xanthan, Cu^{2+} , adsorption, titration, sorption isotherm, molecular modelling, EXAFS